



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71234** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**C12N 5/02** (2006.01)  
**G01N 33/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2011 14671</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Манько Богдан Олексійович (UA),</b> <b>Манько Володимир Васильович (UA),</b> <b>Клевець Мирон Юрійович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>12.12.2011</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.07.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ</b> <b>УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА,</b> вул. Університетська, 1, м. Львів, 79000, Україна (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.07.2012, Бюл.№ 13</b>	

**(54) СПОСІБ ДОСЛІДЖЕННЯ ДИХАННЯ МІТОХОНДРІЙ АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ IN SITU**

**(57) Реферат:**

Спосіб дослідження дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози in situ, за яким отримують суспензію ізольованих ацинусів підшлункової залози, замінюють середовище виділення на середовище інкубації, пермеабілізують плазматичну мембрану клітин неіонним детергентом - дигітоніном, контролюють ступінь проникності плазматичної мембрани і полярографічно реєструють швидкість поглинання кисню. Як основний осмотичний компонент середовища інкубації використовують сахарозу.

**UA 71234 U**



Корисна модель належить до галузі біології, а саме клітинної фізіології та може бути використана для дослідження процесів мітохондріального окислення ацинарних клітин в умовах, максимально наближених до фізіологічних.

Відомий спосіб дослідження дихання пермеабілізованих волокон скелетних м'язів із застосуванням детергентів сапоніну чи дигітоніну (Saks V. A. et al. *Permeabilised cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo* // *Mol. Cell. Biochem.*-1998. - Vol. 184. - P. 81-100). Пермеабілізація здійснюється для забезпечення проникнення екзогенних модифікаторів мітохондріального дихання, які не проникають крізь цілісну плазматичну мембрану. Ними можуть бути субстрати чи регулятори ферментів циклу Кребса, аденілові нуклеотиди, інгібітори комплексів дихального ланцюга тощо. Цей спосіб дає змогу зберегти взаємозв'язки між мітохондріальним диханням та іншими клітинними процесами.

Недоліком способу є відсутність системного підходу до визначення оптимальної концентрації детергенту, оскільки у недостатніх концентраціях дигітонін пермеабілізує плазматичну мембрану не всіх клітин, а у надмірних - може ушкоджувати мембрани мітохондрій і ендоплазматичного ретикулулу (Cook G. A. et al. *Structural changes of isolated hepatocytes during treatment with digitonin* // *Biochim. Biophys. Acta.*-1983. - Vol. 763. - P. 356-367).

Найближчим за технічною суттю - прототипом - є "Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ*" (Патент UA 60528 Манько В. В., Манько Б. О., Мерлавський В. М., Великопольська О. Ю. Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ*). За цим способом отримують суспензію ізольованих клітин, замінюють середовище виділення на середовище інкубації, близьке за іонним складом до цитозолу, після чого пермеабілізують плазматичну мембрану клітин неіонним детергентом - дигітоніном. При цьому пермеабілізацію здійснюють оптимальною кількістю детергенту, яка знаходиться у сталому співвідношенні з кількістю досліджуваних клітин, яке для кожної тканини і для кожного типу клітин визначають емпірично. Опісля контролюють ступінь проникності плазматичної мембрани і полярографічно реєструють швидкість поглинання кисню.

Недоліком способу є низький ступінь спряження між процесами дихання та окисного фосфорилування, що є наслідком використання середовища із високою концентрацією  $\text{Cl}^-$ .

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб дослідження дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози *in situ* шляхом використання оптимального середовища інкубації, що дасть змогу підвищити ступінь наближеності умов досліду до фізіологічних та досягнути кращого спряження між диханням і окисним фосфорилуванням.

Поставлена задача вирішується так, що у способі дослідження дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози *in situ*, за яким отримують суспензію ізольованих ацинусів підшлункової залози, замінюють середовище виділення на середовище інкубації, пермеабілізують плазматичну мембрану клітин неіонним детергентом - дигітоніном, контролюють ступінь проникності плазматичної мембрани і полярографічно реєструють швидкість поглинання кисню, де як основний осмотичний компонент середовища інкубації використовують сахарозу.

При дослідженні дихання ізольованих мітохондрій різних тканин, в тому числі й підшлункової залози, здебільшого використовують середовища, основним осмотичним компонентом яких є сахароза (Wilson J. S., Korsten M. A. and Lieber C. S. *The isolation and properties of mitochondria from rat pancreas* // *Biochem. and Biophys. Research Communications.*-1984. - Vol. 121, № 2. - P. 545-551). Натомість, пермеабілізовані ацинарні панкреати зазвичай інкубують у сольових середовищах з основним компонентом KCl, а концентрація  $\text{Cl}^-$  становить, в середньому, 150 ммоль/л (Krause E., Gobel A., Schulz I. *Cell side-specific sensitivities of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores for inositol 1,4,5-trisphosphate, cyclic ADP-ribose, and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate in permeabilized pancreatic acinar cells from mouse* // *J Biol. Chem.*-2002. - Vol. 277, № 14.- P. 11696-11702; Gerasimenko Yu., Lura G., Sherwood M. W. et al. *Pancreatic protease activation by alcohol metabolite depends on  $\text{Ca}^{2+}$  release via acid store  $\text{IP}_3$  receptors* // *PNAS*-2009. - Vol. 106, № 26. - P. 10758-10763). Це значно більше, ніж  $[\text{Cl}^-]$  у цитозолі ацинарних клітин підшлункової залози в стані спокою, що становить, за різними даними, 19 ммоль/кг мокрої ваги (Sasaki S., Nakagaki I., Hori S., Kondo H. *Changes in element concentrations induced by agonist in pig pancreatic acinar cells* // *Pflügers Archiv Europ. J. of Physiol.*-1996. - Vol. 432, № 3. - P. 538-545), 65 ммоль/л (Zhao H., Muallem Sh.  *$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$  transport in resting pancreatic acinar cells* // *J. Gen. Physiol.*-1995. - Vol. 106. - P. 1225-1242), або  $53,7 \pm 5$  ммоль/л (Preissler M., Williams J. A. *Pancreatic acinar cell function: measurement of intracellular ions and pH and their relation to secretion* // *J. Physiol.*-1981 - Vol. 321. - P. 437-448). Підвищена концентрація  $\text{Cl}^-$  створює неадекватні умови для перебігу фізіологічних процесів та негативно впливає на мітохондріальні окисні процеси. Доведено, що мітохондрії, ізольовані у середовищі з KCl, мають нижчий вміст кардіоліпіну, нижчий рівень спряження між

диханням та окисним фосфорилуванням та схильні до патологічного набрякання (Hogeboom G. H., Schneider W. C., Palade G. E. Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material // J. Biol. Chem.-1948. - Vol. 172. - P. 619-635; Corcelli A., Saponetti M. S., Zaccagnino P., Lopalco P., Mastrodonato M., Liquori G. E., Lorusso M. Mitochondria isolated in nearly isotonic KCl buffer: Focus on cardiolipin and organelle morphology // Biochimica et Biophysica Acta.-2010. - Vol. 1798. - P. 681-687). Використання сахарози, на відміну від KCl, дозволяє уникнути негативного впливу високої концентрації Cl<sup>-</sup>.

Автори корисної моделі вперше запропонували використовувати сахарозу як основний компонент середовища інкубації при дослідженні дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози *in situ*. Це дало змогу наблизити умови досліду до фізіологічних умов та досягнути кращого спряження між диханням і окисним фосфорилуванням.

Фіг. 1. Вплив середовища інкубації на кінетику поглинання кисню пермеабілізованими ацинарними панкреатитами за окислення сукцинату у середовищі з KCl (□) або з сахарозою (■) за умов: 1 - дихання інтактних клітин, 2 - додано дигітонін, 3 - додано сукцинат, 4 - додано 0,1 ммоль/л АДФ, 5 - додано 0,5 ммоль/л АДФ, 6 - додано 1 ммоль/л АДФ, 7 - додано олігоміцин, 8 - додано TTFA; де:

\* - статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім показником у межах однієї дослідної групи ( $P \leq 0,05$ );

\*\* - статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім показником у межах однієї дослідної групи ( $P \leq 0,01$ );

\*\*\* - статистично вірогідна різниця порівняно з попереднім показником у межах однієї дослідної групи ( $P \leq 0,001$ );

# - статистично вірогідна різниця порівняно із аналогічним показником за використання середовища із KCl ( $P \leq 0,05$ );

## - статистично вірогідна різниця порівняно із аналогічним показником за використання середовища із KCl ( $P \leq 0,01$ ).

Фіг. 2. Вплив середовища інкубації на кінетику поглинання кисню пермеабілізованими ацинарними панкреатитами за окислення суміші малату з піруватом у середовищі з KCl (□) або з сахарозою (■) за умов: 1 - дихання інтактних клітин, 2 - додано дигітонін, 3 - додано піруват і малат, 4 - додано 0,1 ммоль/л АДФ, 5 - додано 0,5 ммоль/л АДФ, 6 - додано 1 ммоль/л АДФ, 7 - додано олігоміцин, 8 - додано ротенон; де умовні позначення як на Фіг. 1.

Запропонований спосіб здійснюється так.

Дослідження проводять на суспензії ізольованих панкреатичних ацинусів щурів, яку отримують способом Вільямса (Williams J. A., Korc M., Dormer R. L. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini // Am. J. Physiol.-1978. - Vol. 235, № 5. - P. 517-24). Ацинуси ізолюють у середовищі виділення, що має такий склад, ммоль/л: NaCl - 140,0; KCl - 4,7; CaCl<sub>2</sub> - 1,3; MgCl<sub>2</sub> - 1,0; HEPES - 10,0; глюкоза - 10,0; pH 7,4. Крім того, середовище містить бичачий сироватковий альбумін (2,5 мг/мл) та соєвий інгібітор трипсину (0,1 мг/мл). Для перевірки цілісності плазматичних мембран клітини фарбують 0,1 % розчином трипанового синього. Кількість клітин з цілісними плазматичними мембранами повинна становити не менше 95 %. Підрахунок ацинарних панкреатитів здійснюють за допомогою камери Горяєва.

Суспензію ізольованих ацинусів центрифугують, надосадову рідину замінюють на середовище інкубації пермеабілізованих ацинарних панкреатитів, що містить, ммоль/л: сахароза - 250,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2,0; MgCl<sub>2</sub> - 1,0; EGTA - 1,0; CaCl<sub>2</sub> - 0,28 (концентрація вільного Ca<sup>2+</sup> - 100 нмоль/л); HEPES - 10,0; соєвий інгібітор трипсину - 0,1 мг/мл; pH 7,2. Швидкість поглинання кисню визначають полярографічним методом. Величину дифузного струму реєструють за допомогою полярографічної установки, зібраної на базі закритого електрода Кларка, полярографа YSI 5300, самописця КСП-4, магнітної мішалки для розмішування суспензії та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл. Температура інкубації становить 37 °C. Після внесення клітин у полярографічну комірку під час реєстрації поглинання кисню по чергову додають наступні речовини: дигітонін у концентрації 50 мкг у розрахунок на 10<sup>6</sup> клітин, субстрат ФАД-залежної дегідрогенази сукцинат 5 ммоль/л або суміш субстратів НАД-залежних дегідрогеназ піруват і малат по 5 ммоль/л, АДФ у зростаючих концентраціях 0,1, 0,5 і 1 ммоль/л, блокатор H<sup>+</sup>-АТФ-синтази олігоміцин 6 мкмоль/л та блокатор комплексів дихального ланцюга ротенон 10 мкмоль/л або теноїлтрифлуорацетон (TTFA) 20 мкмоль/л. Значення коефіцієнтів дихального контролю розраховують як відношення швидкості дихання, стимульованого субстратами, і АДФ до швидкості дихання, заблокованого олігоміцином.

Необхідні статистичні розрахунки проводять за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм Microsoft Office Excel.

Переваги способу можна продемонструвати на такому прикладі.

5 Як альтернативу до запропонованого середовища інкубації використовували KCl-вмісне середовище такого складу, ммоль/л: KCl - 127,0; NaCl - 20,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 2,0;  $\text{MgCl}_2$  - 1,0; EGTA - 1,0;  $\text{CaCl}_2$  - 0,28 (концентрація вільного  $\text{Ca}^{2+}$  - 100 нмоль/л); HEPES - 10,0; соєвий інгібітор трипсину - 0,1 мг/мл; pH 7,2.

10 Дихання інтактних ацинарних панкреатитів складало  $0,20 \pm 0,0021$  нг-ат. О / (с\*млн клітин) у середовищі з KCl і не відрізнялось від дихання у середовищі із сахарозою (n=5). Пермеабілізація плазматичної мембрани дигітоніном супроводжувалась заміною іонного складу цитозолу та виходом розчинних цитозольних факторів із клітин, що й приводило до статистично вірогідного зниження швидкості дихання вже через 3-5 хв. після внесення дигітоніну (Фіг. 1, 2, n=5,  $P \leq 0,001$ ).

15 Далі у комірку вносили сукцинат (Фіг. 1) або суміш малату з піруватом (Фіг. 2), які статистично вірогідно підвищували швидкість дихання (n=5,  $P \leq 0,01$ ). При цьому, швидкість дихання, стимульованого субстратами, не залежала від складу середовища. АДФ не стимулював дихання ні у низьких, ні у високих концентраціях (Фіг. 1, 2, n=5). Це свідчить або про наявність високих його ендогенних запасів, або про порушення спряження між диханням і окисним фосфорилуванням.

20 Для перевірки цих гіпотез вносили блокатор  $\text{H}^+$ -АТФ-синтази олігоміцин. Олігоміцин значно сильніше пригнічує дихання пермеабілізованих панкреатитів у середовищі зі сахарозою, ніж з KCl як за окислення сукцинату (Фіг. 1, n=5,  $P \leq 0,01$ ), так і суміші малату з піруватом (Фіг. 2, n=5,  $P \leq 0,01$ ). Це підтверджує гіпотезу про високий рівень ендогенного АДФ у пермеабілізованих клітинах та свідчить про краще спряження між диханням і окисним фосфорилуванням за використання сахарози. За окислення сукцинату при застосуванні середовища із KCl коефіцієнт дихального контролю становив  $1,51 \pm 0,14$ , а при застосуванні середовища зі сахарозою -  $3,52 \pm 0,80$  (n=5,  $P \leq 0,05$ ). Аналогічно, за окислення НАД-залежних субстратів коефіцієнт дихального контролю становив  $1,34 \pm 0,15$  і  $2,58 \pm 0,18$  за відповідних середовищ (n=5,  $P \leq 0,001$ ). Після подальшого внесення у полярографічну комірку TTFA на фоні сукцинату (Фіг. 1) або ротенону на фоні пірувату і малату (Фіг. 2) швидкість дихання у всіх дослідних пробах знизилась практично до нуля ( $P \leq 0,05$ , n=5). Це ще раз підтверджує інтактність НАД-залежних та ФАД-залежних шляхів окислення та свідчить про мінорний вклад мітохондріального дихання у досліджені показники швидкості поглинання кисню за умов *in situ*.

35 Дисперсія даних була значно меншою для дослідних проб у середовищі із сахарозою: статистично вірогідна різниця дисперсій за Фішером за окислення сукцинату ( $P \leq 0,05$ ) і за окислення суміші малату з піруватом після додавання олігоміцину ( $P \leq 0,01$ ). Оскільки при використанні сахарози як основного осмотичного компонента середовища інкубації пермеабілізованих ацинарних панкреатитів спостерігається краща відтворюваність даних та вищий ступінь спряженості між процесами дихання та окисного фосфорилування, то їх мітохондрії перебувають у кращому фізіологічному стані, ніж при застосуванні KCl.

40 Запропонований спосіб дає змогу розв'язати поставлене технічне завдання, а саме підвищити ступінь наближеності умов дослідження дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози *in situ* до фізіологічних та досягнути кращого спряження між диханням і окисним фосфорилуванням.

45

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб дослідження дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози *in situ*, за яким отримують суспензію ізольованих ацинусів підшлункової залози, замінюють середовище виділення на середовище інкубації, пермеабілізують плазматичну мембрану клітин неіонним детергентом - дигітоніном, контролюють ступінь проникності плазматичної мембрани і полярографічно реєструють швидкість поглинання кисню, який **відрізняється** тим, що як основний осмотичний компонент середовища інкубації використовують сахарозу.

50

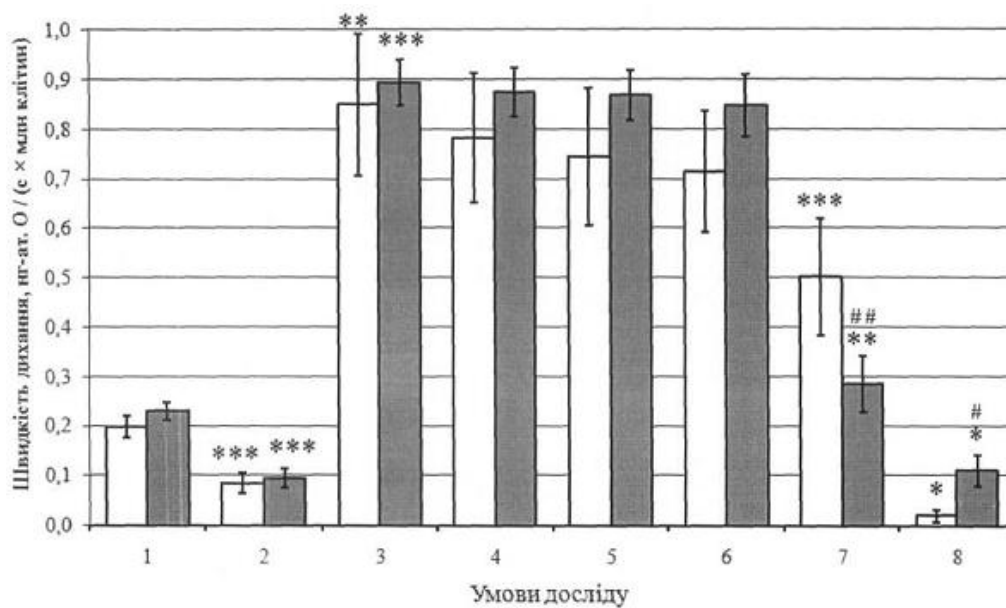


Fig. 1

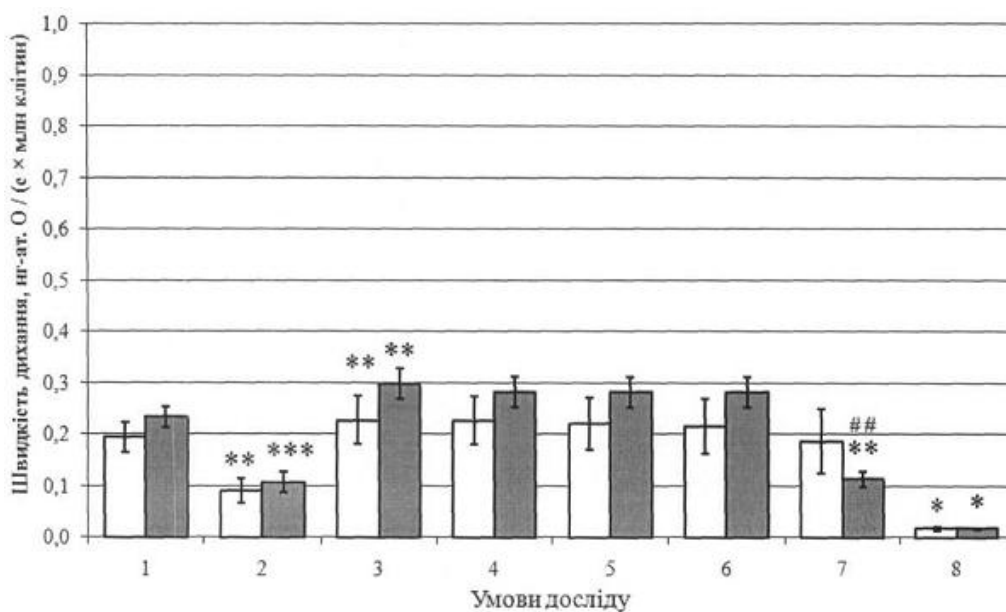


Fig. 2

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601