Biol. Stud. 2010: 4(3); 15–22 • DOI: https://doi.org/10.30970/sbi.0403.120
www.http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology

УДК 612.018.2:612.35:577.121.7

ЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ ЗА РІЗНОЇ ТРИВАЛОСТІ ДІЇ ІНСУЛІНУ

В. М. Мерлавський, Б. О. Манько, О. В. Іккерт, В. В. Манько

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: mevem@ukr.net

Досліджено вплив різнотермінового введення інсуліну на процеси енергетичного забезпечення ізольованих гепатоцитів щурів за окислення сукцинату й α-кетоглутарату. Показано, що короткочасна дія інсуліну *in vitro* не впливає на досліджувані процеси. За умов *in vivo* вплив інсуліну характеризувався часовою залежністю з активацією АДФ-стимульованого окислення сукцинату й α-кетоглутарату ізольованих гепатоцитів через 4 год після ін'єкції та відсутністю ефекту при тривалому введенні (6, 12 діб).

Ключові слова: інсулін, гепатоцити, сукцинат, α-кетоглутарат, АДФ-стимульоване дихання.

ВСТУП

Важливу роль у нормальному функціонуванні організму відіграють процеси енергетичного забезпечення. Вони перебувають під чітким контролем нейрогуморальної регуляції. Зокрема, чільне місце у метаболізмі вуглеводів належить інсуліну [6, 11]. Він забезпечує регуляцію транспортування глюкози крізь плазматичну мембрану клітин-мішеней. У свою чергу, глюкоза є основним субстратом окислення, який використовується клітинами для забезпечення енергетичних потреб. Відомо, що інсулін збільшує активність піруватдегідрогенази гепатоцитів щурів [5], підвищує максимальну здатність мітохондрій скелетних м'язів синтезувати АТФ [8]. Але немає відомостей щодо впливу інсуліну на енергетичні процеси в мітохондріях ізольованих клітин печінки. Тому метою роботи було дослідити вплив різнотермінового введення інсуліну на процеси дихання гепатоцитів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди виконували на нелінійних щурах-самцях масою 180–220 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Міжнародною конвенцією роботи з тваринами та Законом України „Про захист тварин від жорстокого поводження".

В експериментах *in vivo* дослідним щурам внутрішньочеревно вводили інсулін МОНОДАР Б (0,5 од./100 г маси тварини). Контрольні тварини отримували 0,125 мл фізіологічного розчину. Ін'єкцію виконували стерильним інсуліновим шприцом. Інсулін вводили одноразово (тривалість дії препарату – 4 год) або щодоби протягом 6 і 12 діб.

Гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеґлена [7]. Для цього щурів наркотизували діетиловим ефіром і декапітували, після чого швидко виділяли печінку, перфузували її безкальцієвим позаклітинним розчином для відмивання від крові. Наступним етапом була рециркуляторна перфузія органа розчином колагенази протягом 10–15 хв. Після завершення руйнування колагенового матриксу печінку переносили у базове позаклітинне середовище, що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, $CaCl_2$ – 1,3, $MgCl_2$ – 1,0, HEPES–10,0, глюкоза – 5,0; pH 7,4. Після цього ізольовані гепатоцити диспергували легким піпетуванням. З метою вилучення клітин, з'єднаних між собою, суспензію пропускали через нейлоновий фільтр. Для вилучення метаболітів, залишків позаклітинного матриксу та пошкоджених гепатоцитів суспензію тричі центрифугували при 50 g. Для перевірки цілісності плазматичних мембран клітини фарбували 0,1% розчином трипанового синього. Кількість інтактних клітин становила 80–90%. Підрахунок гепатоцитів здійснювали з використанням камери Горяєва. В експериментах *in vitro* ізольовані гепатоцити інкубували протягом 15 хв у базовому середовищі, що містило інсулін МОНОДАР Б у концентрації 20 нмоль/л.

Для забезпечення проникності плазматичної мембрани для субстратів окислення гепатоцити пермеабілізували дигітоніном (20 мкг/мл) у розчині, близькому за іонним складом до внутрішньоклітинного середовища [9, 10, 12], що містив, ммоль/л: KCl – 90,0, NaCl – 15,0, KH_2PO_4 – 2, $MgCl_2$ – 1,0, HEPES–10,0, ЕГТА – 0,5; pH 7,2.

Поглинання кисню інтактними чи пермеабілізованими гепатоцитами визначали полярографічним методом при температурі 37°С. Як субстрати окислення використовували α-кетоглутарат (1 ммоль/л) або сукцинат (0,35 ммоль/л). Для стимуляції окисного фосфорилювання в полярографічну комірку вносили АДФ у концентрації 0,75 ммоль/л.

Тест толерантності до глюкози здійснювали, вводячи внутрішньочеревно глюкозу (3 мг/г маси тіла), розчинену у 2 мл 0,9% розчину NaCl. Перед тестом тварин не годували протягом 12 год. Тест розпочинали в один і той самий час доби (о 8 год ранку). Концентрацію глюкози у крові вимірювали за допомогою глюкометра *One Touch Ultra Easy* до та через 30, 60, 90 і 120 хв після початку тесту.

Необхідні статистичні обчислення здійснювали за допомогою комп'ютера, використовуючи пакет програм *Microsoft Office Excel*.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що залежність швидкості дихання суспензії гепатоцитів від концентрації цих клітин є нелінійною [1]. Чим більше клітин було у полярографічній комірці, тим меншою була відносна швидкість дихання (рис. 1). Оптимальна (лінійна) залежність спостерігалась у діапазоні 0,8–2,0 млн/мл, тому саме такі кількості клітин використовувались у подальших експериментах.

У живому організмі глюкоза, що надходить із кров'ю, є основним джерелом енергії для гепатоцитів. Однак інкубація інтактних клітин у розчині без глюкози не зумовлювала статистично вірогідних змін їхнього ендогенного дихання порівняно

з контролем. Рівень ендогенного дихання пермеабілізованих клітин за умов їхньої інкубації у середовищі без глюкози статистично вірогідно підвищувався на 31,2% щодо контролю (P = 0,017, n = 3).

Унаслідок додавання екзогенних субстратів окислення – α-кетоглутарату або сукцинату як за відсутності, так і за наявності екзогенного АДФ, дихання пермеабілізованих гепатоцитів, попередньо проінкубованих без глюкози, статистично вірогідно не змінювалося порівняно з контролем.

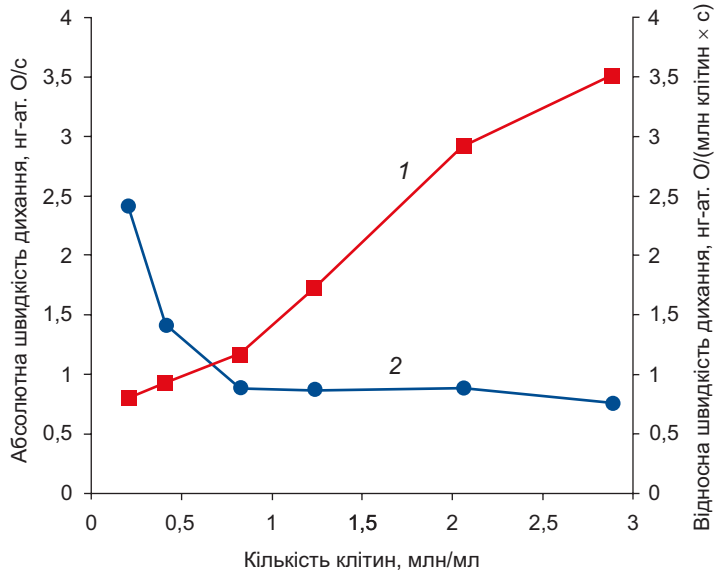

Рис. 1. Залежність швидкості дихання суспензії інтактних гепатоцитів від їхньої кількості у полярографічній комірці: *1* – крива залежності швидкості дихання від концентрації гепатоцитів у суспензії, *2* – розраховані швидкості дихання на один млн гепатоцитів за різних їх концентрацій

Fig. 1. Dependance of intact hepatocytes suspension respiration rate on their amount in polarographic cell: *1* – respiration rate depended on hepatocytes concentration in suspension; *2* – calculated respiration rate per one million of hepatocytes at different their concentrations

Підвищення рівня ендогенного дихання пермеабілізованих гепатоцитів, інкубованих у розчині без глюкози, можна пояснити, виходячи з таких міркувань. За відсутності цього вуглеводу у середовищі для забезпечення енергетичних потреб у клітинах відбувається розщеплення глікогену, а згодом і ліпідів, що потребує активації відповідних ферментів. Відомо, зокрема, що ендогенне дихання пошкоджених гепатоцитів відбувається, в основному, за рахунок окислення ліпідів [3]. Тому ми припускаємо, що гепатоцити, які перебували у розчині без глюкози, після пермеабілізації швидше розщеплювали ендогенні ліпіди, ніж контрольні, що може пояснюватись активацією відповідних ферментів. У подальших дослідженнях ми додавали глюкозу до базового позаклітинного середовища.

Зважаючи на провідну роль інсуліну в регуляції обміну вуглеводів, ми вивчали його вплив на дихання ізольованих інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів *in vitro*. Результати дослідження показали, що додавання інсуліну до середовища інтактних гепатоцитів 20 нмоль/л не впливає на їхнє дихання. Це узгоджується з даними інших авторів, які не виявили впливу інсуліну в концентрації 6 нмоль/л

на дихання інтактних гепатоцитів [2]. Після пермеабілізації клітин печінки, преінкубованих з інсуліном, швидкість поглинання кисню також не змінювалася ні за окислення ендогенних, ні за окислення екзогенних субстратів, незалежно від наявності екзогенного АДФ. Отже, за короткочасної дії інсуліну *in vitro* процеси дихання гепатоцитів не зазнають жодних змін.

Одноразове введення тваринам інсуліну (0,5 од./100 г маси тварини) також не спричиняло вірогідних змін швидкості поглинання кисню інтактними та пермеабілізованими гепатоцитами за окислення ендогенних субстратів. Проте нами виявлено статистично вірогідне інсулінспричинене підвищення швидкості дихання пермеабілізованих клітин за окислення α-кетоглутарату на 48,45% порівняно з контролем (P = 0,032, n = 3; рис. 2, *А*). Унаслідок додавання АДФ швидкість дихання пермеабілізованх гепатоцитів у досліді була статистично вірогідно вищою на 109,02%, ніж у контролі (P = 0,026, n = 3; рис. 2, *Б*).

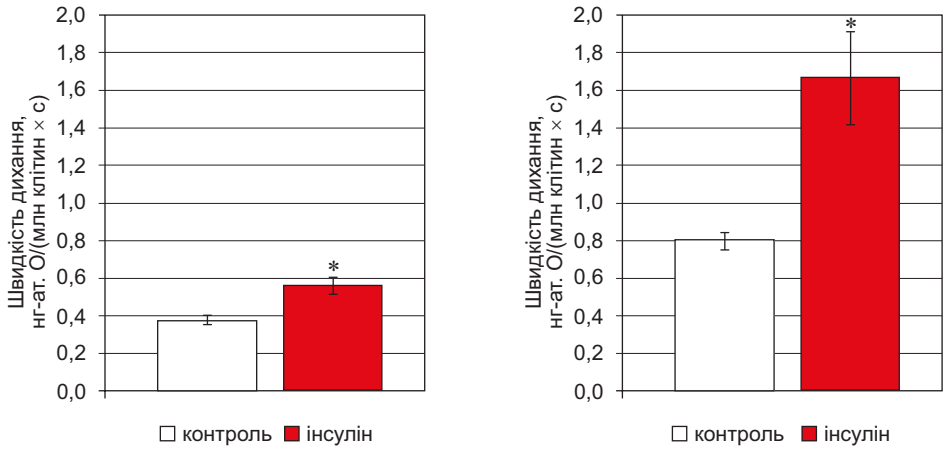

Рис. 2. Вплив інсуліну *in vivo* на дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окислення α-кетоглутарату: *А* – дихання гепатоцитів після додавання α-кетоглутарату (1 ммоль/л); *Б* – дихання гепатоцитів за окислення α-кетоглутарату і внесення екзогенного АДФ (0,75 ммоль/л); дослідження проводили через 4 год після введення інсуліну (0,5 од./100 г маси тварини); * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P \leq 0,05$, n = 3

Fig. 2. Effect of insulin *in vivo* on permeabilized hepatocytes respiration during α-ketoglutarate oxidation: *A* – hepatocytes respiration after α-ketoglutarate application (1mmol/l), *Б* – hepatocytes respiration during α-ketoglutarate oxidation after application of exogenic ADP (0,75 mmol/l); investigations were carried out in 4 hours after insulin injection (0,5 u/100 g of animal weight); * – change is statisticaly significant relative to control with $P \leq 0,05$, n = 3

За окислення сукцинату швидкість поглинання кисню у досліді не відрізнялася від контролю (рис. 3, *А*), а після внесення екзогенного АДФ – була більшою на 93,93% (P = 0,04, n = 3; рис. 3, *Б*).

Модель інтактних ізольованих гепатоцитів найбільше відображає стан цих клітин за фізіологічного спокою тварини. Оскільки під дією інсуліну швидкість дихання інтактних гепатоцитів за окислення глюкози не зростає, імовірно, що й підвищення рівня інсуліну в крові не впливає на окислення глюкози в печінці *in vivo*. Тим не менше, за дії інсуліну протягом 4 год *in vivo* у пермеабілізованих гепатоцитах інтенсифікується окислення α-кетоглутарату (НАД-залежний субстрат) і сукцинату

(ФАД-залежний субстрат), особливо за наявності екзогенного АДФ. Ми вважаємо, що за цих умов швидкість дихання є субмаксимальною внаслідок високих концентрацій екзогенних субстратів і АДФ, а тому відображає не стан спокою гепатоцитів, а стан високої функціональної активності.

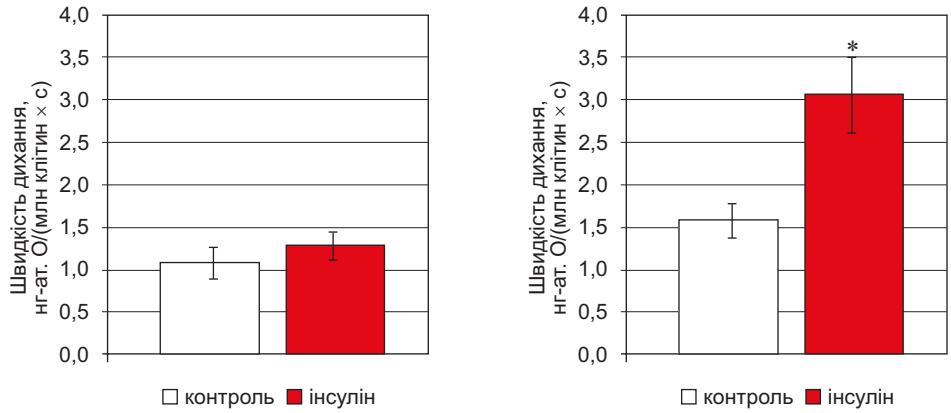

Рис. 3. Вплив інсуліну *in vivo* на дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окислення сукцинату: *А* – дихання гепатоцитів після додавання сукцинату (0,35 ммоль/л); *Б* – дихання гепатоцитів за окислення сукцинату і внесення екзогенного АДФ (0,75 ммоль/л); дослідження проводили через 4 год після введення інсуліну (0,5 од./100 г маси тварини); * – зміна статистично вірогідна щодо контролю з $P \leq 0,05$, $n = 3$

Fig. 3. Effect of insulin *in vivo* on respiration of permeabilized hepatocytes during succinate oxidation: *А* – hepatocytes respiration after succinate application (0,35 mmol/l), *Б* – hepatocytes respiration during succinate oxidation after application of exogenic ADP (0,75 mmol/l); investigations were carried out in 4 hours after insulin injection (0,5 u/100 g of animal weight); * – change is statisticaly significant relative to control with $P \leq 0,05$, $n = 3$

Доцільно зробити висновок, що інсулін за чотиригодинного впливу *in vivo* підвищує максимальну окисну здатність мітохондрій гепатоцитів незалежно від субстрату окислення, не збільшуючи фактичної швидкості окислення. З огляду на це, цілком імовірно, що однією з функцій інсуліну в живому організмі є підтримання високої окисної здатності мітохондрій гепатоцитів. Наші дані доповнюють відомості про підвищення максимальної окисної здатності мітохондрій міоцитів за дії інсуліну *in vivo* [4].

Виявивши, що інсулін стимулює процеси дихання за чотиригодинного впливу *in vivo,* ми вирішили дослідити, чи будуть спостерігатися подібні тенденції за тривалішої дії цього гормону. Результати дослідження показали, що у щурів, яким хронічно вводили інсулін протягом 6 діб, швидкість дихання інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів не змінювалась порівняно з контрольними тваринами ні за окислення ендогенних субстратів, ні при внесенні екзогенних субстратів, незалежно від наявності екзогенного АДФ.

Отже, збільшення тривалості дії інсуліну з 4 год до 6 діб повністю нівелювало його вплив на окисні процеси у гепатоцитах. Можливим поясненням цього є виникнення резистентності до інсуліну у щурів через тривалу гіперінсулінемію. Застосування тесту толерантності до глюкози показало, що через 2 год після введення вуглеводу його концентрація у крові як контрольних, так і дослідних тварин поверталася до норми. Проте виявлено певні зміни толерантності до глюкози у щурів, яким

вводили інсулін. Так, через 30 хв після введення глюкози її концентрація у крові дослідних тварин зростала до 16,45 ± 1,10 ммоль/л, що статистично вірогідно більше на 69,23%, ніж у контрольних (P = 0,007, n = 4; рис. 4). Через 90 хв концентрація глюкози у крові дослідних щурів була статистично вірогідно вищою на 16,8%, ніж у контрольних (P = 0,048, n = 3; рис. 4).

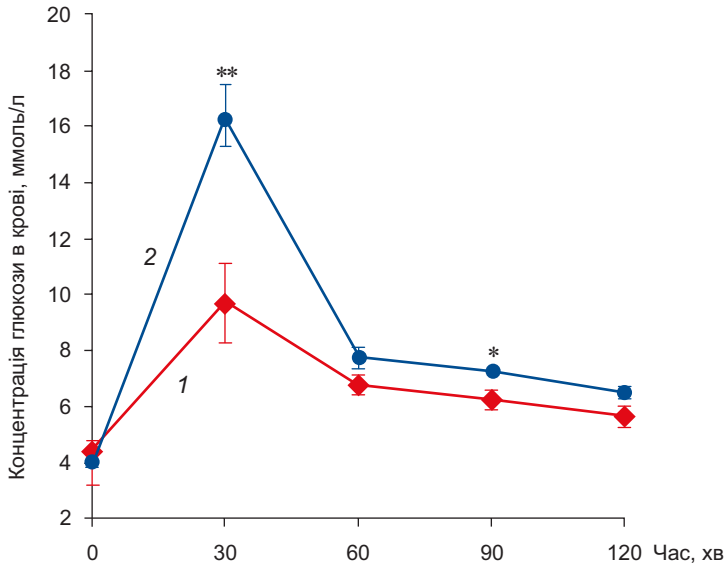

Рис. 4. Вплив шестидобового введення інсуліну на толерантність до глюкози у щурів:
1 – контрольні тварини; *2* – тварини, яким раз на добу вводили інсулін протягом шести діб (0,5 од./100 г маси тварини), на сьому добу їм вводили внутрішньочеревно глюкозу (3 мг/г маси тварини), розчинену в 2 мл фізіологічного розчину; * – зміна статистично достовірна щодо контролю з $P \leq 0{,}05$; ** – з $P \leq 0{,}01$, n = 3–4

Fig. 4. Effect of insulin injection for six days repeatedly on glucose tolerance in rats:
1 – control animals; *2* – rats which were injected with insulin (0,5 u/100 g) once a day for six days, they were injected intraabdominaly with glucose (3 mg/g of animal weight) dissolved in 2 ml of physiological solution on the seventh day; * – change is statisticaly significant relative to control with $P \leq 0{,}05$; ** – $P \leq 0{,}01$, n = 3–4

Отже, шестидобове введення інсуліну справді зумовлює певні порушення толерантності до глюкози, що і може спричинити порушення чутливості до нього дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окислення екзогенних субстратів.

При збільшенні тривалості введення інсуліну з 6 до 12 діб ми отримали результати, аналогічні до попередньої серії. Тобто швидкість дихання інтактних і пермеабілізованих гепатоцитів не змінювалась ні за окислення ендогенних субстратів, ні при внесенні екзогенних субстратів незалежно від наявності екзогенного АДФ. Інсулін також не спричиняв порушення толерантності до глюкози при збільшенні тривалості його введення, оскільки динаміка змін концентрації глюкози була ідентичною з контролем. Очевидно, за цей час у тварин виникають компенсаторні реакції за участю інших гормональних систем регуляції.

Проведення кореляційного аналізу з метою встановлення взаємозв'язку між процесами дихання гепатоцитів і толерантністю до глюкози показало, що у контрольних тварин кореляція між цими показниками відсутня. Проте у тварин, яким

вводили інсулін протягом 12 діб, коефіцієнт кореляції між площею під кривою концентрації глюкози у крові (показник толерантності; чим більша площа, тим гіршою є толерантність) й АДФ-стимульованим диханням при окисленні сукцинату пермеабілізованими гепатоцитами становить -0,86, а при окисленні α-кетоглутарату – -0,96. Отже, чим вища толерантність до глюкози, тим вищий рівень АДФ-стимульованого дихання. Оскільки порушення (зниження) толерантності до глюкози вказують на виникнення резистентності до інсуліну, то негативне значення коефіцієнта кореляції означає, що максимальна окисна здатність мітохондрій гепатоцитів перебуває в оберненій залежності від резистентності до інсуліну. Це свідчить на користь припущення про роль інсуліну в підтриманні високої окисної здатності мітохондрій гепатоцитів і узгоджується з нашими даними про активацію ним дихання за одноразового введення. Пояснення відсутності кореляцій між максимальною окисною здатністю пермеабілізованих гепатоцитів і толерантністю до глюкози у контрольних тварин буде предметом подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

Отже, короткочасна дія інсуліну *in vitro* не впливає на швидкість дихання інтактних гепатоцитів, ендогенного дихання пермеабілізованих гепатоцитів, а також дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окислення сукцинату й α-кетоглутарату незалежно від наявності екзогенного АДФ. Інсулін характеризувався часовою залежністю впливу на процеси дихання *in vivo* – з активацією АДФ-стимульованого окислення сукцинату і α-кетоглутарату ізольованих гепатоцитів через 4 год після ін'єкції та відсутністю ефекту при тривалому введенні (6 і 12 діб). На нашу думку, це зумовлено тим, що за короткочасної дії реалізуються початкові впливи гормону інсуліну, а тривале введення зумовлює розвиток резистентності до гіперінсулінемії.

Дослідження виконано за часткової підтримки Західно-Українського Біо-Медичного Дослідницького Центру (WUBMRC).

1. *Гулак П.В., Дудченко А.М., Зайцев В.В.* и др. **Гепатоцит: функционально-метаболические свойства**. М.: Наука, 1985. 272 с.
2. *Dehaye J.P., Hughes B.P., Blackmore P.F.* et al. Insulin inhibition of alpha-adrenergic actions in liver. **Biochem. J**, 1981; 194: 949–956.
3. *Exton J.H.* Metabolism of rat-liver cell suspensions I. General properties of isolated cells and occurrence of the citric acid cycle. **Biochem. J**, 1964; 92: 457–467.
4. *Hansen P.S., Buhagiar K.A., Gray D.F., Rasmussen H.H.* Voltage-dependent stimulation of the Na^+-K^+ pump by insulin in rabbit cardiac myocytes. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, 2000; 278: 546–553.
5. *Huang B., Wu P., Bowker-Kinley M.M., Harris R.A.* Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptor-α ligands, glucocorticoids, and insulin. **Diabetes**, 2002; 51: 276–283.
6. *Liu H.-Y., Yehuda-Shnaidman E., Hong T.* et al. Prolonged exposure to insulin suppresses mitochondrial production in primary hepatocytes. **J. Biol. Chem**, 2009; 284(21): 14087–14095.
7. *Seglen P.O.* Preparation of isolated rat liver cells. **Methods Cell Biol**, 1976; 13: 29–83.
8. *Stump C.S., Short K.R., Bigelow M.L.* et al. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. **PNAS**, 2003; 100(13): 7996–8001.
9. *Tanaka A., Chance B., Quistorffs B.* A possible role of inorganic phosphate as a regulator of oxidative phosphorylation in combined urea synthesis and gluconeogenesis in perfused rat liver. A phosphorus magnetic resonance spectroscopy study. **J. Biol. Chem**, 1989; 264(17): 10034–10040.

10. *Wang K., Wondergem R.* Hepatocyte water volume and potassium activity during hypotonic stress. **J. Membr. Biol**, 1993; 135(2): 137–44.
11. *Wiederkehr A., Wollheim C.B.* Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. **Endocrinology**, 2006; 147: 2643–2649.
12. *Gasbarrini A., Borle A.B., Farghali H.* et al. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na^+_i, Ca^{2+}_i, Mg^{2+}_i and cytotoxicity in rat hepatocyte. **J. Biol. Chem**, 1992; 267(10): 6654–6663.

ENERGY PROCESSES IN ISOLATED HEPATOCYTES AT DIFFERENT DURATION OF INSULIN ACTION

V. M. Merlavsky, B. O. Manko, O. V. Ikkert, V. V. Manko
Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskyi St., 79005 Lviv, Ukraine
e-mail: mevem@ukr.net

Insulin effect on energy supplying processes in isolated rat hepatocytes at different duration of hormone action at succinate and α-ketoglutarate oxidation was investigated. Short-term insulin action *in vitro* does not influence the examined processes. *In vivo* insulin effect is characterized by time dependence with activation of ADP-stimulated succinate and α-ketoglutarate oxidation in isolated hepatocytes in 4 hours after injection and absence of influence in case of prolonged action (6, 12 days).

Key words: insulin, hepatocytes, succinate, α-ketoglutarate, ADP-stimulated respiration.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

В. М. Мерлавский, Б. О. Манько, О. В. Иккерт, В. В. Манько
Львовский национальной университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, 79005 Львов, Украина
e-mail: mevem@ukr.net

Исследовано влияние инсулина на процессы энергетического обеспечения изолированных гепатоцитов крыс при разной продолжительности его действия при окислении сукцината и α-кетоглутарата. Показано, что кратковременное действие инсулина *in vitro* не влияет на исследуемые процессы. В условиях *in vivo* влияние инсулина характеризуется временной зависимостью с активацией АДФ-стимулированного окисления сукцината и α-кетоглутарата изолированных гепатоцитов через 4 часа после инъекции и отсутствием эффекта при длительном введении (6, 12 суток).

Ключевые слова: инсулин, гепатоциты, сукцинат, α-кетоглутарат, АДФ-стимулированное дыхание.

Одержано: 24.10.2010