

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

На правах рукопису

ГРИЩУК ВІКТОР ПЕТРОВИЧ

МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ, ТРАНСПОРТ ТА
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИЙ РОЗПОДІЛ ІОНІВ КАЛІЮ В
ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ ДО І ПІСЛЯ ДІЇ
НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

0.3.00.22 - кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук

Харків - 1995

АВ 33.150

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України

А.М. Білоус

Науковий консультант: доктор біологічних наук

О.Ю. Петренко

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, ст. н. с.

Божков А.І.

кандидат біологічних наук

Гордієнко О.І.

Провідна установа:

Харківський державний
університет ім. О.М.Горького

Захист відбудеться "20" лютого 1996 р. в 13³⁰
годин на засіданні Спеціалізованої ради Д 50.21.01 при Інституті
проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук
України (310015, м. Харків, вул. Перемогівська, 23).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інститута
проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук
України

Автореферат розіслав "16" січня 1996 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00779405 (W)

А.М. Гольдман

Актуальність. Сучасний етап розвитку експериментальної кріобіології характеризується підвищеною увагою щодо досліджень мембранових структур, які багато в чому зумовлюють життєздатність клітин. Дослідження, проведені на ізольованих мітохондріях, виявили їх високу чутливість до заморожування-відігріву [Лемешко В.В., 1977, Петренко О.Ю., 1984] і здатність частково відновлювати функціональну активність за повернення до фізіологічних умов [Лемешко В.В., 1973, Петренко О.Ю., 1993, Racker E., 1972]. Проте, залишається мало вивченою реакція мітохондрій у складі клітин на дію низьких температур. Разом з тим, ізольовані клітини печінки (гепатоцити) в теперішній час знаходять усе більш широке застосування у біології та медицині [Маргуліс М.С., Ерухімов Е.А., 1985], що потребує розробки методів їх тривалого зберігання.

Для оцінювання ефективності кріоконсервування доцільно досліджувати такі інтегральні функції клітини як енергетичний стан та транспорт іонів, які багато в чому визначають спрямованість метаболічних процесів. Інтегральним показником енергетичної функції мітохондрій є наявність мембранового потенціалу (МП) на внутрішній мембрані, який править за рушійну силу при синтезі АТФ. Застосування електродів, селективних до потенціал-залежних ліпофільних катіонів, дозволяє за життя досліджувати величину і кінетику утворення потенціалу на цілій клітині. Наявність потенціалу на плазматичній мембрані, заданого електрохімічним градієнтом іонів калію [Graf et al, 1987, Fitz et al, 1989], приводить до накопичення частини потенціал-залежного заряду в цитоплазматичному компартменті клітин [Rugolo M., Lenaz G., 1987].

Виходячи з положення, що пошкодження мітохондрій може відігравати визначальну роль у зародку клітин [Masaki et al, 1989,

McGann et al, 1988, Volger et al, 1978], видається важливим вивчити взаємозв'язок мітохондріального МП - інтегрального показника стану енергетичної функції мітохондрій, плазматичного МП - показника інтактності плазматичної мембрани - та внутрішньоклітинного розподілу і транспорту K^+ - одного з головних осмотично активних компонентів клітин, який відіграє важливу роль у регуляції клітинного метаболізму [Baur et al, 1975, Howard L.D., Wondergem R., 1987].

Метою роботи було дослідження МП, транспорту та внутрішньоклітинного розподілу K^+ в ізольованих гепатоцитах щурів в залежності від умов виділення, інкубації та низькотемпературного впливу.

Конкретними завданнями стали:

1. Розробити методи визначення МП на плазматичній і мітохондріальній мембранах, а також транспорту та внутрішньоклітинного розподілу K^+ в ізольованих гепатоцитах щурів.

2. Дослідити вплив складу середовища виділення та інкубації гепатоцитів на МП, транспорт і внутрішньоклітинний розподіл K^+ .

3. Дослідити дію низьких температур на МП мітохондрій у складі свіжовиділеної та пермеабілізованої гепатоцитів, а також на транспорт та вміст іонів калію.

4. З'ясувати вплив умов заморожування та відігріву на життєдатність ізольованих гепатоцитів з метою розробки методу їх кріоконсервування і здійснити порівняльне вивчення свіжовиділених та кріоконсервованих гепатоцитів щурів.

Наукова новизна. Основні результати праці одержані вперше. Виявлено, що умови виділення та інкубації ізольованих гепатоцитів впливають на величини МП на мітохондріальній та плазматичній мембранах, внутрішньоклітинний розподіл та

транспорт K^+ , дихальну активність гепатоцитів. З'ясовано, що заміна внутрішньоклітинного середовища на цукрозне за умов пермеабілізації плазматичної мембрани сприяє частковому збереженню МП на внутрішній мембрані мітохондрій у складі гепатоцитів після дії низьких температур. Встановлено, що мітохондрії у складі гепатоцитів, підданих кріоконсервуванню за розробленим методом, здатні генерувати МП. Деконсервовані клітини характеризуються цілісною плазматичною мембраною, про що свідчить збереження на ній МП, та здатністю АТФ-залежно накопичувати K^+ для відновлення рівня внутрішньоклітинного калію. Виявлено, що збереження мітохондріального МП та матриксної концентрації K^+ є необхідною умовою підтримання життєздатності клітин.

Теоретичне та практичне значення. Загальнобіологічне значення мають одержані дані про регулюючий вплив екзогенних субстратів (як впродовж перфузії, так і під час інкубації) на величини МП та розподіл K^+ в ізольованих гепатоцитах. Теоретично значущими є результати про ушкоджуючу дію низьких температур на МП мітохондрій у складі клітин, що зумовлюється складом зовнішньомітохондріального середовища і що заміна внутрішньоклітинного середовища на цукрозне сприяє збереженню мітохондріального МП. Теоретичне значення мають дані про необхідність збереження мітохондріальної концентрації K^+ і, відповідно, мітохондріального МП для забезпечення життєдіяльності клітин. Практичне значення мають розроблені методи: 1) одночасного виміру різниці потенціалів на внутрішній мембрані мітохондрій у складі цілих клітин та на плазматичній мембрані з використанням ТФФ⁺-селективного електроду і 2) визначення під час одного виміру активності Na^+/K^+ -АТФази, провідимості плазматичної мембрани щодо K^+ та його концентрації в цитоплазмі та міто-

хондріальному матриксі. Практичне значення має також розробка методу кріоконсервування гепатоцитів, який захищено авторським свідоцтвом.

Основні положення, які виносяться на захист:

1. Введення екзогенних субстратів під час виділення та/або інкубації змінює метаболічний стан клітини, що відображається у зміні різниці потенціалів на плазматичній та мітохондріальній мембранах, транспорту та внутрішньоклітинного розподілу K^+ , а також дихальної активності гепатоцитів.

2. Розроблений метод кріоконсервування гепатоцитів дозволяє у значній мірі зберегти життєздатність, внутрішньоклітинний вміст K^+ та енергетичну функцію мітохондрій у складі клітин.

3. Задля збереження життєздатності та відновлення цитоплазматичної концентрації K^+ , яка зменшується після кріоконсервування, необхідні наявність різниці потенціалів на мітохондріальній мембрані та збереження матриксної концентрації K^+ .

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та дискутувалися на Всесоюзному симпозиумі "Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена" (Пуцдино, 1986), обласній конференції молодих вчених "Актуальные проблемы медицины и научно-технический прогресс" (Харьков, 1988), VI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 1992), II Міжнародній конференції "Успехи современной криобиологии" (Харьков, 1992), 30 Annual Meetings of Society for Cryobiology (USA, 1993), 31th Annual Meeting of Society for Cryobiology (Japan, 1994), I-ом съезде Белорусского общества фотобиологов и биофизиков (Минск, 1994), I національному з'їзді фармакологів України (Полтава, 1995), I з'їзді Українського товариства кріобіології і кріомедицини (Харків, 1995)

Публікації. По матеріалам дисертаційної роботи опубліковано 18 друкованих робіт.

Обсяг та структура роботи. Дисертація викладена на 150 сторінках машинописного тексту, складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, обговорення результатів та висновків, містить 10 таблиць та 24 малюнки. Список використаної літератури нараховує 279 найменувань.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Експерименти проводили на статевозрілих щурах лінії Вістар вагою тіла 200-300 г. За об'єкт дослідження брали свіжовиділені гепатоцити до і після кровоплизу. Ізольовані клітини печінки виділяли неферментативним [Петренко О.Ю. та ін., 1989] та колагеназним по Сеглену [Seglen P.O., 1976] методами. Життєздатність суспензії гепатоцитів визначали за виключенням вітального барвника трипанового синього [Seglen P.O., 1972]. Концентрацію клітин у суспензії визначали стандартною методикою з підрахуванням у камері Горяєва [Неменова Ю.М., 1972].

Пермеабілізовані гепатоцити отримували методом [Katz J., Wals P., 1985] з деякими модифікаціями.

Швидке заморожування-швидкий відігрів суспензії ізольованих гепатоцитів здійснювали у поліетиленових пробірках об'ємом 1 мл шляхом швидкого занурювання в рідкий азот (швидкість заморожування 300-400°C/хв). Відігрів проводили на водній бані при 38°C до 0-2°C (швидкість відігріву 400-500°C/хв).

Кріоконсервування клітин здійснювали шляхом швидкого двоступеневого заморожування до -196°C в присутності 10% ДМСО з зупинкою при -20°C та швидкого відігріву на водній бані при 38°C. Швидкості охолодження та відігріву контролювали за допомогою мідь-константанової термомпари.

Життєздатні гепатоцити відділяли від пошкоджених у градієнті щільності перколу як описано в роботі [Berry et al, 1983].

Дихальну активність ізольованих гепатоцитів вимірювали полярографічно в комірці об'ємом 1 мл при 26°C або 37°C за допомогою закритого платинового кисневого електроду Кларка на полярографі LP-7E.

Вміст АТФ в кислотному екстракті визначали за допомогою люциферин-люциферазного методу [Аттаулаханов Ф.І., Пічугін А.В., 1981] на біохемілюмінометрі ВХЛ-06.

Транспорт K^+ та його внутрішньоклітинний розподіл визначали за допомогою K^+ -селективного електроду (тип F2312K "Radiometer", Данія). Виміри проводили у термостатованій комірці об'ємом 5 мл при постійному перемішуванні. Активність Na^+/K^+ -АТФази поцінювали за різницею початкових швидкостей транспорту K^+ за відсутності та в присутності уабаіна (1 мМ).

Мембранний потенціал ($\Delta\psi$) досліджували по поглинанню ліпофільного катіону тетрафенілфосфонію ($TFFP^+$) за допомогою $TFFP^+$ -селективного електроду, виготовленого згідно [Kamo et al, 1979]. Виміри проводили у термостатованій комірці об'ємом 5 мл при перемішуванні.

Визначення об'єму внутрішньоклітинної води гепатоцитів проводили з 3H_2O та [^{14}C]-цукрозою при 37°C з центрифугуванням крізь силіконове масло. Внутрішньоклітинний об'єм розраховували відніманням цукрового об'єму захопленої зовнішньоклітинної рідини із загального тритісного об'єму води і коригували результати за відсотком життєздатних клітин, встановленим по виключенню трипанового синього.

Одержані результати оброблялися статистично за методом Ст'юдента-Фішера [Ашмарія Л.П. та ін., 1975] на ЕОМ ІВМ.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ

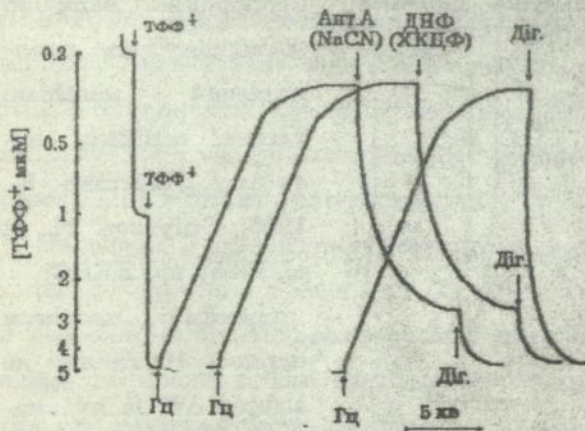
Найбільш перспективним напрямком для вивчення функції мітохондрій у складі інтактної клітини є визначення величини МП ($\Delta\Psi$). Відомо [Demura M. et al, 1985, Kamo N. et al, 1979, Rottenberg H, 1984, Waggoner A.S., 1985], що різні позитивно заряджені ліпофільні іони легко проникають через біологічні мембрани та розподіляються згідно з рівнянням Нернста.

Використовуючи розроблений нами метод, за допомогою іон-селективного електроду досліджували кінетику накопичення ліпофільного катіону тетрафенілфосфонію (TFF^+) ізольованими гепатоцитами щурів та його розподіл у клітинних компартментах і, на цій основі, визначали величини різниці потенціалів на мітохондріальній ($\Delta\Psi_{\text{міт}}$) та плазматичній ($\Delta\Psi_{\text{пл}}$) мембранах.

Гепатоцити, виділені неферментативним засобом без субстратів у середовищі

перфузії (н-клітини), досить швидко поглинають TFF^+ (Мал. 1). Внесення дигітоніну призводить до повного виходу TFF^+ у середовище інкубації, яке зміщує

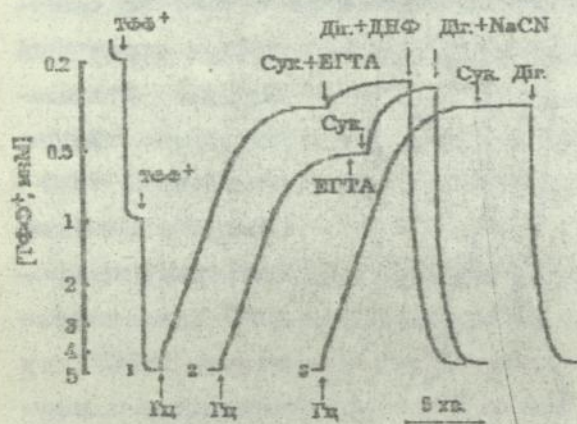
фізіологічну концентрацію Ca^{2+} . Це пов'язано з порушенням інтактності плазматичної мем-



Мал. 1. Вплив дигітоніну, інгібіторів та роз'єднувачів ОФ на накопичення TFF^+ гепатоцитами під час інкубації у середовищі Дюльбекка. Добавки: ДНФ - 50 мкМ, ХКЦФ - 1 мкМ, NaCN - 3 мМ, антимицин А (Ант. А) - 2 мкМ, дигітонін (Діг.) 40 мкг, гепатоцити (Гц) - 2×10^6 клітин. Температура виходу - 37°C.

брани [Katz J., Wals P., 1985], що веде до колапсу потенціалу на

плазматичній та мітохондріальній мембранах через роз'єднальну дію на мітохондрії Ca^{2+} , що проникає у клітини [Akerman K., 1978, McComas J., Denton R., 1988]. Інгібітори електрон-транспортного ланцюгу (дизанід, антимицин А) та роз'єднувачі окислювального фосфорилування (ОФ) - ДНФ або ХКЦФ - викликали неповне звільнення TFF^+ з клітин (мал. 1). Додавкa дигітоніну спричиняла додаткове звільнення TFF^+ . Повне зникнення потенціалу у відповідь на добавку дигітоніну свідчить, що у середовищі зовнішньоклітинного типу МП мітохондрій реєструється лише в інтактних гепатоцитах. Відмінність у дії роз'єднувачів і інгібіторів ОФ та дигітоніну обумовлена наявністю потенціалу на плазматичній мембрані ізольованих гепатоцитів. При цьому з великою мірою вірогідності можна вважати, що відношення концентрацій TFF^+ у цитоплазмі та середовищі інкубації



Мал. 2. Вплив сукцинату та ЕГТА на звільнення TFF^+ ізольованими гепатоцитами життєздатністю 80% (1 і 3) і 60% (2), які виділені неферментативним методом без субстратів у середовищі перфузії. Умови експерименту наведені в підписі до мал. 1. Добавки: сукцинат (Сук.) - 2 мМ, ЕГТА - 1 мМ.

пропорційно величині потенціалу на плазматичній мембрані клітин, оскільки виявлено [Akerman K., 1980, Gulyaeva N. et al., 1985], що ХКЦФ принаймні протягом перших 10 хвилин не змінює $\Delta\psi$ на плазматичній мембрані гепатоцитів і лимфоцитів. Зняття цього потенціалу досягається пошкодженням (пермеа-

білізацією) плазматичної мембрани дигітоніном.

Таким чином, вимірявши об'єм внутрішньоклітинної води, можна визначити внутрішньомітохондріальну та цитоплазматичну концентрації TFF^+ і обчислити, згідно з рівнянням Нернста, різницю потенціалів на плазматичній та мітохондріальній мембранах з урахуванням життєздатності суспензії гепатоцитів.

Про коректність цього підходу свідчать дані з сумісного та нарізного внесення мітохондріального субстрату сукцинату та хелатора Ca^{2+} EGTA (мал. 2). Сукцинат спричиняв дуже повільне накопичення TFF^+ . Внесення EGTA не впливало на розподіл ліпофільного катіону, а наступна добавка сукцинату веде до швидкого поглинання TFF^+ клітинами (мал. 2). При цьому гепатоцити з життєздатністю 60% (крива 2) накопичували меншу кількість TFF^+ , ніж з життєздатністю 80% (крива 1), а добавка сукцинату + EGTA призводила до більшого віддуку. Спостерегаємий ефект сумісного внесення в середовище інкубації EGTA та сукцинату відображає відновлення МП мітохондрій у складі клітин з порушеною плазматичною мембраною. Таким чином, в сольовому середовищі зовнішньоклітинного типу МП визначається лише в інтактних гепатоцитах.

Виходячи з наведених результатів, можна зробити висновок, що дослідження транспорту TFF^+ в ізольованих гепатоцитах дозволяє оцінити величину МП внутрішньоклітинних мітохондрій та плазматичної мембрани, а також одержати інформацію про життєздатність суспензії.

Відомо [Demura M. et al, 1985, Rottenberg H., 1984], що за потенціал-залежного накопичення TFF^+ частина ліпофільного катіону в клітинах знаходиться у зв'язаному стані, через це під час обчислень $\Delta\psi_{\text{пл}}$ та $\Delta\psi_{\text{міт}}$ робили корекцію стосовно внутрішньоклітинного зв'язування TFF^+ , як пропонують автори

роботи [Demura M. et al, 1985], а також щодо відсотку пошкоджених клітин, які забарвлюються трипановим синім.

Відсутність субстратів у середовищі перфузії може бути причиною вичерпання пулу ендогенних субстратів в ізолюваних гепатоцитах (н-клітини) і призводити до зміни величини $\Delta\psi$. В зв'язку з цим, були виділені неферментативним методом гепатоцити за допомогою середовищ, що вміщували глюкозу (г-клітини) та цитрат (ц-клітини), а для порівняння - ферментативним методом (ф-клітини). Н- і ф-клітини генерують потенціали на плазматичній і мітохондріальній мембранах однакової величини (табл. 1). Введення глюкози до середовища перфузії спричиняло зниження значень $\Delta\psi_{\text{пл}}$ на 26%, і $\Delta\psi_{\text{міт}}$ - на 19% (табл. 1). Биділення з цитратом не змінювало потенціал на плазматичній мембрані, але підвищувало на 13% $\Delta\psi_{\text{міт}}$.

Таблиця 1. Вплив складу середовища та способу виділення на величини різниці потенціалів (мВ) на плазматичній ($\Delta\psi_{\text{пл}}$) та мітохондріальній ($\Delta\psi_{\text{міт}}$) мембранах ізолюваних гепатоцитів за відсутності (контроль) та присутності сукцинату (дослід) у середовищі інкубації ($M \pm m$)

Засіб виділення	Контроль			Дослід		
	$\Delta\psi_{\text{пл}}$	$\Delta\psi_{\text{міт}}$	n	$\Delta\psi_{\text{пл}}$	$\Delta\psi_{\text{міт}}$	n
н-клітини	-31.8±0.9	-172.1±4.8	3	-38.7±1.1*	-172.5±3.4	4
г-клітини	-23.6±3.0	-139.8±6.6	6	-31.0±2.3* [♠]	-155.6±4.7*	11
ц-клітини	-28.7±2.8	-194.5±5.0	6	-37.9±2.3*	-168.2±5.7*	11
ф-клітини	-30.1±2.1	-171.6±11.9	7	-38.6±5.6*	-161.1±13.1	13

Середовище інкубації: Дюльбекко. Температура виміру - 37°C. Зміни достовірні: * - по відношенню до контролю ($P < 0.001$), ^ - по відношенню до ф-клітин у контролі ($P < 0.002$), [♠] - по відношенню до ф-клітин у досліді ($P < 0.001$)

Відомо, що транспорт глюкози через плазматичну мембрану сполучений з градієнтом Na^+ . Підвищення цитоплазматичної концентрації Na^+ внаслідок транспорту глюкози може бути причиною зниження плазматичного потенціалу, а зниження мітохондріального потенціалу, вочевидь, пов'язане з підвищенням концентрації АДФ через активацію натрійового насосу. Для мітохондріального субстрату цитрату не знайдено переносчиків на плазматичній мембрані, але можна вважати, що дія на $\Delta\Psi_{\text{міт}}$ пов'язана з його накопиченням в клітинах під час перфузії, бо у роботі [Петренко О.Ю., 1993] виявлено, що цитрат збільшує швидкість ендogenousого, а надто роз'єданого дихання, проникаючи крізь інтактну плазматичну мембрану. Цей результат узгоджується з отриманими даними щодо збільшення $\Delta\Psi_{\text{міт}}$ у ц-клітинах (табл. 1).

Можна припустити, що глюкоза і цитрат, накопичені клітинами під час перфузії, справляють різний вплив на МП мітохондрій тому, що для поновлення енергетичних витрат клітини глюкоза, головним чином, утилізується в реакціях гліколізу, тоді як цитрат є мітохондріальним субстратом циклу Кребса.

Присутність у середовищі інкубації зовнішньоклітинного типу мітохондріального субстрата сукцинату спричиняє підвищення $\Delta\Psi_{\text{ПЛ}}$ у всіх порівнюваних клітин (табл. 1). Не змінюючи мітохондріальний потенціал н- і ф-клітин, сукцинат справляє "ефект вирівнювання" на $\Delta\Psi_{\text{міт}}$ ц- і г-клітин, підвищуючи його величину до рівня ф-клітин.

Під час інкубації ізольованих гепатоцитів без сукцинату у середовищі внутрішньоклітинного типу (цукрозне середовище) величина $\Delta\Psi_{\text{міт}}$ не змінюється, а $\Delta\Psi_{\text{ПЛ}}$ при цьому знижується на 28% (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив складу середовища інкубації та сукцинату на величини $\Delta\psi_{\text{пл}}$ та $\Delta\psi_{\text{міт}}$ ізолюваних гепатоцитів ($M \pm m$)

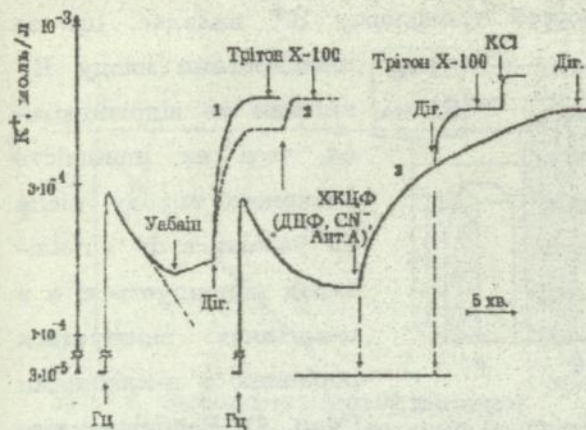
Зас. виділ.	Серед. інкубац.	$\Delta\psi_{\text{пл}}$ (мВ)	$\Delta\psi_{\text{міт}}$ (мВ)	сукцинат
г-клітини	Дюльбекко	-23.6±3.0 (6)	-139.8±6.6 (6)	-
г-клітини	цукрозне	-16.9±3.4 (6)	-133.7±6.8 (6)	-
г-клітини	"калійове"	1.7±0.9 (3)	-118.7±12.3 (3)	-
г-клітини	цукрозне	Н.В.	-144.4±10.2 (3)	-
ф-клітини	цукрозне	Н.В.	-173.9±2.3 (4)	+
г-клітини	цукрозне	Н.В.	-179.2±10.8 (3)	+
н-клітини	цукрозне	Н.В.	-171.8±8.3 (3)	+

Цукрозне і "калійове" середовища не містили Ca^{2+} . Температура інкубації - 37°C. Н.В. - $\Delta\psi_{\text{пл}}$ не визначали, бо дигітонін вносився в середовище інкубації до ХКЦФ. В дужках вказана кількість експериментів.

Отримане зниження $\Delta\psi_{\text{пл}}$ в цукрозному середовищі узгоджується з даними робіт [Henderson R.M. et al, 1987, Howard L.D., Wondergem R., 1987], в яких мікроелектродною технікою досліджували вплив заміни NaCl цукрозою на $\Delta\psi_{\text{пл}}$ ізолюваних гепатоцитів. Хоч механізм цього ефекту залишається не з'ясованим, можна вважати, що деполяризація може бути пов'язана зі зниженням калійової провідності плазматичної мембрани за цих умов [Fitz et al, 1989]. Інкубація гепатоцитів у "калійовому" середовищі спричиняла зниження $\Delta\psi_{\text{міт}}$ на 15%, і повне скидання $\Delta\psi_{\text{пл}}$ (табл. 2).

Під час пермеабілізації плазматичної мембрани дигітоніном у середовищі внутрішньоклітинного типу $\Delta\psi_{\text{міт}}$, генеруємий за рахунок ендогенних субстратів, не відрізняється від значень інтактних клітин, а в присутності сукцинату $\Delta\psi_{\text{міт}}$ перевищує такі ж значення для цілих клітин (табл. 2), які генерують потенціал на ендогенних субстратах.

Як видно з мал. 3, гепатоцити поглинають K^+ з цукрозного середовища, яке містило фізіологічну концентрацію Ca^{2+} (криві 1



Мал. 2. Вплив убаїну, дигітоніну, інгібіторів і роз'єднувачів ОФ на транспорт K^+ в ізольованих гепатоцитах. 1 і 3 - виміри у середовищі, яке містило 290 мМ цукрози, 1,2 мМ $CaCl_2$, 3 мМ $MgSO_4$, 2 мМ H_3PO_4 , 5 мМ трис-HEPES, рН 7,4. 2 - це ж середовище без Ca^{2+} . Добавки: убаїн - 1 мМ, ХКЦФ - 1 мкМ, ДДФ - 50 мкМ, антимицин А (Ант. А) - 2 мкг/мл, дигітонін (Діг.) - 40 мкг, тритон X-100 - 0,2%, гепатоцити (Гц) - 2×10^6 клітин.

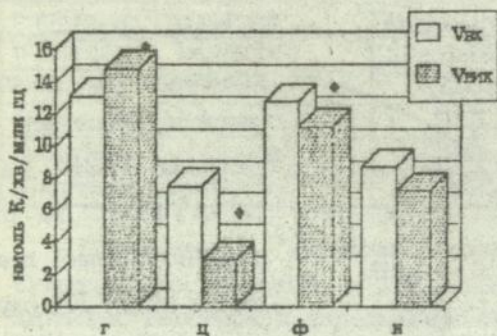
швидкості виходу K^+ (пунктирна лінія) і швидкості виходу після дії убаїну розраховували активність Na^+ - K^+ -АТФази. Дигітонін спричиняє швидкий вихід всього внутрішньоклітинного K^+ , внаслідок порушення цілісності плазматичної мембрани та роз'єднальної дії Ca^{2+} . Інгібітори та роз'єднувачі ОФ висликають повільний вихід K^+ з клітин, а дигітонін прискорює цей процес.

У безкальцієвому середовищі характер дії роз'єднувачів та інгібіторів ОФ не змінюється, тоді як дигітонін не призводить до повного виходу K^+ . Лише наступна добавка ХКЦФ або антимицину А забезпечує повний вихід (мал. 3, крива 2). Таким чином, використання дигітоніну у концентрації, яка пермеабілізує плазматичну мембрану, та наступної добавки мітохондріальних роз'єднувачів або інгібіторів дозволяє визначити внутрішньоклітинний

і 3). Дія на цей процес убаїну свідчить, що транспорт K^+ у клітини відбувається за рахунок роботи Na^+ - K^+ -АТФази. По різниці початкової швидкості входу K^+ (пунктирна лінія) і швидкості виходу після дії убаїну розраховували активність Na^+ - K^+ -АТФази. Дигітонін спричиняє швидкий вихід всього внутрішньоклітинного K^+ , внаслідок пору-

розподіл K^+ та розрахувати мітохондріальну та цитоплазматичну концентрації K^+ .

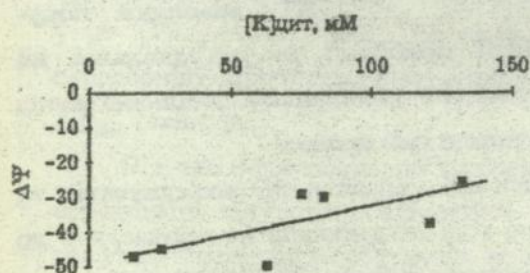
Порівняння швидкостей транспорту K^+ виявляє, що за



швидкостями входу K^+ клітини не відрізняються, тоді як швидкість пасивного виходу після дії уабаїна в ф- і г-клітинах підвищується, а в ц-клітинах знижується порівняно з н-клітинами (Мал. 4). Необхідно відзначити, що всі клітини характеризувалися високою концентрацією K^+ в мітохондріях, тоді як цитоплазматична кон-

Мал. 4. Швидкості накопичення ($V_{вх}$) і виходу ($V_{вих}$) K^+ під час інкубації ізолюваних гепатоцитів, виділених неферментативним без субстратів (н), в присутності глюкози (г) або цитрату (ц) і ферментативним (ф) методами. Умови вимірювань наведені в мал. 3. ♦- зміни достовірні по відношенню до н-клітин ($P < 0,05$).

центрація K^+ знижувалась у ряду: ф-, г-, н- і ц-клітини.

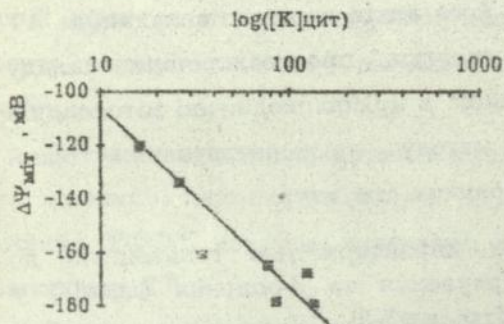


Мал. 5. Вплив цитоплазматичної концентрації K^+ ($[K]_{цит}$) на $\Delta\Psi$ плазматичної мембрани (мВ) гепатоцитів.

каналів, що, як відомо, призводить до підвищення потенціалу на плазматичній мембрані.

Зниження цитоплазматичної концентрації K^+ супроводжується гіперполяризацією плазматичної мембрани (Мал. 5). Можна вважати, що зниження цитозольної концентрації K^+ пов'язане з активацією K^+ -

Побудова у напівлогарифмічних координатах (Мал. 6) залежності цитоплазматичної концентрації K^+ від мітохондріального



Мал. 6. Залежність цитоплазматичної концентрації K^+ ($[K]_{\text{цит}}$) від величини потенціалу на внутрішній мембрані мітохондрій ($\Delta\Psi_{\text{міт}}$) в складі ізолюваних гепатоцитів у напівлогарифмічних координатах.

потенціалу показує, що критичне значення його величини визначається в зоні -100 мВ. Необхідно відмітити, що $\Delta\Psi_{\text{міт}}$ нижче цих значень не визначається. Спостерігається його скинення, яке супроводиться втратою внутрішньоклітинного K^+ .

Взаємозв'язок матричної концентрації K^+ та

потенціалу добре простежується на пермеабілізованих гепатоцитах до та після заморожування-відігріву. Швидке заморожування-швидкий відігрів (ШЗ-ШВ) без кріопротектору свіжовиділених гепатоцитів призводить до необоротних порушень незалежно від використаного середовища заморожування - сольового, цукрозного з Ca^{2+} або без Ca^{2+} . Пермеабілізовані гепатоцити після заморожування-відігріву в цукрозному середовищі внутрішньоклітинного типу здатні частково відновлювати енергетичні показники, однак потенціал, на відміну від контролю, був несталим і починав знижуватися.

Після ШЗ-ШВ змінюється і кінетика транспорту K^+ . Середовища заморожування різного складу (зовнішньоклітинного типу, цукрозне з Ca^{2+} , внутрішньоклітинного типу) не забезпечують збереження внутрішньоклітинного K^+ в ізолюваних гепатоцитах і спостерігається швидкий його вихід у середовище інкубації. При цьому ЖКЦФ не впливає на швидкість виходу K^+ , що свідчить

про пошкодження мітохондрій, а дигітонін незначно прискорює цей процес, що відображує порушення інтактності плазматичної мембрани. Пермеабілізовані гепатоцити після ШЗ-ШВ деякий час утримують матриксний K^+ і його вихід корелює з падінням $\Delta\psi$ міт. Отримані результати свідчать про важливість складу внутрішньоклітинного середовища в кріопошкодженні мітохондрій та необхідність розробки методу кріоконсервування, який забезпечить збереження мембранних структур.

Таблиця 3. Порівняльна характеристика гепатоцитів до (контроль) і після кріоконсервування та очищення (дослід) у градієнті щільності перколу (Mtm, n=3-9).

Досліджувані параметри	Контроль	Дослід	Зміна	P
$\Delta\psi_{\text{міт}}$, мВ	-161.1±13.1	-171.4±9.0	+6%	>0.1
$\Delta\psi_{\text{пл}}$, мВ	-38.6±5.6	-34.7±2.5	-10%	>0.1
Загальний вміст K^+ , нмоль/10 ⁶ клітин	551.2±37.2	197.2±57.0	-64%	<0.001
$[K^+]_{\text{міт}}$, мМ	127.7±11.9	120.3±37.4	-6%	>0.1
$[K^+]_{\text{цит}}$, мМ	97.1±8.1	18.3±8.5	-81%	<0.001
$V_{\text{вх}}$, нмоль K^+ /хв/10 ⁶ клітин	12.8±3.0	6.1±4.5	-52%	>0.1
$V_{\text{вих}}$, нмоль K^+ /хв/10 ⁶ клітин	11.2±1.8	4.9±0.9	-56%	<0.001
Активність K^+/Na^+ - АТФази, нмоль K^+ /хв/ 10 ⁶ клітин	24.0±3.6	10.9±5.5	-55%	<0.001

В зв'язку з цим був розроблений метод швидкого двоетапного заморожування під захистом ДМСО із гушпінкою в зоні -20°C – -25°C . Кріоконсервування призводило до зниження життєздатності на 26%. При цьому за загальним вмістом внутрішньоклітинного K^+ , його цитоплазматичної та мітохондріальної концентраціями та початковою швидкістю входу деконсервовані клітини не відрізнялись від контролю. Проте,

швидкість виходу K^+ зростала у 8, а активність Na^+/K^+ -АТФази - більш ніж у 4 рази. Швидкість ендogenousного дихання знижувалась на третину, а МП був несталим. Можна вважати, що такий ефект спричиняється присутністю в середовищі іскубації досить великого відсотку загиблих під час криоконсервування клітин.

Дійсно, очищення суспензії від пошкоджених клітин у градієнті щільності перколу приводить до відновлення кінетики накопичення TFF^+ до рівня контролю і незначної зміни кінетики транспорту K^+ .

Деконсервовані клітини генерують Ψ_{mit} і Ψ_{pld} на рівні контрольних (табл. 3). Разом з тим спостерігається зниження загального вмісту внутрішньоклітинного K^+ , яке чиниться за рахунок 5-кратного падіння цитоплазматичної концентрації, із збереженням мітохондріальної. При цьому швидкість виходу K^+ не змінюється, а швидкість виходу і активність Na^+/K^+ -АТФази зростає у 2 рази. Ці факти свідчать про важливість збереження функціональної активності мітохондрій для життєзабезпечення клітин.

ВИСНОВКИ

1. Вивчення розподілу ліпофільного катіону тетрафенілфосфонію за допомогою іон-селективного електроду дозволяє в одному зразку визначати величини потенціалів на внутрішній мембрані мітохондрій та плазматичній мембрані інтактних гепатоцитів.
2. Розроблено метод інгибіторного аналізу, який дозволяє за допомогою калій-селективного електроду в одному зразку клітин визначати активність Na^+/K^+ -АТФази, калійову провідність плазматичної мембрани та вміст K^+ в мітохондріальному та немітохондріальному компартментах ізольованих гепатоцитів.

ЛІБІ Ш. В. Стефанюк
АН України

3. Гепатозити, виділені ферментативним і неферментативним методами, відрізняються активностями Na^+/K^+ -АТФази, калійовою провідністю плазматичної мембрани, а також концентраціями K^+ в цитоплазматичному та мітохондріальному компартментах.

4. Величина мембранного потенціалу і внутрішньоклітинний розподіл іонів калію можуть регулюватися на етапі перфузії печінки під час виділення гепатоцитів і в перебігу подальшої інкубації клітин.

5. "Пермеабілізація" гепатоцитів, яка вкючає часову обробку низькими концентраціями дигітоніну, дозволяє одержати клітини з проникною плазматичною мембраною і мітохондріями, що мають високі біоенергетичні показники. Виявлене часткове відновлення функціональної активності мітохондрій після заморожування-відігріву пермеабілізованих гепатоцитів у цукрозному середовищі свідчить про роль внутрішньоклітинного середовища у кріопоншкодженні мітохондрій.

6. Метод кріоконсервування гепатоцитів під захистом 10% ДМСО, який вкючає швидке двоетапне заморожування із зупинкою в зоні $-20^\circ + -25^\circ\text{C}$, швидкий відігрів та відмивання кріопротектора середовищем, що містить 0.5 М цукрозу або глюкозу, дозволяє в значній мірі зберегти життєздатність суспензії.

7. Після кріоконсервування інтактні гепатозити зберігають МП та мітохондріальний, але не цитоплазматичний рівень K^+ . Збереження мітохондріями мембранного потенціалу та концентрації K^+ є обов'язковою умовою відновлення рівня калію в цитоплазмі гепатоцитів, що знизився під час виділення або кріоконсервування. Вміст K^+ в цитоплазмі збільшується під час інкубації деконсервованих клітин за рахунок убаїн-чутливого транспорту.

Список робіт, які опубліковані за темою дисертації

1. Грищук В.П., Петренко А.Ю. Распределение липофильного катиона тетрафенилфосфония в изолированных гепатоцитах крыс после замораживания-отогрева // Биохимические аспекты криоповреждения и криозащиты клеточных систем. - Харьков, 1989. - С. 98-103.
2. Петренко А.Ю., Грищук В.П. Влияние замораживания-отогрева под защитой диметилсульфоксида на сохранность изолированных гепатоцитов крыс // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. - Харьков, 1990. - С. 109-114.
3. Петренко А.Ю., Грищук В.П. Чувствительность к замораживанию-отогреву митохондрий в составе интактных и пермеабиллизированных гепатоцитов // Влияние охлаждения на биологические объекты. - Харьков, 1990. - С. 109-120.
4. Петренко А.Ю., Грищук В.П., Сукач А.Н., Росляков А.Д., Белоус А.М. Энергетическое состояние гепатоцитов сытых крыс, выделенных с помощью ЭДТА и вибрации // Биохимия. - 1989. - 54, N 12. - С. 1952-1955.
5. Петренко А.Ю., Грищук В.П. Определение активности Na,K-АТФазы и субклеточного распределения ионов калия в свежевыделенных гепатоцитах // Цитология. - 1990. - 32, N 9. - С. 944-945.
6. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P., Roslyakov A.D., Mazur S.P., Belous A.M. Survival, metabolic activity and transport of potassium ions of rat hepatocytes after rapid freeze-thawing under protection of dimethylsulfoxide and separation in Percoll density gradient // Cryo-Letters. - 1992. - 13. - P. 87-98.
7. Петренко А.Ю., Грищук В.П., Росляков А.Д., Мазур С.П. Способ консервирования гепатоцитов. // Авторское свидетельство N 1813451, 1992.

8. Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P., Mazur S.P., Roslyakov A.D. Separation of intact and damaged hepatocytes in sucrose following non-enzymatic liver perfusion // *Cytotechnology*. - 1995. - 17. - P.127 - 131.
9. Petrenko A.Yu., Sukach A.N., Grischuk V.P., Mazur S.P., Roslyakov A.D. Simultaneous isolation of intact and permeabilized rat hepatocytes // *School of Fundamental Medicine Journal*.- Kharkov: Osnova, 1995.- № 1. - P. 14-17.
10. Грищук В.П., Жегунов Г.Ф., Гулевский А.К. Свойства ионных насосов различных тканей гетеротермных животных" // Всесоюзный симпозиум "Обмен веществ при зимней спячке и естественном сне". Тезисы докладов. - Махачкала, 1985. - С. 86.
11. Грищук В.П. Использование тетрафенилфосфоний-селективного электрода для определения мембранного потенциала в изолированных паренхиматозных клетках печени (гепатоцитах) // "Актуальные проблемы медицины и научнотехнический прогресс". Тезисы докладов. - Харьков, 1988. - С. 23.
12. Петренко О.Ю., Сукач О.М., Мазур С.П., Росляков А.Д., Грищук В.П. Модифікація клітинного метаболізму на етапі виділення гепатоцитів // VI-й Український біохімічний з'їзд. Тези доповідей. Ч. 1. - К., 1992. - С. 219.
13. Грищук В.П., Петренко А.Ю., Мазур С.П., Росляков А.Д. Функции гепатоцитов после быстрого двухэтапного замораживания и отогрева под защитой ДМСО // "Успехи современной криобиологии". II Международная конференция. Тезисы - Харьков, 1992. - С. 108-109.
14. Petrenko A.Yu., Roslyakov A.D., Grishchuk V.P., Mazur S.P. Factors affecting the functions of cryopreserved rat hepatocytes during incubation // 30th Annual Meeting of Society for Cryobiology. - USA, New York, 1993. - P. 25-26.

15. Petrenko A.Yu., Grishchuk V.P., Roslyakov A.D., Mazur S.P. Function of mitochondria in cryopreserved hepatocytes // 31th Annual Meeting of Society for Cryobiology. - Japan, Kyoto, 1994. - P. 133.
16. Грицук В.П., Петренко А.Ю. Мембранний потенціал, транспорт и внутриклеточное распределение ионов калия в изолированных гепатоцитах // I-й съезд Белорусского общества фотобиологов и биофизиков. Тезисы докладов. - Минск, 1994. - С.38.
17. Петренко О.Ю., Мазур С.П., Росляков А.Д., Грицук В.П. Модуляція специфічних і інтегральних функцій в ізольованих гепатоцитах // 1 з'їзд Українського товариства кріобіології і кріомедицини. Тези доповідей. - Харків, 1995. - С. 197-198.
18. Петренко О.Ю., Сукач О.М., Мазур С.П., Грицук В.П., Росляков А.Д. Ізольовані гепатоцити - модель для вивчення механізму дії лікарських препаратів // 1 національний з'їзд фармакологів України. Тези доповідей. - Полтава, 1995. - С. 129.

Грицук В.П. "Мембранний потенціал, транспорт и внутриклеточное распределение ионов калия в изолированных гепатоцитах крыс до и после действия низких температур". Рукопись. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.22 - кріобіологія. Інститут проблем кріобіології и кріомедицини НАН України, Харків, 1995.

Защищается 17 научных работ и 1 авторское свидетельство. С помощью разработанных методов определения разницы потенциалов на митохондриальной и плазматической мембранах изолированных гепатоцитов крыс, а также регистрации кинетики транспорта и внутриклеточного распределения K^+ было проведено исследование зависимости указанных параметров от усло-

вий выделения, инкубации и низкотемпературного воздействия. Обнаружено, что условия выделения и инкубации изолированных гепатоцитов оказывают существенное влияние на величины потенциалов митохондриальных и плазматических мембран, внутриклеточное распределение и кинетику транспорта K^+ , а также дыхательную активность гепатоцитов. Согласно полученным данным, повреждающее действие низких температур на митохондрии в составе клеток определяется составом внутриклеточной (внемитохондриальной) среды. С учетом полученных данных разработан метод быстрого двухэтапного криоконсервирования изолированных гепатоцитов крыс под защитой ДМСО. Обнаружено, что сохранение функциональной активности митохондрий и митохондриальной концентрации K^+ является необходимым условием сохранения жизнеспособности клеток после криоконсервирования.

Grishchuk V.P. "Membrane potential, transport and intracellular distribution of potassium ions in isolated rat hepatocytes before and after affecting of low temperatures". Thesis of the Candidate of Biological Science with the speciality in cryobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Science of the Ukraine, Kharkov, 1995.

It have been 17 scientific papers and 1 personal certificate. On the basis of designed methods of determining of potential differences on mitochondrial and plasma membranes of isolated rat hepatocytes and registration of transport kinetics and intracellular distribution of potassium ions the dependence of mentioned characteristics on isolation and incubation conditions and low temperature influence on these parameteres has been studied. It has been shown that the conditions of isolation and incubation play substantial role in the preservation of mitochondrial and plasma membrane

potential values, intracellular distribution of potassium ions and hepatocyte respiratory activity. According to obtained data the injurious influence of low temperatures is determined by the composition of intracellular extramitochondrial medium. Taking in attention of obtained data the method of fast two-step cryopreservation of isolated rat hepatocytes with using of DMSO as a cryoprotector has been designed. It has been shown, that the preservation of functional activity of mitochondria and intramitochondrial potassium ion concentration is a essential condition of cell survival after the cryopreservation.

•

Ключові слова: гепатоцит, інкубація, плазматична та внутрішня мітохондріальна мембрани, мембранний потенціал, іони калію, транспорт, внутрішньоклітинна концентрація, низькотемпературне консервування.

4531014

AB 33.750