УДК 612.34: 57.017.722

*Б.О. МАНЬКО, О.Ю. ВЕЛИКОПОЛЬСЬКА, М.Ю. КЛЕВЕЦЬ, В.В. МАНЬКО*
*Львівський національний університет ім. Івана Франка*

# Залежність між швидкістю мітохондріального дихання та вмістом депонованого $Ca^{2+}$ в ацинарних панкреацитах за дії карбахоліну

Дослідження взаємозв'язків між процесами $Ca^{2+}$-сигналізації та мітохондріального окиснення клітин є актуальною проблемою сучасної фізіології. Порушення цих взаємозалежностей може бути причиною розвитку різних захворювань, зокрема, гострого панкреатиту [5, 9]. Відомо, що в ацинарних клітинах підшлункової залози первинні агоністи спричинюють вивільнення $Ca^{2+}$ з внутрішньоклітинних депо [6], що супроводжується стимуляцією секреції [10] та змінами рівнів мітохондріального мембранного потенціалу [8], НАДН [7] і АТФ [9]. Однак не визначено залежність між інтенсивністю вивільнення $Ca^{2+}$ та швидкістю мітохондріального дихання за дії секретагогів. Тому мета цього дослідження – виявити закономірності впливу карбахоліну у різних концентраціях на дихання ізольованих панкреатичних ацинусів та вміст у панкреацитах депонованого $Ca^{2+}$.

**Матеріали та методи досліджень.** Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Досліди виконували на білих нелінійних щурах-самцях масою 200...300 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Декапітацію наркотизованих хлороформом тварин здійснювали в лабораторії, ізольовано від інших.

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримували з використанням колагенази (тип 4, 220 од./мл) за модифікованим методом Вільямса і співавт. [10], як це описано раніше [3]. Клітини підраховували за допомогою камери Горяєва. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували трипановим синім (0,1%-й розчин). Після виділення частка трипаннегативних клітин у складі ацинусів становила понад 95%.

Швидкість споживання кисню визначали за температури 37°С полярографічним методом, використовуючи установку, що складається з електрода Кларка, полярографа YSI 5300, цифрового вольтметра UT60E, персонального комп'ютера та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл. У полярографічну комірку вносили суспензію інтактних панкреатичних ацинусів (приблизно 1,6...2 млн клітин) у базовому позаклітинному середовищі, що містило (ммоль/л): NaCl – 140,0; KCl – 4,7; $CaCl_2$ – 1,3; $MgCl_2$ – 1,0; HEPES–10,0; глюкоза – 10,0; БСА – 2,5 мг/мл; соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл; pH 7,4. Швидкість дихання обчислювали, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль $O_2$ [2].

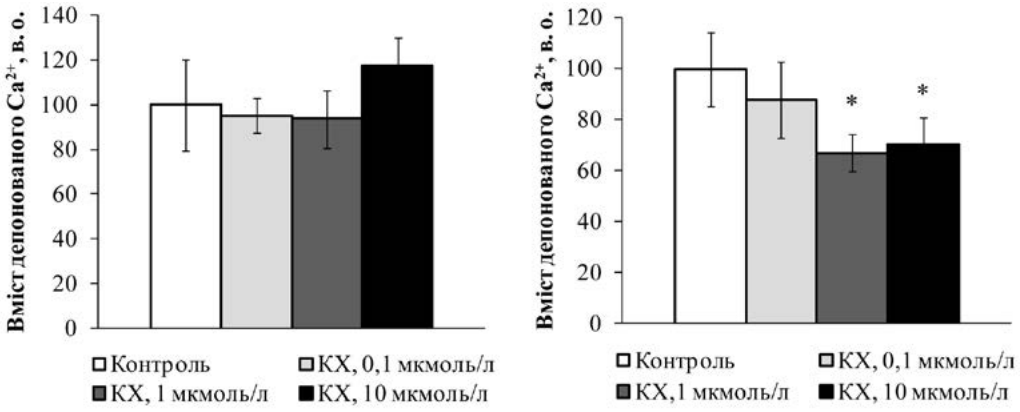
Вміст депонованого $Ca^{2+}$ визначали за інтенсивністю флуоресценції $Ca^{2+}$-хлортетрациклінового комплексу [1]. Для цього ізольовані ацинуси інкубували протягом 15 хв з хлортетрацикліном (20 мкмоль/л) у базовому позаклітинному або номінально безкальцієвому розчинах. Після цього визначали інтенсивність флуоресценції за довжини збуджувального світла ($\lambda_{збуд}$) 380 нм. Флуоресценцію реєстрували

© Манько Б.О., Великопольська О.Ю., Клевець М.Ю., Манько В.В., 2013

за $\lambda_ф$ 480...530 нм, використовуючи мікроскоп ЛЮМАМ-И1 (Росія), фотоелектропомножувач ФМЭЛ-1 та цифровий вольтметр UT60E, під'єднаний до персонального комп'ютера. Показник фонової флуоресценції віднімали.

Кожен експеримент повторювали на трьох окремих препаратах ізольованих ацинусів, отриманих із різних тварин. Для мінімізації впливу часу при дослідженні клітинного дихання проводили дві паралелі з дзеркально відображеним порядком дослідних проб. Показники флуоресценції усереднювали з 15–20 ацинусів у кожній дослідній пробі. Необхідні статистичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*. Цифрові результати подані як $M \pm m$. Вірогідність різниці середніх арифметичних двох вибірок ($p$) визначали за $t$-тестом Стьюдента.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Для дослідження впливу карбахоліну на вміст депонованого $Ca^{2+}$ ізольовані ацинуси інкубували протягом 5 хв з цим агоністом у концентраціях 0,1; 1 або 10 мкмоль/л. Хоча відомо, що активація $M$-холінорецепторів призводить до вивільнення $Ca^{2+}$ із депо ацинарних панкреацитів [6], у наших дослідженнях за фізіологічної концентрації $Ca^{2+}$ у середовищі карбахолін у жодній із застосованих концентрацій не спричиняв змін вмісту депонованого $Ca^{2+}$ (рис. 1, *а*).




*а* *б*

Рис. 1. Вплив карбахоліну на вміст депонованого $Ca^{2+}$ в ацинарних клітинах підшлункової залози за [$Ca^{2+}$] у середовищі 1,3 (*а*) та 0 (*б*) ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця з $p \leq 0,05$, $n=3$

Ми припустили, що відсутність змін депонованого $Ca^{2+}$ пов'язана із активацією депозалежного входу $Ca^{2+}$ [4]. Для унеможливлення цього процесу в наступній серії досліджень ми інкубували ацинуси з карбахоліном у номінально безкальцієвому середовищі. За цих умов карбахолін у концентраціях 1...10 мкмоль/л спричинив зниження вмісту депонованого $Ca^{2+}$ на 32,96 і 29,38 % відповідно ($p \leq 0,05$; рис. 1, *б*). Отже, тривала дія карбахоліну призводить до вивільнення $Ca^{2+}$ з клітинних депо, що відповідно спричинює їх вичерпання. Цього, однак, не можна було виявити за використання $Ca^{2+}$-вмісного середовища, коли процес депозалежного входу $Ca^{2+}$ протидіяв його вивільненню, що навіть виявилось у деякій тенденції до зростання вмісту депонованого $Ca^{2+}$ (рис. 1, *а*, 10 мкмоль/л карбахоліну).

Для вивчення кореляції між вивільненням $Ca^{2+}$ та клітинним диханням ми преінкубували ізольовані ацинуси протягом 5 хв з карбахоліном в умовах, близьких до фізіологічних – $Ca^{2+}$-вмісному середовищі. Швидкість споживання кисню інтактними панкреатичними ацинусами становила 0,28±0,02 нмоль $O_2$ / (с×$10^6$ клітин). Після інкубації

з карбахоліном у концентрації 0,1 мкмоль/л швидкість дихання не змінювалась (рис. 2). Однак у вищих концентраціях (1 і 10 мкмоль/л) карбахолін інтенсифікував споживання кисню (на 11,40 та 12,38%, $p \leq 0{,}01$; рис. 2).

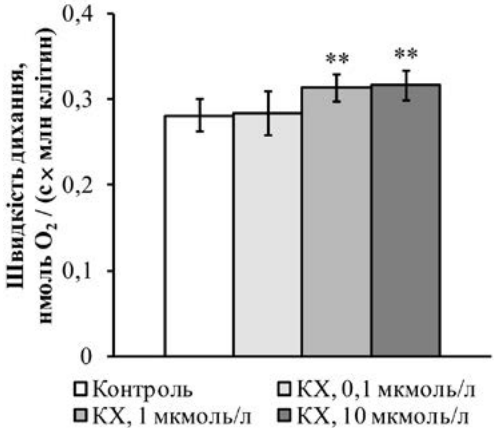



Рис. 2. Вплив карбахоліну на споживання кисню ізольованими панкреатичними ацинусами, $[Ca^{2+}]$ = 1,3 ммоль/л; ** – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $p \leq 0{,}01$, $n$=3

Зростання швидкості поглинання кисню свідчить про інтенсифікацію процесів мітохондріального окиснення, адже дихання ізольованих панкреатичних ацинусів здебільшого мітохондріальне [3]. Отримані результати підтверджують залежність між процесом вивільнення $Ca^{2+}$ із депо ацинарних панкреацитів та інтенсифікацією споживання кисню за дії карбахоліну. Ми припускаємо, що причиною підсилення клітинного дихання може бути зростання $[Ca^{2+}]$ у цитозолі, що призводить, з однієї сторони, до транспортування $Ca^{2+}$ у мітохондрії [7], а з іншої – до активації АТФ-залежних процесів секреції [10].

Залишається нез'ясованим, щоправда, питання співвідношення вкладу вивільнення $Ca^{2+}$ із депо і депозалежного входу $Ca^{2+}$ у стимуляцію клітинного дихання за дії карбахоліну. Адже за фізіологічних умов обидва процеси відбуваються одночасно і супроводжуються зростанням $[Ca^{2+}]$ у цитозолі та мітохондріях. Тому для детальнішого з'ясування механізмів стимуляції дихання за дії карбахоліну необхідно провести додаткові дослідження.

**Висновки.** Отже, карбахолін у низькій концентрації (0,1 мкмоль/л) не впливає ні на мітохондріальне дихання, ні на вміст депонованого $Ca^{2+}$ у ацинарних панкреацитах, а у вищих (1 та 10 мкмоль/л) – зумовлює вивільнення депонованого $Ca^{2+}$ та зростання швидкості споживання кисню. Це свідчить на користь гіпотези, що вивільнення $Ca^{2+}$ з депо є причиною інтенсифікації дихання ацинарних панкреацитів за дії карбахоліну.

*Рекомендовано до друку комісією з біоетики*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Манько В.В.* Системи транспортування $Ca^{2+}$ у секреторних клітинах екзокринних залоз /В.В. Манько. – Л.: Львів. нац. ун-т ім. Івана Франка, 2011. – 271 с. 2. *Carpenter J.* New measurements of oxygen solubility in pure and natural water /J. Carpenter // Limnol. Oceanogr. – 1966. – Vol. 11. – P. 264–277. 3. *Manko B.* An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under *in situ* conditions / B. Manko, M. Klevets, V. Manko // Cell Biochem. Funct. – 2013. – Vol. 31(2). – P. 115–121. 4. *Mogami H.* Termination of cytosolic $Ca^{2+}$ signals: $Ca^{2+}$ reuptake into intracellular stores is regulated by the free $Ca^{2+}$ concentration in the store lumen / H. Mogami,

A. Tepikin, O. Petersen // EMBO J. – 1998. – Vol. 17. – P. 435–442. 5. *Odinokova I.* Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria / I. Odinokova, K.-F. Sung, O. Mareninova et al. // Gut. – 2009. – Vol. 58. – P. 431–442. 6. *Petersen C.* Different patterns of receptor-activated cytoplasmic $Ca^{2+}$ oscillations in single pancreatic acinar cells: dependence on receptor type, agonist concentration and intracellular $Ca^{2+}$ buffering / C. Petersen, E. Toescu, O. Petersen // EMBO J. – 1991. – Vol. 10. – P. 527–533. 7. *Voronina S.* Correlation of NADH and $Ca^{2+}$ signals in mouse pancreatic acinar cells / S. Voronina, T. Sukhomlin, P. Johnson et al. // J. Physiol. – 2002. – Vol. 539(1). – P. 41–52. 8. *Voronina S.* Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating $\Delta\Psi_m$ / S. Voronina, S. Barrow, O. Gerasimenko et al. // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279(26). – P. 27327–27338. 9. *Voronina S.* Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells / S. Voronina, S. Barrow, A. Simpson et al. // Gastroenterology. – 2010. – Vol. 138. – P. 1976–1987. 10. *Williams J.* Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini / J. Williams, M. Korc, R. Dormer // Am. J. Physiol. – 1978. – Vol. 235. – P. 517–524.

Стаття надійшла до редколегії 25.06.13

## *ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ СКОРОСТЬЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ДЫХАНИЯ И СОДЕРЖАНИЕМ ДЕПОНИРОВАННОГО $CA^{2+}$ В АЦИНАРНЫХ ПАНКРЕАЦИТАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ КАРБАХОЛИНА*

*Б.А. МАНЬКО, О.Ю. ВЕЛИКОПОЛЬСКА, М.Ю. КЛЕВЕЦ, В.В. МАНЬКО*
*Львовский национальный университет им. Ивана Франко*

Исследовано влияние карбахолина на содержание депонированного в панкреацитах $Ca^{2+}$ и скорость дыхания изолированных панкреатических ацинусов. Скорость потребления кислорода регистрировали с помощью электрода Кларка. Содержание депонированного $Ca^{2+}$ определяли по интенсивности флуоресценции $Ca^{2+}$-хлортетрациклинового комплекса. В концентрации 0,1 мкмоль/л карбахолин не влиял на изучаемые показатели. При использовании номинально безкальциевой среды, в отличие от $Ca^{2+}$-содержащей, карбахолин (1 и 10 мкмоль/л) снижал содержание депонированного $Ca^{2+}$ на 32,96 і 29,38 %. В $Ca^{2+}$-содержащей среде наблюдалось повышение скорости дыхания на 11,40 и 12,38% после инкубации с 1 и 10 мкмоль/л карбахолина. Эти данные подтверждают зависимость между высвобождением $Ca^{2+}$ из депо ацинарных панкреацитов и интенсификацией потребления кислорода под действием карбахолина.

**Ключевые слова:** ацинарные панкреациты, $Ca^{2+}$, клеточное дыхание, карбахолин.

## *RELATIONSHIP BETWEEN RESPIRATION RATE AND STORED $CA^{2+}$ CONTENT IN PANCREATIC ACINAR CELLS UNDER CARBACHOL ACTION*

*B. MANKO, O. VELYKOPOLSKA, M. KLEVETS, V. MANKO*
*Ivan Franko Lviv National University*

Investigation of the relationship between the processes of $Ca^{2+}$-signaling and mitochondrial oxidation of cells is an important problem of modern physiology. The reason for this is that the violation of these interdependencies might be the cause of various diseases, including acute pancreatitis. However, dependence of the rate of mitochondrial respiration on intensity of $Ca^{2+}$ release upon secretagogue action still was not investigated in pancreatic acinar cells. In this work, the influence of carbachol on stored $Ca^{2+}$ content in pancreatic acinar cells and respiratory rate of isolated pancreatic acini was studied. A suspension of isolated pancreatic acini was obtained using collagenase (type 4, 220 U/ml) by modified by Williams' method. Rate of oxygen consumption was studied using Clark electrode. The content of stored $Ca^{2+}$ was determined by fluorescence of $Ca^{2+}$-chlortetracycline complex. Carbachol at concentration of 0.1 mM had no effect on the studied parameters. It was found that upon using nominally $Ca^{2+}$-free medium carbachol (1 and 10 mM) decreased the content of stored $Ca^{2+}$ by 32.96 and 29.38%. However, in basic extracellular medium, containing 1.3 mM of $Ca^{2+}$, carbachol did not induce decrease of stored $Ca^{2+}$-content in pancreatic acinar cells. We suggest, that the process of store-operated $Ca^{2+}$-entry, which refilled cellular $Ca^{2+}$-stores in the course of $Ca^{2+}$-release upon

stimulation with carbachol, was functioning in $Ca^{2+}$-containing medium. After incubation with 1 and 10 mM of carbachol in $Ca^{2+}$-containing medium, an increase of respiration rate by 11.40 and 12.38% was observed. These data confirm the relationship between $Ca^{2+}$ release from stores of pancreatic acinar cells and intensification of oxygen consumption under carbachol action. We assume that the reason for amplification of cellular respiration is an increase of [$Ca^{2+}$] in the cytosol, which leads on the one hand, to transport of $Ca^{2+}$ into mitochondria, and the other – to the activation of ATP-dependent processes of secretion. The question of the role of $Ca^{2+}$-release from stores and store-operated $Ca^{2+}$ entry in stimulation of cell respiration by carbachol remains unresolved and requires further investigation.

**Key words:** pancreatic acinar cells, $Ca^{2+}$, cellular respiration, carbachol.