

НАЦІОНАЛНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О.В. ПАЛЛАДИНА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАНЬКО БОГДАН ОЛЕКСІЙОВИЧ

УДК 576.311.347 : [612.34+612.35]

**АДАПТАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МІТОХОНДРІЙ АЦИНАРНИХ КЛІТИН
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ**

03.00.04 – біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Б.О. Манько

Науковий консультант:
Бабський Андрій Мирославович,
доктор біологічних наук, професор

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Манько Б.О. Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів щурів – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2025.

Дисертація присвячена дослідженню адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів щурів за фізіологічних і патологічних умов, зокрема за різних умов енергетичного забезпечення, впливу холецистокініну, етанолу й різних раціонів харчування. Показано, що мітохондрії цих клітин здатні адаптуватись до фізіологічних та патологічних стимулів.

У ході виконання роботи було розроблено алгоритми і програмні пакети для аналізу даних записів споживання кисню та флуоресцентних фотографій клітин. Ці алгоритми дали змогу значно прискорити аналіз, водночас забезпечивши високу його точність та неупередженість.

Встановлено, що на моделі ізольованих клітин здатність мітохондрій адаптуватись до підвищення енергетичних потреб клітини можна охарактеризувати за швидкістю та стабільністю їх роз'єданого дихання. Максимальна швидкість відображає короточасну здатність мітохондрій окиснювати наявний пул ендогенних субстратів, а стабільність залежить від швидкості транспортування і метаболізму екзогенних субстратів. В ацинарних клітинах підшлункової залози найвища адаптаційна здатність мітохондрій проявляється за комбінації глюкози з піруватом і глутаміном, тоді як у гепатоцитах – за окиснення пірувату або монометилсукцинату.

Охарактеризовано вплив первинних агоністів ацетилхоліну, холецистокініну та інсуліну на адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів щурів. За цих умов змінювалась лише максимальна

швидкість, але не стабільність роз'єданого дихання. Показано, що за дії ацетилхоліну і холецистокініну ключовою є інтенсифікація окиснення пірувату, а інсулін посилює катаболізм глюкози.

Запропоновано використовувати стабільність роз'єданого дихання як новий функціональний критерій життєздатності клітин. Показано, що у ацинарних клітинах підшлункової залози стабільність дихання знижується із зростанням частки клітин з ушкодженою плазматичною мембраною. Крім того, за умов виділення гепатоцитів методом перфузії печінки *in situ* стабільність протонофор-стимульованого дихання була значно вищою, ніж за *in vitro* перфузії.

Досліджено, що брак достатнього забезпечення субстратами окиснення *in vitro* робить ацинарні клітини вразливими до некротичних процесів за дії помірної концентрації етанолу у комбінації з холецистокініном, чого не спостерігали за наявності пірувату чи глутаміну. За короточасного впливу холецистокініну і етанолу *in vivo* відбувається зниження швидкості дихання ацинарних клітин та індукція блебінгу, але не некроз. У плазмі крові щурів з експериментальним аргінін-індукованим гострим панкреатитом знижувався рівень замінних і незамінних амінокислот, а після введення пірувату натрію цим тваринам концентрація амінокислот була ближчою до контрольних значень.

Проведено скринінг амінокислот, які б могли бути безпечним додатковим джерелом енергії для ацинарних клітин підшлункової залози. Мітохондрії ацинарних клітини підшлункової залози здатні окиснювати глутамін, глутамат, аланін, лізин і аспартат, але не аспарагін, гістидин чи аргінін. Лізин, аргінін і глутамін у високих концентраціях спричиняють некроз ізольованих панкреатичних ацинусів.

Вдосконалено метод пермеабілізації плазматичної мембрани гепатоцитів дигітоніном, встановивши оптимальне співвідношення кількості дигітоніну і кількості клітин. Виявлено, що у пермеабілізованих гепатоцитах активація мітохондріальної пори перехідної провідності йонами Ca^{2+} призводить до

пригнічення окисного фосфорилування та швидкості, але не стабільності, максимального роз'єднаного дихання

Досліджено вплив етанолу *in vitro* й *in vivo* на мітохондріальне дихання гепатоцитів і ацинарних панкреатитів. Етанол *in vitro* здатний стимулювати базальне дихання гепатоцитів завдяки метаболізму пірувату, але не сукцинату, а циклоспорин А не впливає на цей процес. Етанол також спричиняє зниження автофлуоресценції мітохондріального НАД(Ф)Н у гепатоцитах, але не мембранного потенціалу. Хронічне введення алкоголю щурам на тлі високожирової дієти спричиняє інтенсифікацію мітохондріального дихання гепатоцитів, пригнічує секреторну функцію ацинарних клітин підшлункової залози, однак не впливає на їх мітохондріальне дихання.

Проведено дослідження адаптації мітохондрій печінки і підшлункової залози щурів до зміни вмісту жирів і цукру в раціоні. Перебування тварин на раціонах з підвищеним вмістом смальцю або смальцю і цукру впродовж семи тижнів не призводить до ожиріння і не змінює дихання мітохондрій печінки, а також роз'єднаного дихання, рівня НАД(Ф)Н чи мембранного потенціалу у ізольованих панкреатичних ацинусах. Виявлено зниження швидкості базального дихання панкреатичних ацинусів у тварин, що вживали корм з високим вмістом жиру.

У підсумку, мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів здатні до фізіологічних та патологічних стимулів найкраще характеризує максимальна швидкість та стабільність роз'єднаного дихання. Забезпечення високої адаптаційної здатності мітохондрій є можливою стратегією для покращення стану пацієнтів з гострим панкреатитом.

Ключові слова: мітохондрії, клітинне дихання, адаптація, ацинарні клітини підшлункової залози, гепатоцити, гострий панкреатит, алкоголь

SUMMARY

Manko B.O. Adaptive capacity of mitochondria in rat pancreatic acinar cells and hepatocytes – Qualifying scientific work as a manuscript

Thesis for a scientific degree of doctor of biological sciences in specialty 03.00.04 – biochemistry. – Ivan Franko national university of Lviv, Lviv, 2025.

The thesis is focused on the study of the mitochondrial adaptive capacity of pancreatic acinar cells hepatocytes of rats under physiological and pathological conditions, particularly under the influence of oxidation substrates, amino acids, cholecystokinin, ethanol, and various dietary factors. It is shown that the mitochondria of these cells can adapt to both physiological and pathological stimuli.

In the course of the research, algorithms and software packages for analyzing oxygen consumption data and fluorescent cell images were developed. These algorithms significantly accelerated data analysis while ensuring high accuracy and objectivity.

It was established that, using the isolated cell model, the ability of mitochondria to adapt to increased cellular energy demands can be characterized by the rate and stability of uncoupled respiration. The maximal rate reflects the short-term ability of mitochondria to oxidize the available pool of endogenous substrates, while stability is affected by the rate of transport and metabolism of exogenous substrates. In pancreatic acinar cells, the highest adaptive capacity of mitochondria is observed with the combination of glucose with pyruvate and glutamine, while in hepatocytes, it occurs with pyruvate or monomethyl succinate oxidation.

The effects of acetylcholine, cholecystokinin, and insulin on the adaptive capacity of mitochondria in isolated pancreatic acini of rats were characterized. Under these conditions, only the maximal rate of uncoupled respiration changed, but not its stability. It was shown that acetylcholine and cholecystokinin primarily enhance pyruvate oxidation, while insulin intensifies glucose catabolism.

It is proposed to use the stability of uncoupled respiration as a new functional criterion for cell viability. It was demonstrated that in pancreatic acinar cells, respiration stability decreases with the increase in the fraction of cells with damaged plasma membranes. Furthermore, the stability of protonophore-stimulated respiration was significantly higher during hepatocyte isolation using liver perfusion in situ, than during perfusion in vitro.

It was found that insufficient supply of oxidation substrates in vitro renders acinar cells vulnerable to necrotic processes under moderate ethanol concentrations combined with cholecystokinin, which was not observed in the presence of pyruvate or glutamine. Short-term exposure to cholecystokinin and ethanol in vivo reduces the respiration rate of acinar cells and induces blebbing but not necrosis. The administration of sodium pyruvate to rats with experimental arginine-induced acute pancreatitis corrects amino acid levels in plasma.

A screening of amino acids was conducted to identify the most suitable to be a safe additional energy source for pancreatic acinar cells. Acinar cell mitochondria were able to oxidize glutamine, glutamate, alanine, lysine, and aspartate, but not asparagine, histidine, or arginine. High concentrations of lysine, arginine, and glutamine caused necrosis of isolated pancreatic acini.

The method of plasma membrane permeabilization of hepatocytes using digitonin was improved by determining the optimal ratio of digitonin to cell count. It was found that in permeabilized hepatocytes, activation of the mitochondrial permeability transition pore by Ca^{2+} ions inhibit oxidative phosphorylation and the maximal rate but not the stability of uncoupled respiration.

The effects of ethanol in vitro and in vivo on mitochondrial respiration in hepatocytes and pancreatic acinar cells were studied. In vitro, ethanol can stimulate the basal respiration of hepatocytes due to pyruvate metabolism but not succinate, and this process is unaffected by cyclosporine A. Ethanol also decreases mitochondrial NAD(P)H autofluorescence in hepatocytes but not the membrane potential. Chronic alcohol administration in rats fed a high-fat diet intensifies mitochondrial respiration

in hepatocytes, inhibits the secretory function of pancreatic acinar cells, but does not affect their mitochondrial respiration.

The adaptation of mitochondria in the liver and pancreas of rats to changes in fat and sugar content in the diet was studied. Diets high in lard or lard and sugar for seven weeks neither resulted in obesity nor altered liver mitochondrial respiration or uncoupled respiration, NAD(P)H levels, or membrane potential in isolated pancreatic acini. A decrease in the basal respiration rate of pancreatic acini was observed in animals fed a high-fat diet.

In summary, the ability of mitochondria of pancreatic acinar cells and hepatocytes to respond to physiological and pathological stimuli is best characterized by the maximal rate and stability of uncoupled respiration. Ensuring a high adaptability of mitochondria is proposed as a potential strategy for improving the condition of patients with acute pancreatitis.

Key words: mitochondria, cell respiration, adaptation, pancreatic acinar cells, hepatocytes, acute pancreatitis, alcohol

ПУБЛІКАЦІЇ ЗДОБУВАЧА

Статті:

1. Merlavsky V. M., **Manko B. O.**, Ikkert O. V., Manko V. V. Experimental substantiation of permeabilized hepatocytes model for investigation of mitochondria in situ respiration // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87(6). – P. 113–121. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
2. **Manko B.O.**, Bilonoha O.O., Manko V.V. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization // Ukr. Biochem. J.– 2019. – Vol. 91, № 3. – P. 34–45 (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, написання рукопису, участь у виконанні експериментів і підготовці статті до друку*).
3. Mazur H.M., Merlavsky V.M., **Manko B.O.**, Manko V.V. Dependence of the mitochondrial adaptive capacity of hepatocytes on the oxidative substrates availability // Ukr. Biochem. J. – 2019. – Vol. 91(6). – P. 5–14. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
4. Білонога О.О., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Влив ацетилхоліну та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози // Фізіол. журн. – 2019. – Т. 65, № 4. – С. 73–81. (*Фахове видання України, категорія А; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
5. Мазур Г.М., Мерлавський В.М., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій печінки від способу виділення клітин // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2020. – Вип. 82. – С. 177–185. (*Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку*).

6. Bilonoha O., **Manko B.O.**, Manko V. Effects of insulin on adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2020. – Випуск 83. – С. 24–30. *(Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку).*
7. Mazur H. M., Merlavsky V. M., **Manko B.O.**, Manko V. V. mPTP opening differently affects electron transport chain and oxidative phosphorylation at succinate and NAD-dependent substrates oxidation in permeabilized rat hepatocytes // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92(4). – P. 14–23. *(Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: участь у плануванні експериментів, аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку).*
8. **Manko B.O.**, Bilonoha O.O., Voloshyn D.M., Zub A.M., Ivasechko I.I., Manko V.V. Pyruvate and glutamine define the effects of cholecystokinin and ethanol on mitochondrial oxidation, necrosis, and morphology of rat pancreatic acini // Pancreas. – 2021. – Vol. 50 (3). – P.972–981. *(Scopus, WoS, IF=2,9, Q2; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, написання рукопису, участь у виконанні експериментів і підготовці статті до друку).*
9. Zub A., Manko O.V., **Manko B.O.** The effects of ammonia and glutamine on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2021. – Випуск 84. – С. 105–112. *(Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису, аналізі даних і підготовці статті до друку).*
10. Zub A, Manko B.V., **Manko B.O.**, Manko V., Babsky A. Uncoupled respiration stability of isolated pancreatic acini as a novel functional test for cell vitality // Biol. Stud. – 2023. – Vol.17(3). – P. 243–252. *(Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку).*
11. Zub A.M., Ostapiv R.D., **Manko B.O.**, Manko V.V. Sodium pyruvate improves the plasma amino acid profile in rats with l-arginine-induced acute pancreatitis

- // Amino Acids. – 2023. – Vol. 55. – P. 1447–1454. (*Scopus, WoS, IF=3,0, Q2; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
12. Manko B.V., Kozopas N.M., Mazur H.M., Voityk A.M., **Manko B.O.**, Manko V.V. Bioenergetic functions of mitochondria in liver, pancreatic acinar cells, and sperm cells of rats fed short-term high-fat or high-fat high-sugar diets // Ukr. Biochem. J. – 2023. – Vol. 95, Is. 5. – P. 51–60. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: участь у плануванні експериментів, аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
 13. Мазур Г., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Вплив етанолу та циклоспорину А на дихання ізольованих гепатоцитів щурів // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2024. – Вип. 91. – С. 86–91. (*Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису, аналізі даних і підготовці статті до друку*).
 14. Bilonoha O.O., Mazur H.M., **Manko B.O.**, Kulachkovsky O.R., Manko V.V. Effect of long-term ethanol consumption and a high-fat diet on mitochondrial respiration in rat pancreatic acinar cells and hepatocytes // Ukr.Biochem .J. – 2024. –Vol. 96, Is. 4. – P. 25–32. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: плануванні експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
 15. Zub A.M., **Manko B.O.**, Manko V.V. Screening of amino acids as a safe energy source for isolated rat pancreatic acini // Pancreas. – 2024. – Vol 53 (8). – P. e662–e669. (*Scopus, WoS, IF=2,9, Q2; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у аналізі даних, виконанні експериментів, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
 16. Bilonoha O., Manko B.O., Mazur H., Manko V. Effects of acute alcohol intoxication on the respiration and dehydrogenase activity of rat pancreatic acini // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2024. – Вип. 92. – С. 132–137.

Патенти:

1. Пат. 60528 Україна, МПК (2011.01), G01N 33/50 (2006.01), A01N 61/00. Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ* / Манько В.В., **Манько Б.О.**, Мерлавський В.М., Великопольська О.Ю. ; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201013449; заявл. 12.11.2010 ; опубл. 25.06.2011, Бюл. № 11. – 6 с.
2. Пат. 118816 Україна, МПК, G01N 33/483 (2006.01), C12N 5/071 (2010.01). Спосіб оцінки функціонального стану мітохондрій / **Манько Б.О.**, Сідорова О.О., Манько В.В. ; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201702649; заявл. 21.03.2017 ; опубл. 28.08.2017, Бюл. № 16. – 5 с.
3. Пат. 118820 Україна, МПК, G01N 33/00. Спосіб підвищення енергозабезпечення ацинарних клітин підшлункової залози / **Манько Б.О.**, Сідорова О.О., Манько В.В. ; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201702662; заявл. 21.03.2017 ; опубл. 28.08.2017, Бюл. № 16. – 6 с.

Тези доповідей на конференціях, з'їздах і симпозіумах

1. Сідорова О., **Манько Б.**, Волошин Д., Манько В. Вплив ацетилхоліну і холецистокініну на базальне дихання і максимальну окисну здатність дихання інтактних панкреатичних ацинусів за окиснення пірувату і глутаміну // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 20–23 квітня 2015 р): Збірник тез. – Львів, 2015. – С. 496–497.
2. Сідорова О.О., Манько В.В., Волошин Д.М., **Манько Б.О.** Мембранопроникні субстрати окиснення змінюють максимальну окисну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози // VI з'їзд

- Українського біофізичного товариства (28–30 травня 2015 р., Луцьк – Світязь): матеріали з’їзду. – Луцьк, 2015. – С. 27.
3. Сідорова О., Манько Б.О., Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій та стійкість процесів мітохондріального дихання ацинарних панкреатитів // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2016 р.) : Збірник тез. – Львів, 2016. – С.; 311–312.
 4. Сідорова О., Манько Б.В., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Мембранний блебінг і дихання інтактних панкреатичних ацинусів за дії алкоголю *in vivo* // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2016 р.) : Збірник тез. – Львів, 2016. – С. 312–313.
 5. Мазур Г., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Вплив субстратів окиснення на максимальну окисну здатність мітохондрій інтактних гепатоцитів // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2016 р.) : Збірник тез. – Львів, 2016. – С. 300–301.
 6. **Manko B.**, Sidorova O., Manko V. Assessing mitochondrial bioenergetics in live cells: when maximum is not enough. Third Kyiv International Symposium “Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities”. – Kyiv–Lutsk, 2017. –P. 64.
 7. Манько В.В., **Манько Б.О.**, Сідорова О., Мазур Г.М., Манько Б.В. Алкоголь за хронічного введення на тлі високожирної дієти порушує мітохондріальні дихання панкреатитів, але не гепатоцитів // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології : Тези доповідей VIII Міжнародної наукової конференції, присвяченої 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 17–20 жовтня 2017 р.). – Київ, 2017. – С. 69.

8. Котик Б., Сідорова О.О., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Роль глутаміну і пірувату у забезпеченні мітохондріального окиснення ацинарних клітин підшлункової залози щурів за умов панкреатиту *in vitro* // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 259–260.
9. Пазюк О., Сідорова О.О., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Вплив алкоголю *in vivo* на мітохондріальне дихання ацинарних клітин підшлункової залози за розвитку панкреатиту // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 263– 264.
10. Сідорова О.О., Манько Б.В., Мерлавський В.М., **Манько Б.О.** Функціональний стан мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 267–268.
11. Мазур Г., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій інтактних гепатоцитів щурів за тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 261–262.
12. Манько Б.В., Сідорова О., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Мембранний потенціал мітохондрій як критерій оцінки адаптаційної здатності мітохондрій // XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (Львів, 10–12 квітня 2018 р.) : Збірник тез. – Львів, 2018. – С. 287–288.
13. Якубовська А. Сідорова О., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Вплив глутаміну на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози // XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ

- біології”, присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (Львів, 10–12 квітня 2018 р.) : Збірник тез. – Львів, 2018. – С. 291–292.
14. Манько В.В. Білонога О.О., **Манько Б.О.** Максимальна адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози // Матеріали Тематичного VII з’їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 29 – 31 жовтня 2018 р) – Київ, 2018. – С. 9.
 15. Мазур Г.М., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій залежить від рівня експресії у клітинах транспортерів та їхньої спорідненості до субстратів окиснення // Матеріали Тематичного VII з’їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 29 – 31 жовтня 2018 р) – Київ, 2018. – С. 20.
 16. Якубовська, А., **Манько, Б.О.**, Манько, В.В. Вплив аргініну і лізину на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів // XX з’їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 27–30 травня 2019 р.). – Київ, 2019. – С. 32.
 17. Мазур Г.М., Мерлавський В.М., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Адаптаційна здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів щурів // XX з’їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 27–30 травня 2019 р.). – Київ, 2019. – С. 32–33.
 18. **Манько Б.О.**, Манько В.В. Методи оцінки та механізми реалізації адаптаційної здатності мітохондрій різних тканин // XX з’їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 27–30 травня 2019 р.). – Київ, 2019. – С. 34–35.
 19. Галан С., Мазур Г., Мерлавський В., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Адаптаційна здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів залежить від способу виділення клітин // XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 135-річниці від дня

- народження Я. Парнаса (Львів, 9–11 квітня 2019 р.) : Збірник тез. – Львів, 2019. – С. 148–149.
20. Fedashko, V., Yakubovska, A., Ivasechko, I., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Effects of hyperstimulation by cholecystokinin on viability of rat pancreatic acinar cells // XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 135-річниці від дня народження Я. Парнаса (Львів, 9–11 квітня 2019 р.) : Збірник тез. – Львів, 2019. – С. 141.
 21. Hadych, A., Yakubovska, A., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Effects of glutamine and NH_4Cl on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells // XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 135 річниці від дня народження Я. Парнаса (Львів, 9–11 квітня 2019 р.) : Збірник тез. – Львів, 2019. – С. 141–142.
 22. Зуб, А., **Манько, Б.О.**, Манько, В.В. Залучення амінокислот у процеси мітохондріального дихання впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози щурів // Матеріали чергового VIII з’їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 12–15 листопада 2019 р) – Київ, 2019. – С. 33.
 23. Галан С., Мазур Г., Мерлавський В., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Вплив етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату або монометилсукцинату // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 75 річниці створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача (Львів, 27–29 квітня 2020 р.) : Збірник тез. – Львів, 2020. – С. 172–173.
 24. Chipak S., Zub A., Ostapiv R., **Manko B.O.**, Manko V.V. Influence of sodium pyruvate on pancreatic morphology and amino acid blood levels in rats with arginine-induced acute pancreatitis // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 75 річниці створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача (Львів, 27–29 квітня 2020 р.) : Збірник тез. – Львів, 2020. – С.182–183.

25. Shostak, M., Zub, A., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Effect of high concentrations of amino acids on apoptosis and necrosis in rat pancreatic acinar cells // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 75 річниці створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача (Львів, 27–29 квітня 2020 р.) : Збірник тез. – Львів, 2020. – С. 200.
26. Марцинюк І., Мазур Г. М., Мерлавський В. М., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Вплив етанолу in vitro на окисні процеси у мітохондріях гепатоцитів щурів // XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2021 р.) : Збірник тез. – Львів, 2021. – С. 208–209.
27. Zub, A., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Viability of pancreatic acinar cells under the influence of amino acids in high concentration // XVIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” , присвячена 195 річниці від дня народження Юліуса Планера: (Львів, 6–7 жовтня 2022 р.) : Збірник тез. – Львів, 2022. – С. 164–165.
28. Manko V.V., **Manko B.O.**, Babsky A. Automatic analysis of biological suspensions oxygen consumptions signals // XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 90-річчю від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга-Сосонка Юрія Романовича (Львів, 26–28 квітня 2023 року) : Збірник тез. – Львів, 2023. – С. 188–189.
29. Погоріла К., Дранчук Т., Мазур Г., Манько Б., Манько В. Програмний пайплайн для автоматичної сегментації ізольованих гепатоцитів і вимірювання мітохондріального мембранного потенціалу і флуоресценції НАДН // XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 90-річчю від дня народження професора Ореста Демківа (Львів, 18–20 квітня 2024 року) : Збірник тез. – Львів, 2024. – С. 330–331.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

[Ca²⁺] – Концентрація іонів Кальцію

CsA – циклоспорин А

DMEM – Dulbecco's modified Eagle medium

FCCP – Карбонілціанід-р-трифторметоксифенілгідрозон

HEPES – N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота

MEM – Minimal essential medium

MTT – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій бромід

TMRM – Тетраметилпродамінметилестерперхлорат

АДФ – Аденозиндифосфат

АТФ – Аденозинтрифосфат

АХ – Ацетилхолін

ВЖ – Раціон з високим вмістом жиру

ВЖВЦ – Раціон з високим вмістом жиру і цукру

НАД(Ф)Н – Нікотинаміддинуклеотид (фосфат) відновлений

НАД⁺ – Нікотинаміддинуклеотид окиснений

ФАДН₂ – Флавінаденіндинуклеотид відновлений

ХЦК – холецистокінін, в експериментах це його фрагмент Tyr[SO₃H]²⁷)
холецистокінін октапептиду (26-33) амід

ЦТК – Цикл трикарбонових кислот

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
SUMMARY	5
ПУБЛІКАЦІЇ ЗДОБУВАЧА	8
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП	21
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Методологія дослідження дихання ізольованих мітохондрій і клітин	29
1.2. Особливості біоенергетичних процесів печінки	33
1.3. Участь мітохондрій у патогенезі алкогольної хвороби печінки	35
1.4. Особливості біоенергетичних процесів ацинарних клітин підшлункової залози	40
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	48
2.1. Матеріали	48
2.2. Експериментальні тварини	49
2.3. Введення препаратів та модифікації раціону тварин	49
2.4. Виділення, початкова оцінка життєздатності і морфології ізольованих панкреатичних ацинусів	51
2.5. Виділення ізольованих гепатоцитів	54
2.6. Отримання препаратів ізольованих мітохондрій печінки	55
2.7. Споживання кисню клітинами та мітохондріями	55
2.8. Флуоресцентна мікроскопія	56
2.9. Визначення концентрації родаміну 123 у клітинах	58
2.10. Дослідження секреції ізольованих ацинусів <i>in vitro</i>	59
2.11. Визначення активності амілази	59
2.12. Високоефективна рідинна хроматографія	60
2.13. Визначення концентрації етилового спирту в крові за допомогою газо-рідинної хроматографії	61
2.14. Визначення концентрації етилового спирту в крові ензиматичним методом	61
2.15. Гістологічне дослідження підшлункової залози щурів	61
2.16. Трансмисійна електронна мікроскопія	62
2.17. Виділення ДНК	62

	19
2.18. Визначення вмісту фрагментованої ДНК	63
2.19. Електрофорез ДНК.....	64
2.20. Біохімічні показники плазми крові	64
2.21. Авторські алгоритми	65
2.22. Статистично-математичне опрацювання результатів.....	65
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	66
3.1. Автоматичні програмні рішення для аналізу результатів досліджень	66
3.1.1. Автоматичний аналіз записів споживання кисню	66
3.1.2. Алгоритми виокремлення клітин на мікрофотографіях та вимірювання флуоресценції.....	73
3.2. Особливості адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів	78
3.2.1. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів залози від субстрату окиснення.....	78
3.2.2. Вплив первинних агоністів на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози	92
3.2.3. Залежність роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів від їх життєздатності.....	100
3.3. Роль пірувату і глютаміну в забезпеченні стійкості ацинарних клітин підшлункової залози до токсичної дії етанолу за стимуляції холецистокініном	105
3.4. Амінокислоти як безпечне джерело енергії для ацинарних клітин підшлункової залози	128
3.5. Введення пірувату за моделі аргінін-індукованого панкреатиту	148
3.6. Характеристика адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих гепатоцитів	154
3.6.1. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих гепатоцитів від субстрату окиснення та способу виділення.....	154
3.6.2. Вплив етанолу та циклоспорину А на процеси окиснення в мітохондріях гепатоцитів.....	160
3.6.3. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за активації пори перехідної провідності йонами Ca^{2+}	166
3.7. Вплив хронічного введення етанолу за високожирової дієти на дихання ізольованих гепатоцитів та панкреатичних ацинусів щурів	171

3.8. Вплив раціонів харчування з високим вмістом жирів та цукру на мітохондріальні функції підшлункової залози, печінки 181

УЗАГАЛЬНЕННЯ І КРИТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ 187

ВИСНОВКИ..... 198

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ 200

ДОДАТОК..... 243

ВСТУП

Актуальність теми. Тяжкі хвороби підшлункової залози та печінки, пов'язані з вживанням алкоголю та ожирінням, призводять до високої смертності серед населення [1], [2], [3]. Рівень захворюваності на гострий панкреатит та цироз у Європі постійно зростає, особливо у країнах східної Європи, де причиною є зростання вживання алкоголю [4], [5], [6]. Іншим фактором є вживання високої кількості жирів та легкозасвоюваних вуглеводів, що веде, серед іншого, до розвитку неалкогольної хвороби печінки [7] та жирового переродження підшлункової залози [8]. Вважають, що ушкодження та недостатня адаптація окисних систем мітохондрій до деполяризації є одним із механізмів розвитку цих захворювань підшлункової залози [9], [10], [11] і печінки [12], [13], [14]. Однак досі не створено специфічних терапевтичних агентів для лікування цих захворювань, які б захищали мітохондрії від дії чинників захворювання чи покращували забезпечення процесів мітохондріального окиснення.

Важко переоцінити роль мітохондрій у забезпеченні функціонування ацинарних клітин підшлункової залози і гепатоцитів [15]. В обох типах клітин окисне фосфорилування, поряд із гліколізом, є основним джерелом синтезу АТФ, необхідного для забезпечення клітинних процесів [16], [17], [18]. Мітохондрії також залучені у процесах Ca^{2+} -сигналювання [18], [19], [20], [21], [22], регуляції клітинної смерті [10], [23], [24], [25] та у багатьох метаболічних шляхах.

Інтенсивність мітохондріального дихання і окисного фосфорилування не є постійною: вона залежить від потреб клітин у АТФ і тонко регулюється багатьма механізмами. Рівень базального дихання у стані спокою клітини відображає лише незначну частку здатності мітохондрій до окисного фосфорилування. Таку максимальну здатність, яка характеризує адаптаційні можливості мітохондрій, прийнято оцінювати за допомогою протонофорів [26]. Максимальне роз'єднане дихання є важливим експериментальним параметром, який корелює зі станом клітини [10], [26], [27], [28], [29]. У ацинарних панкреатитах воно знижується при аноксії [30] та експериментальному панкреатиті [31]. У печінці мишей

відбувається збільшення експресії компонентів дихального ланцюга й зростання максимального роз'єданого дихання як адаптація до хронічного введення етанолу [14]. Відтак слід поглиблювати розуміння механізмів адаптації мітохондрій до високих навантажень.

Актуальним питанням є роль амінокислот у функціонуванні екзокринної частини підшлункової залози та розвитку її захворювань. Інтенсивний транспорт [32] [33], [34] та метаболізм [35] амінокислот необхідний не лише для постійного синтезу і секреції травних ферментів, а й забезпечення енергетичних потреб ацинарних клітин. Генетично зумовлені дефекти протеїнів, що забезпечують ці процеси, спричиняють часті випадки гострого панкреатиту [36], [37], [38], [39]. Крім того, відомим побічним наслідком терапії лейкемії препаратом аргінази є гострий панкреатит [40]. У пацієнтів з панкреатитом спостерігаються суттєві зміни амінокислотного складу плазми [41], [42], [43]. Тому розглядають можливість терапії панкреатиту шляхом додаткового введення деяких амінокислот в організм пацієнта [44], [45], [46], [47], [48], [49], [50], [51]. З іншого боку, аргінін, лізин, орнітин та деякі інші амінокислоти у високих дозах можуть спричиняти панкреатит на моделях тварин [52], [53], [54], а також у людей [55], [56]. Механізмом токсичного впливу амінокислот на підшлункову залозу може бути ушкодження мітохондрій [53], [57], [58], [59]. Тому необхідним є глибше дослідження процесів мітохондріального окиснення амінокислот у підшлунковій залозі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри фізіології людини і тварин та Центру колективного користування клітинної біології та біоенергетики Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках держбюджетних тем «Ca²⁺-транспортувальні системи та регуляції клітинного дихання екзокринних залоз у нормі і за дії стресорних чинників» (2015–2017 рр., № держреєстрації 0115U003246), «Адаптаційний потенціал мітохондрій секреторних клітин підшлункової залози і печінки у нормі та за розвитку патології» (2018–2020 рр., № держреєстрації 0118U003604), «Функціональна

оцінка мітохондрій: пайплайн для виявлення механізмів передпатологічних станів травних залоз» (2023–2025 рр., № держреєстрації 0123U101951), проєкту у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дієтарних чинників» (2021–2023 рр., № держреєстрації 0121U110302), проєкту «Механізми реалізації окисного потенціалу мітохондрій клітин підшлункової залози, печінки та лімфоми NK-Ly» (2015–2016 рр), фінансованого компанією «Material Phases Data System» і проєкту «State of rat pancreatic mitochondria in situ at experimental acute pancreatitis» (2013–2014 рр), фінансованого Західно-Українським центром біомедичних досліджень (West-Ukrainian BioMedical Research Center – WUBMRC).

Мета та завдання досліджень. Метою досліджень було охарактеризувати адаптаційну здатність ацинарних клітин підшлункової залози та печінки за умов різного субстратного забезпечення, дії гормонів, алкоголю і харчових факторів.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Розробити автоматичні програмні рішення для аналізу записів дихання ізольованих клітин та мітохондрій, а також виокремлення клітин на мікрофотографіях і аналізу їх флуоресценції.
2. Дослідити особливості адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих ацинарних панкреатитів.
3. Дослідити роль пірувату та глутаміну у забезпеченні стійкості мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози до дії етанолу та гіперстимуляції холецистокініном.
4. Виявити найбільш придатні амінокислоти для енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози.
5. З'ясувати вплив пірувату натрію *in vivo* на морфологічний стан підшлункової залози і концентрації амінокислот у плазмі у щурів з аргінін-індукованим гострим панкреатитом.
6. Охарактеризувати адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів.

7. Дослідити вплив хронічного введення етанолу щурам у комбінації з високожировою дієтою на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів.
8. Оцінити вплив короткотривалого згодовування щурам корму з високим вмістом жиру або жиру і цукру на мітохондріальні функції підшлункової залози і печінки.

Об'єкт дослідження – процеси мітохондріального окиснення у ацинарних клітинах підшлункової залози та гепатоцитах.

Предмет дослідження – адаптаційна здатність мітохондріальних окисних процесів ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів щурів за дії фізіологічних і патологічних факторів, зокрема субстратів окиснення, амінокислот, умов виділення та інкубування клітин *in vitro*, первинних агоністів, етанолу, циклоспорину А, йонів Ca^{2+} і раціонів харчування з високим вмістом жиру або жиру і цукру.

Методи дослідження: *біохімічні:* визначення активності амілази, дослідження вмісту етанолу в плазмі крові за допомогою оксидазно-переоксидазного методу, виділення ДНК та кількісна оцінка її фрагментації, визначення вмісту холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності, ліпопротеїнів високої щільності, тригліцеридів та глюкози у плазмі крові; *препаративні:* отримання суспензії ізольованих ацинусів підшлункової залози, ізольованих гепатоцитів та мітохондрій печінки, гістологічне дослідження підшлункової залози; *фізико-хімічні:* полярографічний метод дослідження швидкості поглинання кисню, світлова, флуоресцентна і електронна мікроскопія, спектрофотометрія, високоефективна рідинна хроматографія, газова хроматографія, електрофорез ДНК у агарозному гелі; *математичні:* створення програмних алгоритмів, морфометрія клітин; *статистичні:* описова статистика, t-тест (Стьюдента або парний), лінійна регресія, однофакторний чи двофакторний дисперсійний аналіз з/без повторень з post hoc t-тестами і коригуванням похибки 1 типу за Голмом-Бонферроні для багаторазових порівнянь, коефіцієнт внутрішньокласової кореляції.

Наукова новизна одержаних результатів. Запропоновано новий підхід до дослідження адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих клітин, що полягає у поєднанні дослідження максимальної швидкості і стабільності роз'єданого дихання. Вперше продемонстровано, що наявність додаткових субстратів окиснення у середовищі підвищує стабільність роз'єданого дихання, а зниження стабільності спостерігається за неоптимальних умов *in vitro* для клітин: виділення гепатоцитів шляхом перфузії печінки *in vitro*, отримання менш життєздатних препаратів ацинарних панкреатитів, а також за дії малату, ізоцитрату чи амоній хлориду. Вперше доведено, що зростання максимальної швидкості роз'єданого дихання ацинарних панкреатитів за стимуляції холецистокініном чи ацетилхоліном проявляється лише за наявності пірувату у середовищі, а у випадку дії інсуліну – за окиснення глюкози. Виявлено антагоністичний вплив інсуліну на стимульоване холецистокініном роз'єдане дихання. Активація пори перехідної провідності йонами Ca^{2+} в першу чергу пригнічує окисне фосфорилування, а потім максимальну швидкість роз'єданого дихання пермеабілізованих гепатоцитів.

Вперше здійснено систематичне порівняння особливостей адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих ацинарних панкреатитів і гепатоцитів за різних умов. Виявлено, що найвища адаптаційна здатність мітохондрій панкреатитів щурів за окиснення суміші пірувату з глутаміном або глутамату, а гепатоцитів – за окиснення пірувату або сукцинату. На моделі щурів підтверджено раніше відоме у мишей адаптаційне підвищення окисної здатності мітохондрій печінки до хронічного введення етанолу. Вперше виявлено, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози нечутливі до хронічного введення етанолу. Також встановлено, що високий вміст жиру або жиру і цукру у кормі тварин за умов відсутності ожиріння не чинить значного впливу на адаптаційну здатність мітохондрій підшлункової залози і печінки.

Експериментально обґрунтовано можливість використання пірувату, глутаміну, глутамату і аланіну для забезпечення високої адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози і підвищення їх стійкості до

патогенних факторів. Вперше виявлено, що піруват та глутамін *in vitro* здатні захищати ацинарні панкреацити від некрозу за токсичної дії етанолу і холецистокініну. Введення пірувату щурам з моделлю аргінін-індукованого гострого панкреатиту покращує амінокислотний склад плазми крові. Вперше проведений скринінг амінокислот показав, що мітохондрії ацинарних панкреацитів здатні окиснювати глутамат, глутамін, аланін, лізин і аспартат, але не аспарагін, аргінін чи гістидин. Вперше показано, що глутамін у високій концентрації спричиняє набрякання, блебінг та некроз ацинарних клітин підшлункової залози щурів, а лізин і аргінін – лише некроз. Доведено нетоксичність високих концентрацій глутамату, аланіну і гістидину для ацинарних клітин підшлункової залози *in vitro*.

Практичне значення одержаних результатів. В процесі виконання роботи було створено корисні програмні пакети і макроси, що дають змогу повністю автоматизувати трудомісткий процес аналізу записів дихання і фотографій флуоресцентної мікроскопії клітин. Застосування цих рішень забезпечує високу точність, швидкість та неупередженість аналізу.

Було також розроблено нові методологічні та методичні підходи. Запропоновано новий параметр оцінки адаптаційної здатності мітохондрій – стабільність роз'єданого дихання (Пат. 118816), який можна також використовувати як новий критерій життєздатності клітин. Також значно покращено спосіб пермеабілізації клітин печінки для дослідження їх мітохондріального дихання (Пат. 60528). Розроблено новий спектрофотометричний метод визначення накопичення родаміну 123 у клітинах. Запропоновано спосіб покращення енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози (Пат. 118820).

Результати досліджень дають підстави для застосування деяких субстратів окиснення та амінокислот (піруват, глутамат, аланін) як підтримуючу терапію пацієнтів з гострим панкреатитом.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто проведено пошук та аналіз літератури, розроблено методологію експериментальних досліджень,

сформульовано основні положення дисертації, здійснено підготовку рукопису. Експерименти виконані дисертантом особисто або за безпосередньої участі. Планування роботи та обговорення частини отриманих результатів, підготовка деяких рукописів до публікації здійснювались спільно з науковим консультантом, проф. Бабським Андрієм Мирославовичем. Співучасть працівників кафедри фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка та партнерів висвітлено у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені на XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX та XX міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024); VI, VII і VIII з’їздах Українського біофізичного товариства (2015, 2018, 2019); Третьому Київському міжнародному симпозиумі “Smooth Muscle Physiology, Biophysics and Pharmacology” (Київ, 2017); VIII Міжнародної наукової конференції, присвяченої 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 2017); XX з’їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 48 наукових праць, включаючи 16 статей у фахових виданнях (3 – у закордонних та 13 – у вітчизняних виданнях), з них 3 статі у виданнях, що віднесені до другого квартилю (Q2) та 7 статей – у журналах четвертого квартилю (Q4) згідно класифікації Scimago Journal and Country Rank, 3 патенти України на корисну модель, 29 тез доповідей у матеріалах конференцій, з’їздів і симпозиумів. Сумарний імпакт-фактор публікацій за темою дисертації – 8,8.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень та їх обговорення, узагальнення і критичний аналіз результатів, висновки та список

використаних джерел (356 пункти). Дисертація викладена на 252 сторінках і проілюстрована 72 рисунками та 22 таблицями.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Методологія дослідження дихання ізольованих мітохондрій і клітин

Для дослідження процесів мітохондріального окиснення, як і будь-яких інших метаболічних перетворень, важливо знати два основні типи параметрів: величини і потоки, тобто зміни величин в часі. Досліджуваними величинами зазвичай є концентрації метаболітів, іонів, значення трансмембранних потенціалів тощо. Для характеристики мітохондріального окиснення часто визначають величину мембранного потенціалу мітохондрій [13], [17], [21], концентрації АТФ [17], [18], [60], НАДН [20], [61], субстратів окиснення і їх метаболітів [62]. Частину з цих величин можна контролювати експериментально, наприклад, додаючи насичуючі концентрації субстратів окиснення до препарату ізольованих мітохондрій. Всі вони зазвичай знаходяться на певному стабільному рівні внаслідок стану динамічної рівноваги процесів їх синтезу (генерації у випадку мембранного потенціалу) і утилізації. Основною проблемою інтерпретації змін цих величин є те, що невідомо, наскільки і в яку сторону змінюються протилежні процеси синтезу і утилізації.

Саме тому надзвичайно інформативним є визначення швидкості потоків окиснення у мітохондріях. Найбільш експериментально доступним та поширеним методом для оцінки потоків через дихальний ланцюг на сьогодні є дослідження споживання кисню. Тісне sprzęження між транспортом електронів у ланцюзі та перенесенням протонів з матриксу [63] дає змогу надійно оцінити потік протонів за швидкістю споживання кисню комплексом IV. Насправді ж можна створити такі експериментальні умови, за яких можна оцінювати роботу кожного комплексу дихального ланцюга, АТФ-синтази, а також транспорту іонів і аденілових нуклеотидів у мітохондріях за показниками дихання. Минуло вже більш, ніж 60 років від відкриття електрода Кларка [64] і класичного дослідження Чанса і Вільямса кінетики споживання кисню ізольованими мітохондріями [65],

але цей метод досі застосовують і вдосконалюють [66]. Розробляють також інші підходи до дослідження споживання кисню клітинами у мікропланшетах [67], [68].

Чанс і Вільямс [65] є авторами класичного експериментального протоколу для дослідження дихання ізольованих мітохондрій, що використовується з тими чи іншими видозмінами і до сьогодні. У комірку з мітохондріями додають аденозин дифосфат (АДФ) і субстрат (у різній послідовності), що дає змогу зареєструвати високу швидкість дихання за максимального окисного фосфорилування (Стан 3). У класичному експерименті спочатку додавали АДФ (рис. 1.14, Стан 2), а потім субстрат. Однак більшого поширення набув експеримент із зворотною послідовністю, який дає змогу точно проаналізувати співвідношення Р/О (кількість синтезованого АТФ до спожитого кисню). Після вичерпання АДФ і накопичення АТФ зростає мітохондріальний мембранний потенціал і дихання суттєво сповільнюється (Стан 4). За умови забруднення препаратів мітохондрій АТФ-азами повністю досягнути стану 4 не вдається, тому використовують інгібітор АТФ-синтази олігоміцин А (Стан 4о). Після цього можна додавати протонофор (динітрофенол або FCCP) для досягнення максимального роз'єданого дихання (Стан 3р). Важливими для характеристики мітохондрій є два співвідношення: коефіцієнт дихального контролю V_3/V_4 (швидкостей у станах 3 і 4) та ефективність спряження Р/О. Високий коефіцієнт дихального контролю зазвичай свідчить про добру якість препаратів мітохондрій, їх здатність синтезувати АТФ і низький рівень витоку протонів. Натомість співвідношення Р/О є сталим для кожного субстрату окиснення, оскільки зумовлене молекулярною організацією дихального ланцюга і АТФ-синтази; відхилення від теоретичних значень цього коефіцієнта свідчить швидше про недоліки експерименту, ніж порушення мітохондріальних функцій [69].

Дослідження дихання цілісних клітин є складнішим, однак дає змогу уникнути артефактів, притаманних препаратам ізольованих мітохондрій, і досягнути більшої фізіологічної релевантності. Основними труднощами є низька проникність чи непроникність деяких субстратів, АДФ і інших

експериментальних агентів і неможливість повністю контролювати склад внутрішньоклітинного середовища. Однією з особливостей клітинного дихання є немітохондріальне споживання кисню, яке, однак, складає до 10 % від загальної швидкості дихання у більшості клітин, зокрема гепатоцитів [70] і ацинарних панкреатитів [71]. Для оцінки цих процесів можна застосувати специфічні інгібітори дихального ланцюга ротенон і антимицин А в кінці експерименту.

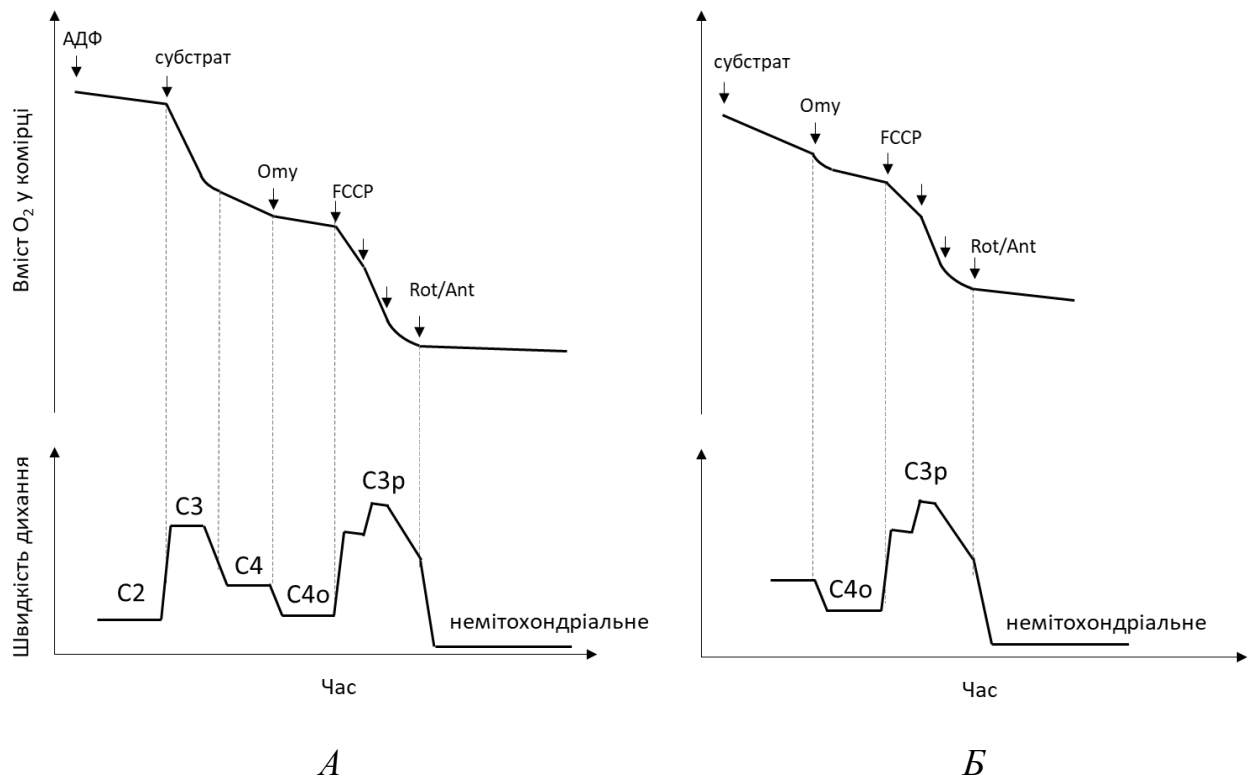


Рис. 1.1. Схема типового полярографічного експерименту на ізолюованих мітохондріях (А) чи клітинах (Б): Omy – олігоміцин, Rot – ротенон, Ant – антимицин А

Базальне дихання клітин зазвичай сильно контролюється синтезом АТФ і частково іншими процесами (витік протонів, транспорт іонів тощо) [72]. Воно може сильно змінюватись в залежності від потреб клітин у АТФ, зокрема за дії гормонів чи додаванні субстратів окиснення. Наприклад, базальне дихання гепатоцитів зростає за додавання жирних кислот, лактату, пірувату чи вазопресину [73], [74]. Дихання ж ізолюованих непермеабілізованих панкреатичних ацинусів не змінюється за додавання субстратів окиснення [71], однак зростає за стимуляції карбахоліном [75]. Базальне споживання кисню бета-

клітинами острівців Лангерганса [76] і клітинами інсуліноми [77] залежить від концентрації глюкози у середовищі. Лише базального дихання здебільшого недостатньо для оцінки функціонування мітохондрій у клітинах.

Для дослідження клітинного дихання, спряженого із синтезом АТФ застосовують олігоміцин, оскільки експериментально змінювати і контролювати рівень аденілових нуклеотидів у клітинах неможливо. Зазвичай швидкість олігоміцин-нечутливого дихання становить 10–30% від базального [78], [79], однак може бути й вищою у ацинарних клітинах підшлункової залози [28], [75]. Значне підвищення цієї швидкості може свідчити про порушення спряження між процесами дихання і окисного фосфорилування. Оскільки пригнічення АТФ-синтази призводить до гіперполяризації мітохондрій, вважають, що олігоміцин спричиняє деяке (до 20%) підвищення витоку протонів [80]. Тому оцінка швидкості дихання, спряженого з синтезом АТФ зазвичай занижена. З іншої сторони, за повного пригнічення мітохондріального синтезу АТФ гліколіз не здатний повністю забезпечити клітинні потреби у АТФ, що веде до порушення постачання субстратів і поступового зниження дихання, що не відновлюється потонофорами [72]. Таке зниження дихання у експерименті небажане, оскільки за таких умов оцінка швидкості синтезу АТФ у клітинах може бути значно завищена, а швидкості протонного витоку, навпаки, занижена. На цей момент не знайдено експериментальних рішень цих обмежень, а оцінка швидкості синтезу АТФ у цілісних клітинах за допомогою олігоміцину є недостатньо надійною.

Іншим важливим інструментом для оцінки адаптаційної здатності мітохондрій в клітинах є протонофори. Ці речовини знижують мітохондріальний мембранний потенціал, штучно підвищуючи швидкість роботи дихального ланцюга. У типових дослідженнях роз'єданого дихання клітин концентрацію протонофора поступово збільшують для досягнення максимальної швидкості дихання [30], [75], [81], оскільки занадто високі дози спричиняють незворотне пригнічення дихання. На жаль, цієї практики не завжди притримуються у інших типах експериментів, наприклад, у дослідженнях транспорту Ca^{2+} мітохондріями [82]. Відношення максимального роз'єданого дихання до олігоміцин-

нечутливого дихання клітин є аналогом коефіцієнта дихального контролю мітохондрій. Як цей параметр, так і сама величина максимального роз'єданого дихання використовують для діагностики стану мітохондрій у клітинах. Зниження адаптаційної здатності мітохондрій відбувається, наприклад, у клітинах нирок за холодового ушкодження [27], в кардіоміоцитах за експериментальної гіпоксії-реперфузії [29], а в ацинарних клітинах підшлункової залози за дії гідроген пероксиду й менадіону [10].

На практиці не завжди очевидно, чи значення роз'єданого дихання, отримані в експерименті на ізольованих клітинах, обмежені саме спроможністю дихального ланцюга, а не обмежені здатністю клітин транспортувати й утилізувати субстрати окиснення з позаклітинного середовища або окиснювати ендогенний їх пул. Наприклад, у ізольованих нервових синапсах додавання пірувату суттєво підвищує швидкість роз'єданого дихання у порівнянні з окисненням лише глюкози [81]. Також нез'ясованими залишаються причини зниження швидкості дихання за високих доз протонофорів й роль транспорту й окиснення субстратів у забезпеченні високої адаптаційної здатності мітохондрій дихання різних клітин, зокрема й ацинарних панкреатитів.

1.2. Особливості біоенергетичних процесів печінки

Печінка є ключовим органом, який забезпечує більшість метаболічних потреб організму. Тому роль мітохондрій у печінці є значно ширшою, ніж лише синтез АТФ для забезпечення енергетичних потреб гепатоцитів. Особливістю циклу Кребса у гепатоцитах є значне залучення реакцій анаплерозу і катаплерозу, необхідних для гліюконеогенезу, ліпогенезу, кетогенезу, синтезу сечовини тощо. Вважають, що у печінці потік речовин через реакції анаплерозу/катаплерозу в шість разів більший, ніж потік окиснення метаболітів у циклі Кребса [83].

Гліюконеогенез, як і окисне фосфорилування, переважає у перипортальній зоні печінки. Цей енергозатратний процес відбувається за тривалого голодування, коли запаси гліюгену печінки вже вичерпані, а відношення

АТФ/АМФ є низьким [84]. Для функціонування гліюконеогенезу необхідні чотири ключові ензими: мітохондріальна піруваткарбоксилаза і цитозольна фосфоенолпіруваткарбоксикіназа, фруктозо-1,6-дифосфатаза і глюкозо-6-фосфатаза [85]. Одночасно ці ензими експресуються лише в печінці та кортексі нирок, де і може відбуватись гліюконеогенез. Основними субстратами для гліюконеогенезу є лактат і аланін, однак багато інших амінокислот та гліцерол також можуть бути джерелом для синтезу глюкози [86]. Лактат і аланін перетворюються до пірувату за участі лактатдегідрогенази чи аланінамітотрансферази, а потім – до оксалоацетату у мітохондріях. Остання реакція каталізується піруваткарбоксилазою. Оксалоацетат транспортується з мітохондрій у формі малату за участі малат-аспартатного човникового механізму. Наступні етапи гліюконеогенезу відбуваються у цитозолі, а саме синтез фосфоенолпірувату (фосфоенолпіруваткарбоксикіназа), фруктозо-6-фосфату з фруктозо-1,6-дифосфату (фруктозо-1,6-дифосфатаза) і утворення глюкози за участі глюкозо-6-фосфатази [86]. Важливим наслідком функціонування гліюконеогенезу для мітохондріального дихання у гепатоцитах є те, що цей процес є додатковим механізмом утилізації АТФ, а тому його активність контролює швидкість клітинного дихання. На препаратах ізольованих гепатоцитів було продемонстровано, що додавання пірувату чи лактату суттєво стимулювало базальне дихання клітин, особливо якщо піддослідні тварини голодували перед виділенням гепатоцитів [87].

Ліпогенез *de novo* – це біохімічний процес синтезу жирних кислот з ацетил-КоА, що відбувається в печінці. Він відбувається за умов високих концентрацій ацетил-КоА в мітохондріях печінки, що утворюється за катаболізму глюкози, алкоголю, ацетату, лейцину й ізолейцину). Синтез жирних кислот відбувається в цитозолі, куди ацетил-КоА потрапляє з мітохондрій у вигляді цитрату. На першому етапі утворюється малоніл-КоА (ацетил-КоА карбоксилаза), а на другому по чергове приєднання молекул ацетил-КоА каталізується синтазою жирних кислот. Експресія ензимів регулюється інсуліном [88], а активність ацетил-КоА карбоксилази – цитратом [89], АМФ-активованою протеїнкіназою

[90] й інсуліном [91]. Загалом на процес синтезу однієї молекули пальмітату використовується 8 молекул ацетил-КоА, 7 АТФ і 14 НАДФН, а тому цей енергозатратний процес впливає на дихання ізольованих гепатоцитів.

Унікальною особливістю мітохондрій печінки є те, що за умов голодування ацетил-КоА, утворений у реакціях бета-окиснення жирних кислот, може не лише окиснюватись в циклі трикарбонових кислот, а й використовуватись для кетогенезу. Кетонові тіла (ацетоацетат, β -гідроксибутират і ацетон) утворюються за участі ензимів ацетил-КоА-ацетилтрансферази, мітохондріальної 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-синтази, 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-ліази і β -гідроксибутиратдегідрогенази [92]. Кетонові тіла транспортуються з гепатоцитів у кров і використовуються для забезпечення енергетичних потреб інших органів.

Надзвичайно важливим для організму механізмом утилізації надлишків амонію є цикл сечовини, який працює лише у мітохондріях печінки завдяки експресії всіх необхідних ензимів. Внаслідок входження у цикл карбамоїлфосфату та аспартату дві аміногрупи акумулюються в молекулі сечовини на кінцевому етапі циклу. Менш відомим, однак цікавим аспектом біохімії печінки є відсутність експресії аспарагінсинтази, яка б конкурувала з циклом сечовини за молекули аспартату (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000070669-ASNS/tissue>). І навпаки, у мозку, підшлунковій залозі і лімфоїдних тканинах виявлена висока експресія аспарагінсинтази. З іншої сторони, синтез та більшість шляхів катаболізму аргініну можуть відбуватись лише у печінці.

1.3. Участь мітохондрій у патогенезі алкогольної хвороби печінки

Мітохондрії печінки відіграють ключову роль в окисненні етанолу, а порушення їх функцій є одним із механізмів розвитку алкогольної хвороби печінки. Етанол окиснюється в два етапи: спочатку до ацетальдегіду, а потім до ацетату. Цитозольна алкогольдегідрогеназа, мікосомальний цитохром P450 2E1 і каталаза в пероксисомах каталізують перший етап окислення, перетворюючи

етанол на більш токсичний ацетальдегід. Алкогольдегідрогеназа є найважливішим ферментом першого етапу і окиснює більшість етанолу, однак за високих його концентрацій внесок CYP2E1 зростає [93], [94]. На другому етапі альдегіддегідрогеназа окиснює ацетальдегід до ацетату. Серед 19 ізоформ ALDH2 є найважливішою для окиснення ацетальдегіду в мітохондріях [95].

Загалом у двох реакціях утворюється два молі НАДН для кожного моля етанолу, окисленого до ацетату. У цитозолі алкогольдегідрогеназа підвищує співвідношення НАДН/НАД⁺, а забезпечення НАД⁺ є обмежуючим фактором для реакції. Відновлювальні еквіваленти потрапляють у мітохондрії через малат-аспартатний човниковий механізм, де окиснюються мітохондріальним дихальним ланцюгом із регенерацією НАД⁺ [95]. Мітохондріальний НАДН, утворений за окиснення ацетальдегіду, також мусить бути пізніше окиснений дихальним ланцюгом, або утилізованим іншим механізмом для того, щоб процес окиснення етанолу міг продовжуватися. Експериментально показано, що додавання пірувату до середовища вдвічі прискорює окиснення етанолу в ізольованих гепатоцитах [96] завдяки, очевидно, утилізації НАДН лактатдегідрогеназою.

Печінка є основним органом, що усуває етанол і його токсичний метаболіт ацетальдегід, захищаючи інші органи, особливо центральну нервову систему, після вживання алкоголю. Після вживання етанолу відбувається адаптивне збільшення його метаболізму у печінці як гризунів [97], [98], так і у людей [99]. Цей феномен, який виникає протягом 2–3 годин після одноразової дози алкоголю (наприклад, 5 г/кг), називають швидким підвищенням метаболізму алкоголю, що характеризується також підвищенням швидкості мітохондріального дихання у печінці. Проте навіть невеликі дози (1 г/кг) можуть викликати його [100]. У людей цей ефект також спостерігається після вживання алкоголю в дозі 0,85 г/кг [99].

Вважають, що різке зростання дихання під час окиснення етанолу є адаптивною відповіддю, спрямованою на швидше окиснення токсичного ацетальдегіду завдяки утилізації надлишків НАДН, що утворюються у реакціях

за участі алкогольдегідрогенази і альдегіддегідрогенази. Механізми швидкого підвищення метаболізму етанолу неповністю з'ясовані. Однозначно відомо, що його виникнення вимагає окислення етанолу до ацетальдегіду [101], хоча активність алкогольдегідрогенази чи мікросомальних цитохромів P450 не змінюються у печінці після гострого впливу етанолу [102]. Однак дефіцит і пригнічення алкогольдегідрогенази, а також, у меншій мірі, інгібування цитохрому P450 блокують цей ефект [98].

Зростання швидкості дихання, теоретично, може призводити до збільшення синтезу АТФ. В реальності за дії етанолу рівень АТФ у гепатоцитах знижуються, як *in vivo* за гострого введення етанолу [13], так і у гепатоцитах виділених із тварин після хронічного введення [103]. Значно менш вираженим є вплив етанолу на рівень АТФ у гепатоцитах *in vitro* [104]. Отже, або паралельно видобувається ще сильніше зростання гідролізу АТФ у гепатоцитах, або ж синтез АТФ парадоксально знижується.

Іншою очікуваною зміною за зростання споживання кисню є деполяризація мітохондрій. У дослідженні *in vivo* за допомогою прижиттєвої конфокальної мікроскопії печінки мишей виявлено, що після введення етанолу спостерігалась практично повна мітохондріальна деполяризація [13]. При цьому в окремих гепатоцитах вона відбувалась за принципом «все або нічого». При максимальному дозуванні етанолу (5-6 г/кг) деполяризацію виявили в 85–90% гепатоцитів. Паралельно із цим відбувалось зниження автофлуоресценції НАД(Ф)Н у деполяризованих мітохондріях, що очікувано за одночасної деполяризації і зростання швидкості дихання мітохондрій. Якби причиною цього було суттєве зростання гідролізу АТФ, підвищення концентрації АДФ і швидкості окисного фосфорилування, деполяризація була б відносно невеликою, як у стані з ізольованих мітохондрій [105]. Тому припускають, що всі ці ефекти є наслідком роз'єднання дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях гепатоцитів [13]. Однак для підтвердження цієї гіпотези жоден із запропонованих механізмів не підтверджений.

Мітохондріальна пора перехідної проникності не є відповідальною за етанол-індуковану деполяризацію *in vivo*, оскільки її блокатор циклоспорин А не запобігав етанол-індукованій деполяризації [13]. Білки роз'єднання (UCP) здатні деполяризувати мітохондрії та стимулюють дихання [106]. При ожирінні, стеатозі та різних патологічних станах печінка експресує UCP2, що сприяє ушкодженню, але білок та мРНК UCP2 практично не виявлені в здоровій печінці [107], [108], [109]. Отже, навряд чи можна пояснити деполяризацію мітохондрій активацією UCP2, яка починається на дуже ранньому етапі (1 год після введення етанолу) і розвивається навіть у мишей з нокаутом UCP2 [12].

Важливим аспектом активації швидкого метаболізму етанолу є те, що він виникає лише *in vivo*, а на препаратах ізольованих гепатоцитів етанол не спричиняє таких значних змін дихання [87] чи мембранного потенціалу мітохондрій [13]. Згідно з однією з гіпотез, центральну роль у підвищенні окиснення етанолу відіграють клітини Купфера, що секретують простагландини у відповідь на потрапляння ендотоксинів (що синтезуються мікроорганізмами за наявності етанолу) з кишківника у печінку [101], а простагландин E2 здатний активувати мітохондріальне дихання в гепатоцитах [110].

Стеатоз є майже універсальною ознакою алкогольної хвороби печінки, за винятком випадків прогресивного алкогольного цирозу [111]. Після хронічного впливу етанолу зниження рівня адипонектину [112], пригнічення експресії/активації печінкових PPAR- α та AMPK, [113], [114] порушення сигнального шляху Sirt-1/SREBP-1/lipin-1 [115] [116], а також стрес ендоплазматичного ретикулума [117] інгібують окислення жирних кислот і збільшують їх естерифікацію. Аналогічно, токсини, які пригнічують потрапляння жирних кислот у мітохондрії, інгібують ферменти бета-окислення або порушують окисне фосфорилювання, також досить швидко викликають виражений стеатоз печінки [118], [119], [120]

Алкоголь також активує гормон-чутливу ліпазу у жировій тканині, що посилює ліполіз і мобілізує вільні жирні кислоти в інші органи, включно з печінкою. Завдяки цьому печінка стикається з підвищеним навантаженням

жирними кислотами [121], [122]. З іншої сторони, накопичення продуктів окиснення етанолу, зокрема НАДН, Ацетил-КоА і АТФ створює сприятливі умови, а активація фактору SREBP підвищує синтез жирних кислот *de novo* [123]. Стеатоз розвивається дуже швидко після гострого впливу етанолу і паралельно з стимуляцією мітохондріального дихання алкоголем. Таким чином, адаптивні зміни мітохондрій для метаболізму алкоголю, ймовірно, відіграють ранню роль у розвитку стеатозу. За даними прижиттєвої мікроскопії, стеатоз виникає переважно в гепатоцитах із деполяризованими мітохондріями після гострого впливу етанолу, що свідчить про те, що стеатоз є відповіддю на деполяризацію мітохондрії [13].

Крім того, перицентрально гіпоксія, пов'язана з SIAM, підвищує рівень індукованого гіпоксією фактора-1 α [13], [124]. HIF-1 α індукує експресію білка, пов'язаного з диференціюванням адипоцитів (ADRP), що збільшує накопичення тригліцеридів і запобігає секреції тригліцеридів/ліпопротеїдів у культурах гепатоцитів [125], [126]. Нокаут HIF-1 α у гепатоцитах блокує експресію ADRP у печінці, викликану хронічним впливом алкоголю, і зменшує стеатоз [126].

Відомо, що мітофагію другого типу запускає деполяризація мітохондрій [127], [128], [129], [130]. Тому вважають, що деполяризація після впливу етанолу, ймовірно, ініціює утворення мітофагосом в гепатоцитах. Це підтверджують експерименти на трансгенних мишах LC3-GFP, які демонструють, що мітофагосоми з'являються переважно в гепатоцитах із деполяризованими мітохондріями після гострого впливу етанолу [12]. Також після хронічного впливу етанолу підвищується рівень PINK1, тоді як ослаблення деполяризації за допомогою Alda-1 зменшує накопичення PINK1 [12]. Інші дослідження також показують, що PINK1 і паркін (PRKN) беруть участь у мітохондріальній автофагії після впливу етанолу [131]. Інгібітори мітохондріальної пори перехідної провідності, такі як CsA і NIM811, можуть інгібувати автофагію в гепатоцитах, а дефіцит регулятора пори циклофіліну D порушує автофагію та знижує чутливість пори у мітохондріях мишей після хронічного впливу алкоголю, що вказує на можливу роль пори у запуску автофагії [132], [133].

Для підтримки гомеостазу мітохондрій після їх втрати за мітофагії їх кількість у клітині може бути збільшена шляхом біогенезу. На користь посиленого біогенезу мітохондрій свідчать дані, що внутрішньошлункове введення етанолу активує головний регулятор біогенезу мітохондрій PGC-1 α , мітохондріальний транскрипційний фактор А (TFAM) [14], [134]. Проте дані про зміни PGC-1 α , сіртуїнів (деацетилаз, які регулюють активність PGC-1 α) і білків окисного фосфорилювання після хронічного впливу етанолу є суперечливими у різних дослідженнях [14], [134], [135], [136]. У сукупності зміни структури, функцій, біогенезу мітохондрій і мітофагії свідчать про те, що після хронічного впливу алкоголю відбувається перебудова мітохондрій, яка може відображати процеси відновлення та регенерації або сприяти патогенезу алкогольної хвороби печінки.

Отже, мітохондрії гепатоцитів адаптуються до дії етанолу як за гострого, так і хронічного його впливу, однак їх адаптаційних механізмів недостатньо за тривалого зловживання алкоголем. На сьогодні нема ефективної фармакологічної стратегії підвищення адаптаційної здатності мітохондрій печінки для покращення швидкості окиснення етанолу за гострої інтоксикації.

1.4. Особливості біоенергетичних процесів ацинарних клітин підшлункової залози

Ацинарні клітини підшлункової залози становлять 80% маси органу і синтезують велику кількість білка (травних ферментів) в організмі. Для забезпечення їх функцій необхідна велика кількість енергії. На даний момент достеменно не з'ясовано, які джерела енергії є пріоритетними для цих клітин: вуглеводи, ліпіди чи амінокислоти. Відомо, що в плазматичній мембрані ацинарних клітин знаходиться велика кількість транспортерів амінокислот різних типів [32], що може свідчити як про важливу пластичну, так і енергетичну роль амінокислот у цих клітинах. У дослідженні Arauа et al. показали, що глутамін активно транспортується і, перетворюючись у α -кетоглутарат,

залучається в процеси окиснення в циклі Кребса [137]. Інші дослідники вказують на важливу роль аланіну і лейцину в забезпеченні енергетичних потреб підшлункової залози мишей [35].

Було здійснено декілька спроб оцінити відносний вклад окисного фосфорилування і гліколізу в загальний синтез АТФ ацинарними клітинами підшлункової залози. Дослідження із використанням мітохондріальних інгібіторів олігоміцину чи антимицину показали, що мітохондрії продукують 60–85 % АТФ [18], [138], [139]. За умов аноксії рівень АТФ у клітинах знижувався до 8–21% [30], [138]. Варто зазначити, що всі ці оцінки ґрунтуються на визначенні рівня АТФ за невідомої швидкості його утилізації та синтезу, що унеможливорює точне встановлення вкладу того чи іншого шляху окиснення.

Швидкість гліколізу і окисного фосфорилування у ацинарних клітинах залежать від потреб у АТФ і можуть зростати за фізіологічної стимуляції. Зокрема, інсулін через активацію його рецепторів у ацинарних панкреацитах [140] підсилює гліколітичний синтез АТФ [141], захищаючи клітини від загибелі через перевантаження Ca^{2+} [142]. Однак деталі цього механізму не з'ясовані.

Важливим аспектом морфології ацинарних клітин є їх поляризація: через базальну мембрану речовини надходять з крові у клітину, латеральними мембранами клітини контактують між собою, а секреція відбувається через апікальну мембрану. Відповідно до цього мітохондрії також в основному скупчені в певних ділянках клітини: в апікальній ділянці на межі формування секреторних гранул, поблизу ядра і вздовж базальної [143]. Важливою є роль мітохондрій, що створюють межу навколо секреторних везикул і відділяють цю зону від ядра: ці мітохондрії поглинають значну кількість Ca^{2+} , таким чином обмежуючи поширення Ca^{2+} лише апікальною ділянкою [144], а також, очевидно, забезпечують енергозатратні процеси секреції.

Підшлункова залоза є класичним модельним об'єктом для вивчення ролі Ca^{2+} -сигналювання у регуляції секреції. Тому добре дослідженою є регуляція окисного фосфорилування за стимуляції екзокринної секреції первинними агоністами ацетилхоліном і холецистокініном, що опосередкована через

вивільнення Ca^{2+} з внутрішноклітинного депо [145], [146]. Паралельно із запуском секреції, йони Ca^{2+} транспортуються у мітохондрії кальцієвим уніпортером, нокаут якого пригнічує стимульовану секрецію [22]. В мітохондріях йони Ca^{2+} , як вважають, активують Ca^{2+} -залежні ензими циклу Кребса ізоцитратдегідрогеназу, α -кетоглутаратдегідрогеназу і піруватдегідрогеназу [147], [148], [149], що ще не було продемонстровано у підшлунковій залозі. На препаратах пермеабілізованих панкреатичних ацинусів ми раніше довели залежність швидкості піруват-стимульованого дихання від концентрації Ca^{2+} [150].

Завдяки спрацюванню механізму «на випередження» збільшення синтезу АТФ відбувається швидше, ніж зростання його витрат внаслідок секреції. Тому рівень АТФ у цитозолі ацинарних клітин під час активації секреції не змінюється або навіть зростає [18]. В результаті дії первинних агоністів у ацинарних клітинах відбувається деяке зниження мітохондріального мембранного потенціалу [21] й компенсаторне зростання швидкості дихання [75], [151] та рівня НАДН [20]. Таку тісну взаємодію між Ca^{2+} -сигналюванням і мітохондріальним окисненням забезпечує колокалізація Ca^{2+} -уніпортерів мітохондрій та каналів вивільнення Ca^{2+} ендоплазматичного ретикулума, що досягається завдяки зв'язкам між білками між зовнішньою мембраною мітохондрій і асоційованими з нею мембранами ретикулума [152]. Це необхідно для тонкої та швидкої регуляції дихання ацинарних клітин у відповідь на стимуляцію секреції.

1.5. Роль порушень мітохондріальних функцій у патогенезі гострого панкреатиту

Основними чинниками розвитку гострого панкреатиту у людини є алкоголь [153] та жовчокам'яна хвороба [154]. Тому спочатку розглянемо механізми патологічної дії алкоголю та жовчевих кислот на підшлункову залозу.

Ацинарні клітини підшлункової залози здатні метаболізувати етанол двома шляхами: окисним до ацетальдегіду та неокисним шляхом утворення його

естерів з жирними кислотами [155], [156], [157]. Саме ці метаболіти, а не етанол [158], мають значний токсичний вплив на ацинарні клітини. При цьому, швидкість неокисного метаболізму приблизно в 20 разів нижча, ніж окисного [156], [157]. Хоча деякі дослідження обґрунтовують важливість впливів ацетальдегіду на підшлункову залозу у патогенезі гострого панкреатиту [159], [160], [161], на сьогодні вважають, що саме неокисний метаболізм етанолу є важливим у розвитку гострого панкреатиту [11], [162], [163], [164], [165]. Відомо, що у підшлунковій залозі пацієнтів, що зловживали алкоголем, накопичуються високі концентрації естерів жирних кислот [166]. У дослідженні Вернера з колегами показано, що пригнічення окисного метаболізму підвищувало генерацію та посилювало ураження підшлункової залози щурів на моделі алкогольного панкреатиту [162]. Дослідження *in vitro* на ацинарних клітинах тварин [11], [163], [164] і людей [164], [165] підтверджують ці результати.

Станом на сьогодні основною гіпотезою механізму токсичного впливу етилових естерів жирних кислот є неконтрольоване вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо, надмірне накопичення Ca^{2+} у мітохондріях, що веде до падіння мітохондріального мембранного потенціалу, зниження синтезу АТФ та, як результат, загибелі ацинарних клітин [163], [164], [167]. Можливим також є і прямий негативний вплив деестерифікованих у мітохондріях жирних кислот на їх мембранний потенціал [168], а самі жирні кислоти є більш токсичними для підшлункової залози, ніж їх етилові естери [169]. Цей факт добре узгоджується із високою частотою виникнення гострого панкреатиту у пацієнтів з автосомною рецесивною недостатністю ліпопротеїн ліпази, у яких у крові дуже високий рівень тригліцеридів [170]. Важливим етапом у розвитку ушкодження ацинарних клітин вважають передчасну внутрішньоклітинну активацію трипсину, яка відбувається й за дії естерів жирних кислот [165], [167], [168], а також секрецію клітинами прозапальних цитокінів, таких як IL-6, IL-8, TNF- α [163], [165], [169]. Додатковим механізмом може бути пригнічення етанолом експресії хлорного каналу CFTR у протокових клітин, що спричиняє затримку руху секрету [171]. Проте значною мірою залишається нез'ясованим, яким чином пов'язані

мітохондріальне ураження і надмірне вивільнення Ca^{2+} з активацією трипсину всередині клітин, як і послідовність цих подій [168].

На сьогодні існують три гіпотези, як жовчокам'яна хвороба може спричиняти гострий панкреатит. Перші дві гіпотези висунув Юджин Опі ще у 1901 р [172], [173]. Згідно першої з них, закупорка жовчним каменем протоки підшлункової залози призводить до припинення секреції панкреатичного соку, збільшення тиску всередині протоки і розвитку панкреатиту. Друга гіпотеза вказує на можливість перекривання сфінктера Одді і результуючого потрапляння жовчі через протоку підшлункової залози до ацинарних клітин, що й спричиняє панкреатит. На сьогодні ці гіпотези вважають малоімовірними через особливості анатомії проток та результати досліджень на моделях тварин. Зокрема, тиск у протоці підшлункової залози значно вищий, ніж у жовчній протоці [174]; деякі пацієнти з гострим панкреатитом мають повністю роз'єднані жовчну і панкреатичну протоки [175]; і нарешті, експериментальне [176] чи випадкове [177] потрапляння жовчі у протоку підшлункової залози саме по собі не спричиняло панкреатит. Ці факти ставлять під сумнів потрапляння жовчі у протоку підшлункової залози як фактор розвитку панкреатиту.

З іншої сторони, саме по собі перекривання протоки підшлункової залози може спричиняти гострий панкреатит на моделях тварин [178], [179] і у людей [180], що начебто підтверджує першу гіпотезу. Проте на сьогодні вважають, що лише блокування панкреатичної протоки не повністю пояснює наявні дані і висувають третю гіпотезу, згідно якої важливим фактором є також блокування жовчної протоки і, як наслідок, збільшення концентрації жовчних кислот у крові й тканинній рідині. На це вказує значне підсилення важкості експериментального гострого панкреатиту за умов додаткового перев'язування жовчної протоки [181], а також докази прямого негативного впливу жовчних кислот на ацинарні клітини [21], [167], [182].

Механізми негативного впливу жовчних кислот пов'язані з їх здатністю підвищувати цитозольну $[\text{Ca}^{2+}]$ як шляхом PI_3K -залежного пригнічення Ca^{2+} -помпи ендоплазматичного ретикулума [183], так і активації ріанодинчутливих і

ІФ₃-чутливих каналів вивільнення Ca^{2+} [184]. Внутрішньоклітинна активація трипсиногену може відбуватись за одночасної дії катіонів Ca^{2+} і жовчних кислот [185]. Відомо також, що жовчні кислоти можуть спричиняти активацію неспецифічних катіонних каналів плазматичної мембрани [186], деполяризацію мітохондрій [21] і зниження концентрації АТФ у клітинах [18], [167], [187]. Всі ці процеси можуть бути причиною загибелі ацинарних клітин, що було продемонстровано *in vitro* [167], [187].

Менш частими, однак краще зрозумілими, є випадки гострого панкреатиту, пов'язані з генетичними мутаціями. Тут слід одразу зазначити, що у пацієнтів з відомими мітохондріальними спадковими захворюваннями не виявлено зростання частоти виникнення гострого панкреатиту. Однак зафіксовано фіброз і дисфункцію екзокринної частини підшлункової залози у людей з синдромом Пірсона, спричиненим делецією мітохондріальної ДНК [188], [189]. З іншої сторони, мутації у генах транспорту чи метаболізму амінокислот асоційовані зі зростанням частоти виникнення гострого панкреатиту. У близько чверті пацієнтів з цитрулінемією другого типу з дефектом транспортера аспартату і глутамату хоча б раз в житті виникає епізод панкреатиту [37]. Описані часті випадки повторюваного гострого панкреатиту і закупорки проток підшлункової залози у людей з лізинуричною непереносимістю білка [36], [38]. Ця тяжка спадкова хвороба виникає через дефект гену *SLC7A7*, що кодує компонент транспортера катіонних амінокислот. Панкреатит також часто виникає за дефіциту пропіоніл-КоА карбоксилази (пропіонічна ацидемія) [39].

До генів, які не пов'язані з метаболізмом чи мітохондріями і мутації яких пов'язані з підвищеним ризиком панкреатиту належить першу чергу *PRSS1* (катіонний трипсиноген). Спадковий панкреатит з високою пенетрантністю (80%) виникає за мутацій *PRSS1* [190]. До інших генів, варіанти яких асоційовані з гострим панкреатитом, належать *SPINK1* (панкреатичний секреторний інгібітор трипсину), *CTRC* (хімотрипсин), *CPA1* карбоксилпептидаза А1 і *CFTR* (хлорний канал, що відомий як регулятор трансмембранної провідності при муковісцидозі) [191], [192], [193]. Ці важливі генетичні фактори ризику розвитку панкреатиту

пов'язані із внутрішньоклітинною активацією трипсиногену [194] або зниженням швидкості руху секрету у протоках [171].

Частим побічним ефектом лікування гострого лімфобластного лейкозу у дітей аспарагіназою є гострий панкреатит [40], однак причини такої дії препарату остаточно не з'ясовані. Раніше вважали, що зміни рівня амінокислот у плазмі внаслідок дії аспарагінази є причиною гострого панкреатиту [195], проте новіші дослідження не виявили різниці у дії аспарагінази за наявності чи відсутності аспарагіну на ацинарні клітини *in vitro* [196]. У цьому дослідженні постулюють активацію білка PAR2 аспарагіназою з подальшою генерацією токсичних Ca^{2+} -сигналів у клітинах [196]. Згідно іншого дослідження, зниження експресії FGF21 у ацинарних клітинах є механізмом гострого панкреатиту за дії аспарагінази [197].

Більш рідкісною причиною гострого панкреатиту може надмірне вживання аргініну як харчової добавки: на цей момент зафіксовано два випадки гострого панкреатиту, ймовірно пов'язані із цим [55], [56]. Останнім часом набули значної популярності моделі гострого панкреатиту гризунів з використанням високих доз основних амінокислот, зокрема, аргініну, орнітину, лізину і гістидину [54], [58]. За моделі аргінінового панкреатиту у підшлунковій залозі гризунів зростає експресія білків HPS70 і HSP27 [198], виникають ознаки Ca^{2+} -незалежного ушкодження мітохондрій, стрес ендоплазматичного ретикулума і порушення процесів автофагії [59]. За введення високих доз лізину тваринам також виникає як ушкодження мітохондрій [58], так і ендоплазматичного ретикулума [199]. Подібні Ca^{2+} -незалежні механізми розвитку гістидинового панкреатиту в гризунів [59] включають, тим не менше, активацію циклофіліну D , важливого регулятора пори перехідної провідності [54]. Проте невідомо, наскільки ці механізми реалізовані в патогенезі захворювання людини.

Наприкінці розділу варто згадати ще одну тваринну модель гострого панкреатиту, яка є однією з найбільш поширених і найкраще досліджених, але, як зараз вважають, має незначне відношення до патогенезу захворювання у людини. Проте ця модель має значну подібність у біохімічних, морфологічних та

патологічних аспектах до людського панкреатиту. Йдеться про модель гіперстимуляції холецистокініном чи його аналогом церулеїном у гризунів. Введення тваринам надфізіологічних доз цих гормонів призводить до легкої форми панкреатиту з повною ремісією [200]. Донедавна вважали, що у людини холецистокінін прямо не стимулює ацинарні клітини [201], а діє через активацію нервових гангліїв з подальшим вивільненням ацетилхоліну. Однак новіші дослідження підтвердили як експресію холецистокінінових рецепторів, такі і функціональну відповідь ацинарних клітин людини на цей гормон [202], [203]. Насправді, модель холецистокінінового панкреатиту має низьку релевантність через дуже незначну кількість випадків гіперстимуляції секреції підшлункової залози людини. Таке може спостерігатись за укусів скорпіонів [204], що підвищують вивільнення ацетилхоліну або за дії інгібіторів холінестерази [205].

Дослідження патогенетичних механізмів *in vitro* показали, що гіперстимуляція гормонами спричиняє генерацію тривалих токсичних Ca^{2+} -сигналів [206], дезорганізацію цитоскелету і блеббінг [207], а також внутрішньоклітинну активацію трипсиногену [208]. Поряд із цим, вважають, що перевантаження мітохондрій Ca^{2+} , їх деполяризація та активація пори перехідної провідності є важливим механізмом загибелі ацинарних клітин за гіперстимуляції гормонами [82], [158].

Отже, гострий панкреатит виникає як внаслідок факторів середовища, так і генетичної схильності. У частині випадків доведено залучення мітохондрій у розвитку цього захворювання. Ключовим залишається питання, чи є порушення мітохондріальних функцій ацинарних клітин *in vitro* за дії різних токсинів [167] ранньою подією, що піддається фармакологічній корекції, а чи лише відображає кінцеві незворотні етапи загибелі клітини.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали

Всі використані реагенти були найкращої доступної чистоти. Більшість була придбана у компанії Sigma-Aldrich (тепер Merck Millipore), зокрема:

- 1) неорганічні солі: натрію хлорид, калію хлорид, кальцію хлорид, динатрію гідрофосфат, калію дигідрофосфат, дикалію гідрогенфосфат;
- 2) органічні кислоти, субстрати окиснення і амінокислоти: глюкоза, натрію піруват, яблучна кислота (малат), бурштинова кислота (сукцинат), натрію цитрат, ізолимонна кислота (ізоцитрат), монометилсукцинат, α -кетоглутарат, диметил- α -кетоглутарат, β -гідроксибутират, глутамін, глутамат, аланін, аспарагін, аспарагінова кислота, лізин, гістидин, аргінін, додаток незамінних амінокислот для середовища MEM;
- 3) барвники: етидію бромід, пропідію йодид, ксилол ціанол, бромфеноловий синій, Hoechst 33258, тетраметилродамін метиловий естер перхлорат (TMRM), дигідроетидій;
- 4) специфічні інгібітори та агоністи: циклоспорин А, олігоміцин А, карбонілціанід-р-трифлуорометоксифенілгідрозон (FCCP), ротенон, ацетилхолін, бромопіруват;
- 5) білки, ензими та пептиди: (Tyr[SO₃H]²⁷) холецистокінін октапептиду (26-33) амід (ХЦК), колагеназа (тип IV), протеїназа К, РНКаза А, соєвий інгібітор трипсину, бичачий сироватковий альбумін (БСА);
- 6) детергенти та інші органічні речовини: Тритон X-100, ноніл феноксиполіетоксилетанол (NP-40), натрію додецилсульфат, формальдегід, етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), етиленглікольтетраацетат (ЕГТА), тріс-оксиметиламінометан (Tris), N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота (HEPES), 2,4-динітро-1-флуоробензен, агароза, сахароза, аденозиндифосфат (АДФ), гуанідиній тіоціанат, фенол, хлороформ, амонію ацетат.

Оксид осмію, був придбаний у SPI-chem, родамін 123, какодилат натрію, пропіленоксид і смола Epson 812 у Fluka, диметилсульфоксид – у Carlo Erba reagents, ацетонітрил у Macron, сахароза – у Carl Roth, а середовище DMEM – у Thermo Fisher Scientific.

2.2. Експериментальні тварини

Експерименти проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 200–350 г. Тварини перебували у віварії в клітках у групах по 6 за кімнатної температури і дванадцятигодинного циклу освітлення. За винятком деяких дослідних груп тварин описаних нижче, їм згодовували збалансований корм компанії «D-Мікс». У дослідженнях підшлункової залози та печінки перед експериментом тварини голодували одну ніч, але мали доступ до води.

Усі процедури та експерименти з тваринами проводили згідно «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях» та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Проведення експериментів було узгоджено і затверджено комісією з питань біоетики біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

2.3. Введення препаратів та модифікації раціону тварин

Було проведено декілька експериментів *in vivo* на щурах: один гострий (одноразове введення речовин) та три хронічні. У гострому експерименті тварин розділяли на чотири групи: контроль, введення етанолу, введення ХЦК та комбіноване введення етанолу і ХЦК. Етанол (40%, 4 г/кг маси тварини) вводили перорально у шлунок через зонд за дві години до декапітації. У контролі вводили питну воду. Розчин ХЦК (10 нмоль/л на основі фізіологічного розчину) вводили в очеревину інсуліновим шприцом у розрахунку 20 пмоль/кг маси тварини за 1 годину до декапітації. Тобто у групі 4 ХЦК вводили 1 годину після етанолу. Тваринам, яким не вводили ХЦК, робили разову ін'єкцію 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину.

Для моделювання гострого панкреатиту тваринам внутрішньо-очеревинно вводили дві дози L-аргінін-HCl (pH=7,4) у розрахунку 2,5 г на кг маси тварини з інтервалом в одну годину, як описано раніше [209]. Частині тварин через 72 години розпочинали вводити натрій піруват (1 г на кг маси тварини на добу). Цю загальну дозу розділяли на три введення впродовж доби (о 8, 14 і 20 год.). Ці процедури здійснювали впродовж чотирьох днів. У всіх випадках контрольним тваринам вводили відповідні об'єми фізіологічного розчину.

У іншому експерименті тварини тваринам згодовували модифікований корм з високим вмістом свинячого смальцю (35% за калорійністю) впродовж двох тижнів. Дослідній групі тварин також щодня вводили розчин етанолу (40%) у шлунок у розрахунку 6 г на кг маси тварини.

Також проводили хронічний експеримент впродовж 7 тижнів для дослідження впливу харчового раціону з високим вмістом жирів (смалець) або високим вмістом жирів та цукрів (сахароза). Дані про склад модифікованих кормів представлені у таблиці 2.1. Цукор та смалець додавали до сухого корму, до води не додавали нічого.

Таблиця 2.1

Вміст поживних речовин у раціоні тварин, у % від загальної калорійності

	Стандартний корм	Високий вміст жирів	Високий вміст жирів і цукрів
Білки	21,5	14,1	9,2
Жири:	6,5	38,7	40,8
<i>смалець</i>	0	34,4	38,0
<i>інші жири</i>	6,5	4,3	2,8
Вуглеводи:	72,0	47,2	50,0
<i>цукор</i>	0	0	19,4
<i>інші вуглеводи</i>	72,0	47,2	30,6
Енергетична цінність (ккал/г)	3,03	3,92	4,26

2.4. Виділення, початкова оцінка життєздатності і морфології ізольованих панкреатичних ацинусів

Життєздатні та функціонально активні ізольовані ацинуси отримували із підшлункової залози щурів масою 250-300 г. Спільну жовчну протоку міцно перев'язували лігатурою в її дистальній ділянці поряд із дванадцятипалою кишкою. Іншу лігатуру підводили під проксимальну частину протоки (0,5 см від печінки). У місці другої лігатури зі сторони печінки у протоку вводили голку із шприцом і зав'язували лігатуру. Через протоку в тканину підшлункової залози шприцом вводили 3,5–5 мл (залежно від розміру залози) базового позаклітинного середовища, що також містило колагеназу (тип 4) у концентрації 220 од./мл. Після введення розчину набряклу підшлункову залозу було легко відрізнити від оточуючої жирової та сполучної тканини. Її відпрепаровували та поміщали у невелику пластикову чашку Петрі із залишками середовища інкубації зі шприца. Обережно за допомогою пінцету та ножиць видаляли жирову тканину, але протоки та лігатури поки що залишали, щоб запобігти витoku розчину з колагеназою із тканини підшлункової залози.

Залозу із середовищем поміщали у скляну конічну колбу об'ємом 25 мл, повітря в колбі замінляли на чистий кисень, продуваючи його в колбу впродовж 5 с, а колбу щільно закривали гумовим корком. Колбу з тканиною поміщали у водяну баню та інкубували за температури 37 °C впродовж 15 хв, струшуючи з частотою 1–3 Гц. Сила струшування та глибина занурення колби у водяну баню була такою, щоб тканина і середовище переміщувались у колбі, але не піднімались вище третини її висоти. Після завершення інкубації розчин із колби відбирали мікропіпеткою, додавали ще 5 мл цього ж середовища з колагеназою, знову вносили чистий кисень і закривали колбу. Продовжували інкубацію підшлункової залози ще 15 хв, як і раніше. Цю процедуру проводили двічі. Тобто, загальний час інкубації підшлункової залози із колагеназою становив 45 хв.

Після інкубації тканину залози із середовищем переміщали у чашку Петрі і видаляли лігатури, залишки проток, судин, лімфатичних вузлів та жирової

тканини, якщо вони були присутні. Тканину підшлункової залози обережно поміщали у скляну пробірку об'ємом 10 мл, додавали базове середовище інкубації для підшлункової залози кімнатної температури до мітки 4–6 мл, залежно від розміру залози. Готували 3 пластикові наконечники до мікропіпетки об'ємом 1 мл із обрізаними та заплавленими вогнем кінцями так, щоб діаметри їх отворів становили 2, 1,5 та 1 мм. Тканину підшлункової залози диспергували механічно шляхом повільного і плавного багаторазового пропускання через серію заготовлених наконечників, починаючи з найбільшого діаметра. Перехід до меншого діаметра здійснювали лише тоді, коли вся тканина у пробірці вільно проходила через наконечник. У жодному випадку не здійснювали додаткових зусиль, якщо під час проходження тканини відчувався значний опір чи відбувалась закупорка. Також уникали потрапляння повітря до суспензії і спінювання.

Для вилучення залишків тканини, що не піддались диспергуванню, суспензію панкреатичних ацинусів фільтрували через тканинний фільтр (органза) з діаметром пор <150 мкм. Фільтрат нашаровували над 5 мл базового середовища інкубації з 4 %-им вмістом бичачого сироваткового альбуміну (БСА) у 2 пробірках і осаджували впродовж 5 хв при 50 g для видалення поодиноких клітин, їх уламків та можливих залишків ліпідів. Надосадову рідину зливали, а осад розчиняли у базовому середовищі і повторювали центрифугування з розчином БСА, як і попереднього разу. Після цього ізольовані панкреатичні ацинуси зберігали у конічній колбі об'ємом 250 мл у 15 мл базового позаклітинного середовища, що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0, глутамін – 2,0, піруват – 2,0, глюкоза – 10,0; БСА – 2,5 мг/ мл; соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл та незамінні амінокислоти для середовища MEM. рН встановлювали на рівні 7,4 за допомогою NaOH. За таких умов ацинуси не втрачали життєздатності впродовж 6 годин.

Кількість клітин у ацинусах підраховували у камері Горяєва, а життєздатність клітин у ацинусах оцінювали за фарбуванням трипановим синім

(0,1%). Слід зазначити проблематичність точної оцінки кількості життєздатних (трипан-негативних) клітин у ацинусах зважаючи на їх складну тривимірну структуру. Однак ще до початку проведення інших аналізів (дослідження клітинного дихання, секреції амілази, екстракції ДНК тощо) було необхідно швидко оцінити якість отриманого препарату та концентрацію клітин у ньому, тому інші методи, такі як визначення вивільнення лактатдегідрогенази чи кількості білка, були недостатньо швидкими. Спроби розділити отримані ацинуси на ізольовані клітини для їх більш точного підрахунку за допомогою інкубування у безкальцієвому середовищі, як описано Вільямсом [210], не увінчались успіхом: ацинуси або не розділялись, або суттєво знижувалась життєздатність клітин. Спроби оцінити кількість клітин за оптичною густиною суспензії теж були невдалими: у різних препаратах розміри ізольованих груп були різними, а тому калібрувальні криві у різних експериментах не відтворювались. Тому для підвищення точності у кожному експерименті підраховували велику кількість (> 500) ацинарних клітин за двох окремих повторів. Оцінена життєздатність отриманих препаратів ізольованих ацинусів становила 90–99%. Вона, ймовірно, була у багатьох випадках навіть вищою, оскільки виявити і підрахувати мертві трипан-позитивні клітини легше, ніж живі. Флуоресцентний метод оцінки кількості ядер з барвниками Hoechst 33258 і пропідій йодидом виявився більш точним, але його використовували лише у експериментах з визначенням впливу речовин на життєздатність клітин, а не для первинної оцінки кількості тканини.

Підрахунок кількості периферичних клітин в ацинусах, що мали морфологічні зміни плазматичної мембрани (випинання, «блеби») здійснювали в одній фокальній площині. Величини перпендикулярних діаметрів ацинарних клітин вимірювали за допомогою програмного забезпечення CellSens Dimension з метою подальшого розрахунку їх апроксимованої площі за формулою площі еліпса:

$$S = \pi \times A \times B / 4,$$

де A і B – перпендикулярні діаметри еліпса.

2.5. Виділення ізольованих гепатоцитів

Ізольовані гепатоцити щурів отримували шляхом двостадійної перфузії за Сегленом [211]. При цьому, використовували два різні способи перфузії печінки: класична перфузія *in situ* або спрощена перфузія *in vitro*. Класичну перфузію печінки *in situ* здійснювали прижиттєво у тварин, наркотизованих тіопенталом натрію (внутрішньоочеревинно, 40 мг/кг маси тіла). Глибину наркозу контролювали, натискаючи пінцетом на хвіст до втрати больової чутливості. Після прижиттєвого розтину черевної порожнини, в нижню порожнисту вену вводили 0,3 мл гепарину (5000 МО/мл). Перфузуючий розчин вводили через катетер (1,3 × 45 мм), поміщений у ворітну вену печінки, а відтік крові й розчину відбувався через здійснювали надріз у нижній порожнистій вені.

На першому етапі перфузії у ворітну вену подавали перфузійне середовище 1, що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, глюкоза – 5,0, HEPES – 10,0, EGTA – 1; pH встановлювали на рівні 7,4 за допомогою NaOH. На другому етапі впродовж 10–12 хв за температури 37 °C зі швидкістю 20 мл/хв рециркуляторно перфузували через правий шлуночок серця та ворітну вену перфузійним середовищем 2, що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 3,0, MgCl₂ – 1,0, глюкоза – 5,0, HEPES – 10,0; колагеназа (тип 4, 108 од./мл); pH 7,4 (NaOH).

У випадку спрощеної перфузії печінки *in vitro* тварину декапітували, розтинали черевну порожнину, видаляли ліву медіальну та ліву латеральну частки печінки, поміщали на спеціальну скляну поверхню для перфузії і по чергові вводили попередньо затуплену голку в гілки портальної. Через голку подавали перфузійні середовища 1 та 2 зі швидкістю 20 мл/хв за температури 37°C.

Після перфузії печінку поміщали у базове позаклітинне середовище для гепатоцитів, що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, глюкоза – 5,0, HEPES – 10,0; pH 7,4 (NaOH). Далі гепатоцити диспергували шляхом багаторазового пропускання через скляну піпетку (10 мл) та фільтрували суспензію через нейлоновий фільтр (діаметр пор 100 мкм). Суспензію тричі

очищали від ушкоджених клітин, їх фрагментів і метаболітів за допомогою центрифугування (50 g, 1 хв).

Кількість гепатоцитів та початкову оцінку їх життєздатність оцінювали з використанням камери Горяєва, фарбуючи їх 0,1 %-им розчином трипанового синього. Кількість живих трипан-негативних клітин у експериментах була > 80 %.

2.6. Отримання препаратів ізольованих мітохондрій печінки

Печінку перфузували середовищем виділення, що містило, ммоль/л: сахароза – 250,0, EGTA – 1,0, HEPES – 10,0, pH 7,2 (KOH), після чого гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Елвеґ'єма. Мітохондрії печінки щурів отримували стандартним методом диференційного центрифугування з охолодженням до 4 °C (600 g, 10 хв на першому етапі, 8000 g; 10 хв на другому етапі, двічі) у середовищі виділення. Препарати мітохондрій зберігали на льоді.

2.7. Споживання кисню клітинами та мітохондріями

Споживання кисню реєстрували полярографічним методом за допомогою кисневого електрода Кларка. У експериментах використовували дві різні установки: біологічний кисневий монітор YSI 5300 з однією закритою термостатованою коміркою об'ємом 1,6 мл та шестиканальний полярограф Strathkelvin SI929 з шістьма термостатованими комірками з регульованим об'ємом 1–3 мл. Клітинне дихання реєстрували за 37 °C.

У дослідженнях ізольованих клітин чи панкреатичних ацинусів перед реєструванням споживання кисню їх преінкубували у середовищах з додаванням окисних субстратів впродовж як мінімум 15 хв за 37 °C. Часто в контролі дихання панкреатичних ацинусів досліджували у базовому позаклітинному середовищі (розділ 2.4) або середовищі без субстратів, що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0; БСА – 2,5 мг/мл; соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл; pH=7,4 (NaOH). Базове безсубстратне середовище інкубації гепатоцитів та клітин NK/Ly містило, ммоль/л: NaCl –

140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0; pH=7,4 (NaOH). Залежно від експерименту, до цих базових середовищ додавали (ммоль/л): глюкозу (5,0 – гепатоцити або 10,0 – інші клітини), піруват натрію (2,0), сукцинат (2,0), монометилсукцинат (2,0), α-кетоглутарат (2,0), диметил-α-кетоглутарат (2,0), малат (2,0), ізоцитрат (2,0), глутамін (2,0). Для дослідження максимальної швидкості споживання кисню ізольованими клітинами у комірку вносили аліквоти протонатора FCCP (по 0,25 або 0,5 мкмоль/л) до максимальної сумарної концентрації 2 мкмоль/л з проміжком часу ~2 хв між внесеннями. Для вивчення олігоміцин-нечутливого дихання у комірку додавали інгібітор АТФ-синтази олігоміцин (5 мкмоль/л).

У деяких експериментах здійснювали пермеабілізацію гепатоцитів дигітоніном у розрахунку 20 мкг / млн клітин впродовж 10 хв у середовищі, що містило, ммоль/л: KCl – 90,0; NaCl – 15,0; MgCl₂ – 1,0; KН₂РO₄ – 2; EGTA – 0,5; HEPES–10,0; pH 7,2 (KOH). У цьому ж розчині досліджували дихання клітин.

Споживання кисню ізольованими мітохондріями досліджували за 26°C у середовищі, що містило, ммоль/л: сахароза – 250,0, EGTA – 0,1, HEPES – 10,0, K₂НРO₄ – 2,0, MgCl₂ – 0,5, pH 7,2 (KOH). У полярографічну комірку додавали речовини у такій послідовності: субстрати окиснення, АДФ (100 мкмоль/л), АДФ (750 мкмоль/л), FCCP (0.1–0.2 мкмоль/л).

2.8. Флуоресцентна мікроскопія

Флуоресцентну мікроскопію проводили в основному за допомогою інвертованого мікроскопа IX73 та камери DP-74 (Olympus). У деяких експериментах також використовували мікроскоп Fluo Axio Imager A1 і камеру AxioCam MRm (Zeiss) або навіть модифікований мікроскоп ЛЮМАМ-I-1 з додатково вбудованим потужним джерелом світла LED (505 нм) та фотокамерою Nikon D3000. Зображення обробляли за допомогою програми ImageJ. Для покращення якості флуоресцентних зображень для деяких з них проводили деконволюцію 10 фокальних площин з відстанню 1 мкм між ними по осі z

(рис. 2.1). Для підрахунку сигналу використовували лише оригінальні зображення.

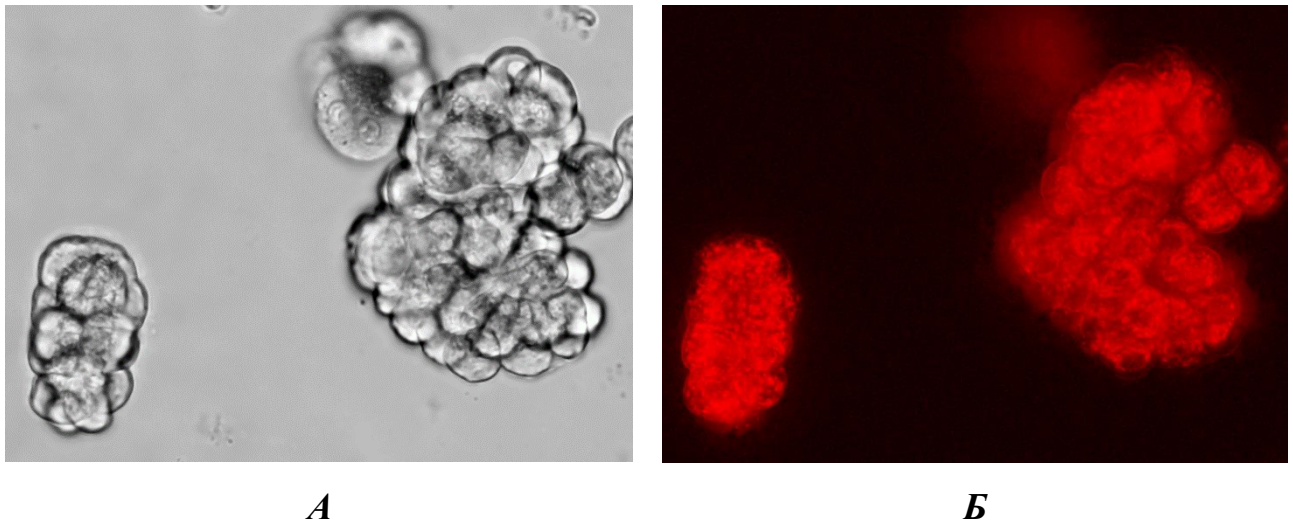


Рис. 2.1. Мікрофотографії ацинусів підшлункової залози: А – світлова мікроскопія, Б – флуоресценція барвника TMRM, що акумулюється у мітохондріях, на зображенні результати деконволюції 10 фотографій у різних фокальних площинах

У дослідженнях, в яких проводили статистичну обробку даних мікроскопії, здійснювали фотографування як мінімум 5 різних ділянок з клітинами у кожному повторі з сумарною кількістю клітин як мінімум 200.

У таблиці 2.2 представлено параметри дослідження різних флуоресцентних сигналів. Оскільки камера DP-74 кольорова, можна було аналізувати одночасно сигнали декількох флуорофорів, розділяючи зображення на 3 канали (синій, зелений та червоний). Пізніше ці канали розділяли у програмі ImageJ та аналізували окремо.

Дослідження мітохондріального мембранного потенціалу з барвником родаміном 123 виявилось проблематичним. Крім того, що падіння мембранного потенціалу може проявлятися як у зростанні, так і зниженні флуоресценції барвника в клітинах залежно від типу клітин та концентрації барвника, його накопичення в мітохондріях і клітинах також обумовлене потенціалом плазматичної мембрани та активністю різних транспортерів у цій мембрані. Для покращення інтерпретації даних у деяких дослідженнях здійснювали також

спектрофотометричне визначення накопичення цього барвника. У інших експериментах використовували барвник TMRM, який краще підходить для дослідження мітохондріального мембранного потенціалу, оскільки він є естером і його пасивний транспорт через біологічні мембрани є більш швидким і менш залежним від активності транспортерів.

Таблиця 2.2

Параметри дослідження флуоресцентних сигналів клітин

Обладнання	Досліджуваний параметр	Флуорофор	λ збудження, нм	λ емісії, нм
IX73 + DP-74	НАД(Ф)Н	автофлуоресценція	340-390	>420
	мембранний потенціал мітохондій	родамін 123	470-490	>515
		TMRM	530-550	> 575
	морфологія ядра	Hoechst 33258 / Hoechst 33342	340-390	>420 (синій)
	цілісність плазматичної мембрани	етидій бромід	340-390	>420 (червоний)
		пропідій йодид	530-550	> 575
Fluo AxioImager + AxioCam MRm	цілісність плазматичної мембрани	DAPI	365±25	420-470
	апоптоз	Аннексин V-FITC	450-490	515-565
ЛЮМАМ-I-1 + Nikon D3000	мембранний потенціал мітохондій	родамін 123	505±25	600-700

2.9. Визначення концентрації родаміну 123 у клітинах

Концентрацію родаміну 123 у цитоплазмі досліджували спектрофотометрично. Ізольовані панкреатичні ацинуси (0,5 млн клітин) інкубували з родаміном 123 (20 мкмоль/л) впродовж 15 хв за 37°C у досліджуваних середовищах інкубації. Після цього клітини 3 рази відмивали фосфатним буфером (pH 7,4, 4°C, 40 g). Надосадову рідину зливали, а осад клітин змішували з 50 мкл середовища для лізування, що містило 1% NP-40, 20 ммоль/л ЕДТА, 50 ммоль/л Tris-HCl і 0.1 мг/мл соєвого інгібітора трипсину; pH 7,5. Лізис

здійснювали на льоді впродовж 10 хв. Лізат центрифугували за 16000 g впродовж 10 хв. Поглинання світла (505 нм) досліджували у мікрооб'ємі лізату (1 мкл) за допомогою спектрофотометра Denovix DS-11+, а концентрацію родаміну 123 розраховували за калібрувальною кривою. Значення були перераховані на вміст білка, який одночасно визначали за поглинанням світла з довжиною хвилі 280 нм. Концентрацію барвника у клітинах оцінювали, взявши за середній об'єм клітини 3000 мкм³.

2.10. Дослідження секреції ізольованих ацинусів *in vitro*

Базальне та стимульоване вивільнення амілази з панкреатичних ацинусів досліджували *in vitro*. Ізольовані ацинуси інкубували впродовж 30 або 60 хв за температури 37 °C з стимуляторами секреції (ацетилхолін чи ХЦК). Потім суспензію центрифугували 10 с при 1600 g, і відбирали надосадову рідину з секретом. Частину аліквоти заморожували, а частину використовували зразу для визначення активності амілази. Для дослідження загального вмісту амілази клітини лізували у базовому розчині з 1 % Triton X-100.

2.11. Визначення активності амілази

Активність амілази визначали двома методами. Першим була стандартним йод-крохмальна колориметрія (578 нм) за кінцевою точкою після інкубації розчину крохмалю (2%) зі зразком, що містив амілазу впродовж 10 хв за 37 °C. Однак цей метод було важко пристосувати до великої варіабельності активності амілази, оскільки хід реакції неможливо було контролювати. У випадках високої активності амілази (стимуляція ацинусів ацетилхоліном) весь субстрат міг бути спожитий ще до кінця інкубації, а за дуже низької (плазма крові) було важко виявити різницю з контролем внаслідок того, що на початковій стадії гідролізу крохмалю інтенсивність забарвлення з крохмалем не змінюється. Цей метод використали у дослідженнях, описаних у розділі 3.6.

Тому на певному етапі досліджень ми використали кращий кінетичний турбідиметричний метод [212]. Метод базується на оцінці непрозорості суспензії

крохмалю (1%), яка знижується лінійно в часі на початковій стадії розщеплення крохмалю. Непрозорість розчину досліджували за допомогою спектрофотометра DENOVIK DS-11 FX+ в кюветі 1 см за 37°C при довжині хвилі 300 нм. Тривалість інкубації становила не більше 5 хв, показники знімали кожних 5 с. Аналізували лінійну ділянку, кут нахилу якої розраховували за лінійною регресією. Більшість заморожених проб попередніх експериментів (окрім розділу 3.6) було перероблено турбідиметричним кінетичним методом, який показав вищу точність.

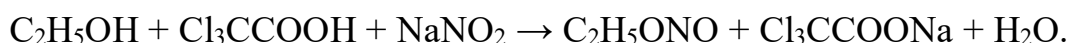
2.12. Високоефективна рідинна хроматографія

Високоефективну рідинну хроматографію здійснювали на базі Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Зразки крові щурів отримували після декапітації. Білки плазми крові осаджували впродовж 1 доби з 5-сульфосаліциловою кислотою (10 %) за температури 4 °C. Після цього їх центрифугували впродовж 30 хв при 5000 об/хв, а надосадову рідину використовували на наступних етапах. Аналіз кількості амінокислот здійснювали за допомогою високоефективного рідинного хроматографа (модуль розділення Alliance і детектори Waters 996). Розділення амінокислот здійснювали у колонці з стаціонарною фазою Luna C18 (діаметр пор 10 нм, силіконові часточки 5 мкм). Мобільна фаза містила суперградієнтний ацетонітрил і розчин Na_2HPO_4 (0,05 моль/л, рН 2,0). Розділення проводили за методом градієнтного елюювання. Швидкість подачі елюента становила 1 мл/хв, амінокислоти визначали за довжини хвилі 350 нм. Дериватизацію амінокислот здійснювали з 2,4-динітро-1-флуорбензолом за температури 40 °C впродовж 40 хв.

2.13. Визначення концентрації етилового спирту в крові за допомогою газо-рідинної хроматографії

Газо-рідинну хроматографію здійснювали на базі Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького з допомогою хроматографа «Chrom-5», оснащеного полум'яно-іонізаційним детектором.

Для виявлення етилового спирту в плазмі крові щурів його переводили у більш летку сполуку – етилнітрит (температура кипіння – 17 °C). Для цього до етилового спирту додавали трихлороцтову кислоту і нітрит натрію:



У реакційну посудину вносили плазму крові, розчини стандарту, трихлороцтової кислоти (50%) і нітриту натрію (30%) у співвідношенні 1:1:1:1. Реакцію проводили впродовж 60 с, після цього мікрошприцом набирали 1 мл газової фази над реакційною сумішшю і вводили у дозатор хроматографа. Як стандарт використовували пропілнітрит. При цьому на хроматограмі записували два піки: один з них відповідав етиловому спирту (етилнітриту), а інший – пропіловому спирту (пропілнітриту). Потім розраховували співвідношення висоти хроматографічного піку етилового спирту (етилнітриту) до висоти піку внутрішнього стандарту – пропілового спирту (пропілнітриту).

2.14. Визначення концентрації етилового спирту в крові ензиматичним методом

Концентрацію етанолу в плазмі крові щурів визначали одоксидазно-переоксидазним методом за допомогою стандартних наборів «АЛКОТЕСТ», як описано [213].

2.15. Гістологічне дослідження підшлункової залози щурів

Зразки підшлункової залози щурів фіксували у формаліні, проводили дегідrataцію в зростаючих концентраціях етанолу та поміщали у парафінові блоки після попередньої інкубації в ксилолі. Отримання зрізів товщиною 5 мкм

проводили за допомогою напіваавтоматичного мікротому HistoRange з алмазним ножом. Зрізи фарбували гематоксиліном і еозином.

2.16. Трансмісійна електронна мікроскопія

Тканину підшлункової залози фіксували в 0,2 М розчині какодилату натрію, що містив 1,5 % тетраоксид осмію (рН 7,2) впродовж 2 – 2,5 годин за температури 4 °С. Для зневоднення зразки поміщали у серію розчинів етанолу у зростаючих концентраціях (50–100%, по 30 хв). Після цього впродовж 10 хв зразки інкубували з пропіленоксидом, а потім заливали в епоксидну смолу Epon 812 і здійснювали полімеризацію за температури 60 °С впродовж 24 год.

Далі зразок заливали в епоксидну смолу Epon 812 і полімеризували за 60 °С впродовж 24 год. Зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМТП–6М з допомогою алмазного ножа Diatom. Зрізи товщиною 100 нм контрастували розчином уранілацетату (1%) і цитратом свинцю, після цього аналізували з допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ–100 з цифровою камерою Sony – Н9.

2.17. Виділення ДНК

Тотальну ДНК виділяли двома різними методами. У перших експериментах ДНК отримували шляхом лізису клітин у буфері з NP-40 (1% NP-40, 20 ммоль/л ЕДТА, 50 ммоль/л Тріс-НСІ, 0,1 мг/мл соєвого інгібітору трипсину, рН 7,5). Після центрифугування при 1600 g (5 хв) надосадову рідину збирали. Екстракцію повторювали тричі, додаючи нові аліквоти лізуючого буферу. Потім додавали 1 % додецилсульфату натрію та інкубували з РНКазою А (5 мкг/мл) впродовж 2 год за 56 °С. Потім додавали протеїназу К (2,5 мкг/мл) та інкубували ще 2 год за 37 °С. Після додавання половини об'єму 10 моль/л амоній ацетату ДНК осаджували 2,5 об'ємами етанолу. Цей метод не був достатньо надійним, оскільки не завжди вдавалось виділити достатню кількість ДНК. Також не було певності, що виділено всі фракції ДНК зі зразків в непорушеній пропорції, що було важливо для подальших експериментів. Оскільки ацинарні

клітини підшлункової залози містять у секреторних гранулах панкреатичну ДНКазу 1, вона могла бути активною на етапі інкубування з РНКазою А та змінити пропорції високомолекулярного і низькомолекулярного ДНК. Цей метод використовували у розділі 3.6.

Іншим методом була кислотна фенольно-хлороформна екстракція ДНК за Хомчинським [214]. Після розділення з TRI-реагентом для виділення ДНК відбирали не лише нижню органічну фазу, а й інтерфазу, що містила ядерне ДНК зв'язані з протеїнами. 1 об'єм осаду з ДНК змішували з 0,3 об'єму 100% етанолу (який отримували шляхом дегідратації за допомогою молекулярного сита типу 3А), інкубували впродовж 2–3 хв, і осаджували ДНК за 2000 g (5 хв). Потім ДНК двічі очищали у 0,1 моль/л натрій цитрату в 10% етанолі. ДНК поміщали у 75% розчин етанолу, інкубували 15 хв та центрифугували за 2000 g (5 хв). Висушували осад шляхом вільного випаровування, після чого здійснювали додаткову очистку від білків. Сухий залишок розчиняли у буфері SNET (20 ммоль/л Тріс-НСl, 5 ммоль/л ЕДТА, 400 ммоль/л NaCl, 1 % натрій додецилсульфат, рН 8,0) та інкубували з протеїназою К (2,5 мкг/мл) впродовж 14 год за 50 °С. Після цього проводили останній етап виділення ДНК з амоній ацетатом та етанолом, як у попередньому методі. ДНК додатково розчиняли у 8 ммоль/л NaOH впродовж 2 год при 60 °С. Отримані таким чином зразки містили всі фракції (високомолекулярні та низькомолекулярні) ДНК (але не РНК) для електрофоретичного розділення. Чистоту зразків ДНК оцінювали за допомогою спектрофотометра DeNovix DS-11+. У всіх експериментах співвідношення A260/A280 знаходилось в межах від 1,8 до 2,0. Цей метод використовували у розділі 3.7.

2.18. Визначення вмісту фрагментованої ДНК

Панкреатичні ацинуси лізували у буфері, що містив 10 ммоль/л Тріс-НСl (рН 7,5), 10 ммоль/л ЕДТА та 0,2 % Triton X-100. Зразки центрифугували впродовж 15 хв за 13000 g. Надосадова рідина містила фрагментовану ДНК, а осад –високомолекулярну ДНК. Обидві фракції інкубували з 1 мл лізуючого

буферу з додаванням 0,25 мл 50 % трихлороцтової кислотим(14 год за 4 °С). Після цього було проведено ДНК гідролізували, нагріваючи її до 70 °С впродовж 20–25 хв з розчином HClO_4 (0,5 моль/л). Кількість ДНК визначали колориметричним дифеніламіновим методом Бертон. До зразків додавали два об'єми дифеніламінового реагенту й інкубували 17 год за 25 °С. Поглинання зразками світла з довжиною хвилі 630 нм визначали за допомогою планшет-рідера ВіоТек.

2.19. Електрофорез ДНК

Електрофорез ДНК проводили у 1 % агарозі з використанням буферного розчину, що містив, ммоль/л: тріс – 130, борна кислота – 45, ЕДТА – 2,5; рН 8,3 (HCl). У комірки вносили зразки ДНК з шестикратним навантажувальним буфером (у співвідношенні 5:1), що містив: бромфеноловий синій (0,03 %), ксилол ціанол (0,03 %), гліцерол (60 %), додецилсульфат натрію (1%) і ЕДТА (100 ммоль/л). В окрему лунку вносили стандартні маркери ДНК (250–10000 пар нуклеотидів, Thermo Fisher Scientific). Розділення ДНК проводили за напруги 70 В у системі для горизонтального електрофорезу runVIEW (Clever scientific). Гель візуалізували під ультрафіолетом.

2.20. Біохімічні показники плазми крові

Тварини голодували 12 годин до забору крові. Кров збирали відразу після декапітації і плазму негайно відділяли центрифугуванням. Концентрацію глюкози, тригліцеридів, загального холестеролу, ліпопротеїнів високої і низької щільності визначали з наборами «Філісіт-діагностика» використовуючи спектрофотометр DeNovix DS-11+.

2.21. Авторські алгоритми

Для обробки зображень було створено декілька макросів для програмного пакету ImageJ. Макроси здатні автоматично ідентифікувати панкреатичні ацинуси, гепатоцити або ракові клітини та визначати інтенсивність флуоресценції.

Також створено програмний пакет для автоматичного аналізу записів дихання. Для цього використано мову Python 3.12, бібліотеки Numpy, Scikit-learn, SciPy та середовище PyCharm. Результати автоматичного підрахунку порівнювали із даними чотирьох людей-експертів.

2.22. Статистично-математичне опрацювання результатів

Кожну експериментальну серію проведено як мінімум на 5 різних тваринах (n завжди означає кількість тварин). Результати представлено здебільшого як середнє арифметичне $\pm$ стандартна похибка середнього арифметичного. У деяких випадках представлено значення стандартного відхилення (зокрема, у дослідженнях концентрації амінокислот у плазмі щурів) замість стандартного відхилення похибки середнього арифметичного.

Статистичний аналіз проведено з використанням програм Microsoft Excel та Origin Pro 2018. Вірогідність статистичної різниці між групами оцінювали за t -тестом, якщо кількість груп для порівняння була рівною 2. У інших випадках застосовували дисперсійний аналіз: однофакторний, двофакторний з повторами чи без повторів, залежно від виду експерименту. У випадку виявлення статистично вірогідної різниці проводили додаткові post-hoc t -тести з корекцією помилки першого типу за методом Голма-Бонферроні [215]. У всіх статистичних тестах рівень α становив 0,05.

Коефіцієнт внутрішньокласової кореляції розраховували за двофакторною моделлю для випадкових ефектів [216].

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Автоматичні програмні рішення для аналізу результатів досліджень

3.1.1. Автоматичний аналіз записів споживання кисню

Основним методом, використаним у цій роботі, було дослідження споживання кисню ізольованими клітинами і мітохондріями за допомогою електрода Кларка. У процесі роботи було здійснено та проаналізовано більше тисячі таких експериментів. Типовим способом розрахунку швидкості дихання був аналіз записів у програмі Microsoft Excel. Для цього необхідно було поділити запис на змістовні фрагменти, що відповідали дії різних речовин, а потім у кожному фрагменті знайти правильну ділянку інтересу, для якої визначали швидкість дихання за допомогою лінійної регресії. Крім цього, на наступних етапах потрібно було перерахувати ці необроблені дані на коефіцієнти калібрування, кількість тканини та провести статистичний аналіз.

Цілком зрозуміло, що такий «ручний» аналіз є надзвичайно працесемким. Окрім того, вибір ділянки інтересу є досить суб'єктивним і за умови низької якості запису зростає ризик помилкового аналізу. Тому на певному етапі роботи ми поставили завдання автоматизувати ці процеси. Для цього було створено програмне рішення з використанням мови програмування Python, яке дає змогу швидко і точно аналізувати записи дихання ізольованих клітин і мітохондрій.

У роботі над алгоритмом ми використали декілька відомих підходів, таких як лінійна регресія, періодограма, кластерний аналіз, пошук аномалій, локальна лінійна регресія [217], регресія Губера [218], пошук лінійної ділянки кривої [219] та інші. Поєднання деяких з цих підходів з новим «човниковим» алгоритмом пошуку лінійної ділянки лягло в основу нашого програмного рішення.

* * *

Для тестування алгоритму ми вибрали достатню кількість записів дихання (табл. 3.1) мітохондрій печінки та панкреатичних ацинусів, для яких було

проведено два паралельні вимірювання. Ці дані було опрацьовано чотирма експертами. Завданнями експертів, залежно від фрагменту даних, було:

- 1) лінійність – найточніше знайти лінійну ділянку для базального дихання клітин чи початкового дихання мітохондрій у стані 4 за Чансом;
- 2) максимум – знайти умовно лінійну ділянку з максимальною швидкістю дихання достатньої тривалості (не менше 30 с) для стимульованого протонофором чи АДФ дихання;
- 3) мінімум – знайти відносно лінійну ділянку з мінімальною швидкістю дихання достатньої тривалості (не менше 30 с) для випадку повернення мітохондрій до стану 4 після фосфорилювання аліквоти АДФ.

Для перевірки, наскільки добре збігаються оцінки швидкостей дихання між різними експертами, ми визначали коефіцієнт внутрішньокласової кореляції (табл. 3.1). Виявилось, що збіжність між оцінками експертів загалом була дуже доброю – вищою 0,9 для всіх завдань і типів даних. Однак варто зазначити, що вона була найнижчою для завдання «лінійність» мітохондрій печінки, оскільки, мабуть, швидкості дихання в цій групі даних були найнижчими і піддавались значному впливу шумів.

Таблиця 3.1

Збіжність оцінок експертів швидкостей споживання кисню

	Панкреатичні ациноси		Мітохондрії печінки		
	лінійність	максимум	лінійність	мінімум	максимум
КВК	0,971	0,953	0,904	0,959	0,986
n фрагментів	32	126	34	32	124

КВК – коефіцієнт внутрішньокласової кореляції

Для оцінки відтворюваності роботи кожного експерта і трьох різних алгоритмів ми визначали коефіцієнт внутрішньокласової кореляції між двома паралельними вимірюваннями (табл. 3.2). Варто зазначити, що навіть при ідеальній оцінці все одно залишатиметься різниця між двома паралельними вимірюваннями, пов'язана із похибкою внесення тканини, речовин та варіабельністю зразків. Тим не менше, збіжність загалом була досить високою. Після аналізу даних експертів стало очевидною різниця між ними. Так, експерт 4

майже завжди мав кращу збіжність між різними паралелями (навіть кращу, ніж медіана експертів), за винятком завдання «мінімум» для мітохондрій печінки, де найкращий результат показав експерт 1. Однак у частині випадків медіана оцінок експертів мала вищий коефіцієнт внутрішньокласової кореляції між експериментальними повторами, що вказує на неточність у роботі експертів. Щодо алгоритмів, то коефіцієнти кожного з них здебільшого були кращими, ніж у медіани експертів. Найкраще працював авторський «човниковий алгоритм», який лише у окремих випадках програвав експертам (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Коефіцієнт внутрішньокласової кореляції між двома повторами

Завдання			Експерти					Алгоритми		
		n	1	2	3	4	медіана	ЛР	РГ	ЧА
Панкреатичні ациноси	Лін	16	0,852	0,889	0,867	0,914	0,896	0,880	0,885	0,891
	Макс	63	0,835	0,836	0,853	0,868	0,861	0,868	0,868	0,867
	Разом	79	0,868	0,873	0,882	0,896	0,891	0,899	0,899	0,896
Мітохондрії печінки	Лін	17	0,762	0,708	0,829	0,844	0,793	0,880	0,885	0,871
	Мін	16	0,908	0,901	0,890	0,807	0,876	0,858	0,878	0,877
	Макс	62	0,930	0,938	0,942	0,944	0,940	0,939	0,937	0,950
	Разом	95	0,939	0,947	0,949	0,948	0,947	0,949	0,948	0,956

ЛР – лінійна регресія, РГ – регресія Губера, ЧА – човниковий алгоритм; жирним виділено результати, кращі за медіану експертів

Слід зазначити, що сам по собі високий коефіцієнт внутрішньокласової кореляції хоча й показує низьку варіабельність (дисперсію), не може гарантувати правильності оцінок, оскільки всі вони можуть бути системно зсунутими від істини. Для прикладу: у найгіршому теоретичному випадку оцінки можуть бути майже рівними 0 і повністю збігатись, однак не відповідати реальним ненульовим швидкостям.

Оскільки ми не можемо знати справжніх величин швидкостей дихання у кожному вимірюванні, ми взяли за умовний «золотий стандарт» медіану оцінок всіх експертів. Звичайно, при цьому також є ризик, що більшість експертів помиляться, а також можливість, що один з експертів матиме найкращу оцінку, тому такий аналіз дасть лише змогу визначити, чи працюють алгоритми не гірше,

ніж *середній* експерт. Відхилення від медіани оцінок записів дихання панкреатичних ацинусів представлені на рис. 3.1. У завданні «максимум» (роз'єднане дихання) експерти 1 та 2 зазвичай показували вищі значення від медіан, на відміну від експертів 3 і 4 з середнім відхиленням до 10 % (рис. 3.1 А). Також були виявлені поодинокі випадки значних відхилень від медіани в межах від -25 до 40 %. Човниковий алгоритм показав надзвичайно подібні до медіани результати: в середньому відхилення коливалось в межах від -5 до 5% та лише з 6 незначними винятками (із 126). Два простіші алгоритми працювали подібно до перших двох експертів, завищуючи оцінки. Це й було очікувано, оскільки вони завжди вибирали найбільше значення серед масиву отриманих з різних ділянок запису.

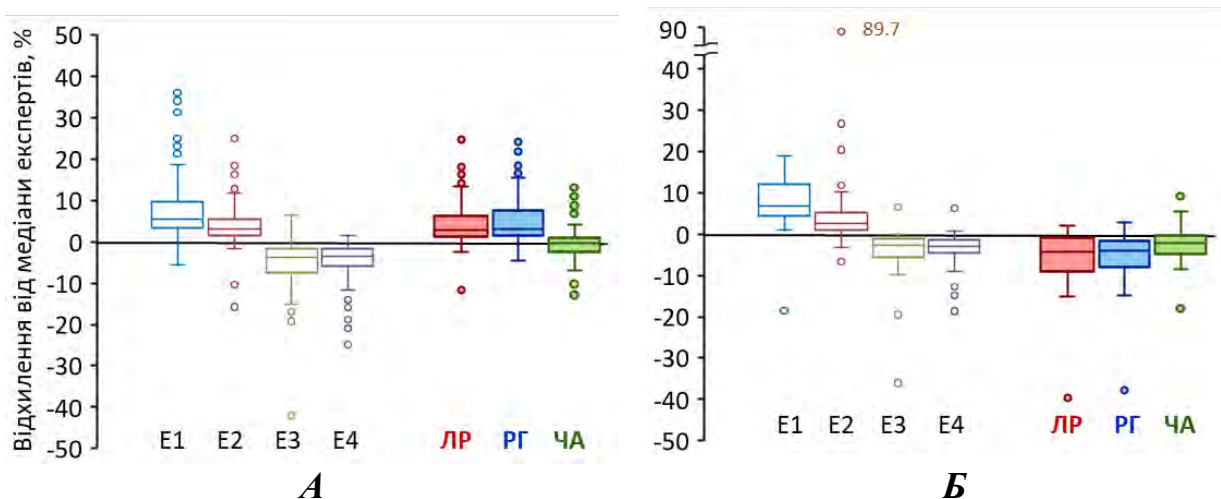


Рис. 3.1. Алгоритми мають перевагу над експертами у точності оцінки швидкості дихання ацинусів підшлункової залози: А – завдання «максимум», Б – завдання «лінійність», E1–E4 – експерти, ЛР – лінійна регресія, РГ – регресія Губера, ЧА – човниковий алгоритм; n = 126 (А) або 32 (Б)

У завданні «лінійність», де експерти мали знайти швидкість умовно лінійної ділянки запису, спостерігали подібну закономірність: експерти 1 і 2 все-одно оцінювали швидкість дихання вище, ніж 3 і 4 (рис. 3.1 Б). Це стало можливим тому, що насправді швидкість базального дихання ацинусів нелінійна: на початку запису спостерігається дещо нижча швидкість внаслідок, мабуть, врівноваження температури в комірці чи стабілізації інших параметрів. В одному випадку експерт 2, очевидно, зробив значну помилку: його значення відрізнялось від медіани майже вдвічі. Саме тому алгоритми лінійної регресії та регресії

Губера, які аналізували цілий фрагмент запису, в середньому занижували оцінку швидкості дихання. Човниковий алгоритм показав значну перевагу над ними, наближаючись в оцінках до медіани, подібно як експерт 4.

Перед тим, як перейти до опису аналізу даних дихання ізольованих мітохондрій, доцільно розглянути найгірший випадок із записів дихання панкреатичних ацинусів, для якого оцінки експертів дуже відрізнялись. У завданні «максимум» оцінки експертів становили: експерт 1 – 0,83, експерт 2 – 0,792, експерт 3 – 0,363, експерт 4 – 0,476. Човниковий алгоритм визначив швидкість дихання як 0,57. Якщо глянути на оригінальний запис, то стає зрозуміло, чому був можливий такий результат (рис. 3.2). Такі поодинокі випадки, коли на записі більше ділянок з великими шумами, ніж неспотворених ділянок, зазвичай не піддаються аналізу і не враховуються як результат дослідження. І це правильно, оскільки, як очевидно з нашого експерименту, суб'єктивний вибір експерта дуже сильно впливає на отриманий результат, коли кількість шуму зavelика. Проте навіть в таких умовах, на нашу думку, експерт 4 та човниковий алгоритм знайшли збалансовані рішення, які максимально наближені до реального значення швидкості дихання.

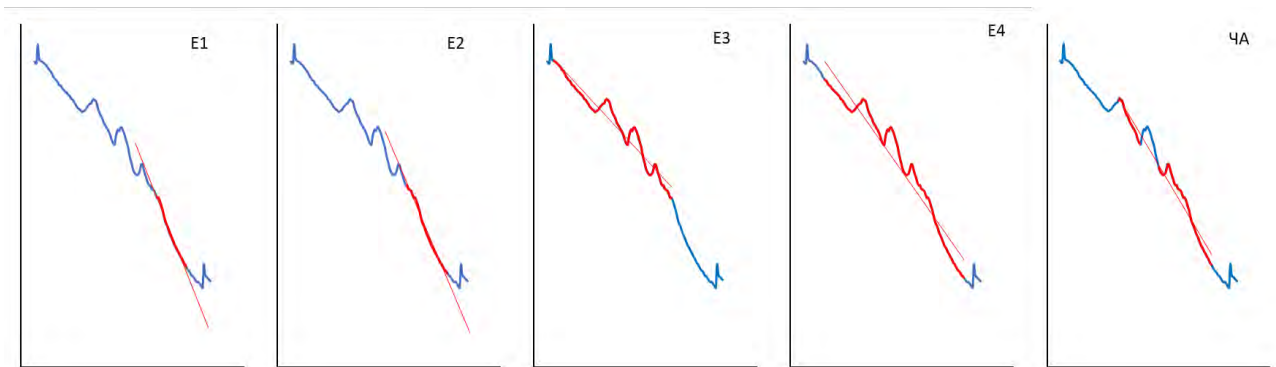


Рис. 3.2. Високий рівень шуму в записі дихання ацинусів підшлункової залози зумовлює різний вибір ділянок для аналізу; E1–E4 – експерти, ЧА – човниковий алгоритм, червоним – ділянки, вибрані для аналізу, синім – решта запису

Результати оцінки дихання ізольованих мітохондрій печінки у завданнях «максимум» та «лінійність» були подібними (рис. 3.3 А, Б). Перші два експерти і тут завищували оцінки дихання. Причому перший експерт навіть завищував у завданні «лінійність», у якому швидкість дихання була дуже низька, але відносно

стабільна, що вказує на схильність цього експерта до вибору ділянок з вищою швидкістю дихання незалежно від поставленого завдання. Натомість, алгоритми лінійної регресії та регресії Губера завищували оцінку швидкості лише у завданні «максимум». Човниковий алгоритм продемонстрував перевагу над усіма експертами й алгоритмами у цьому завданні.

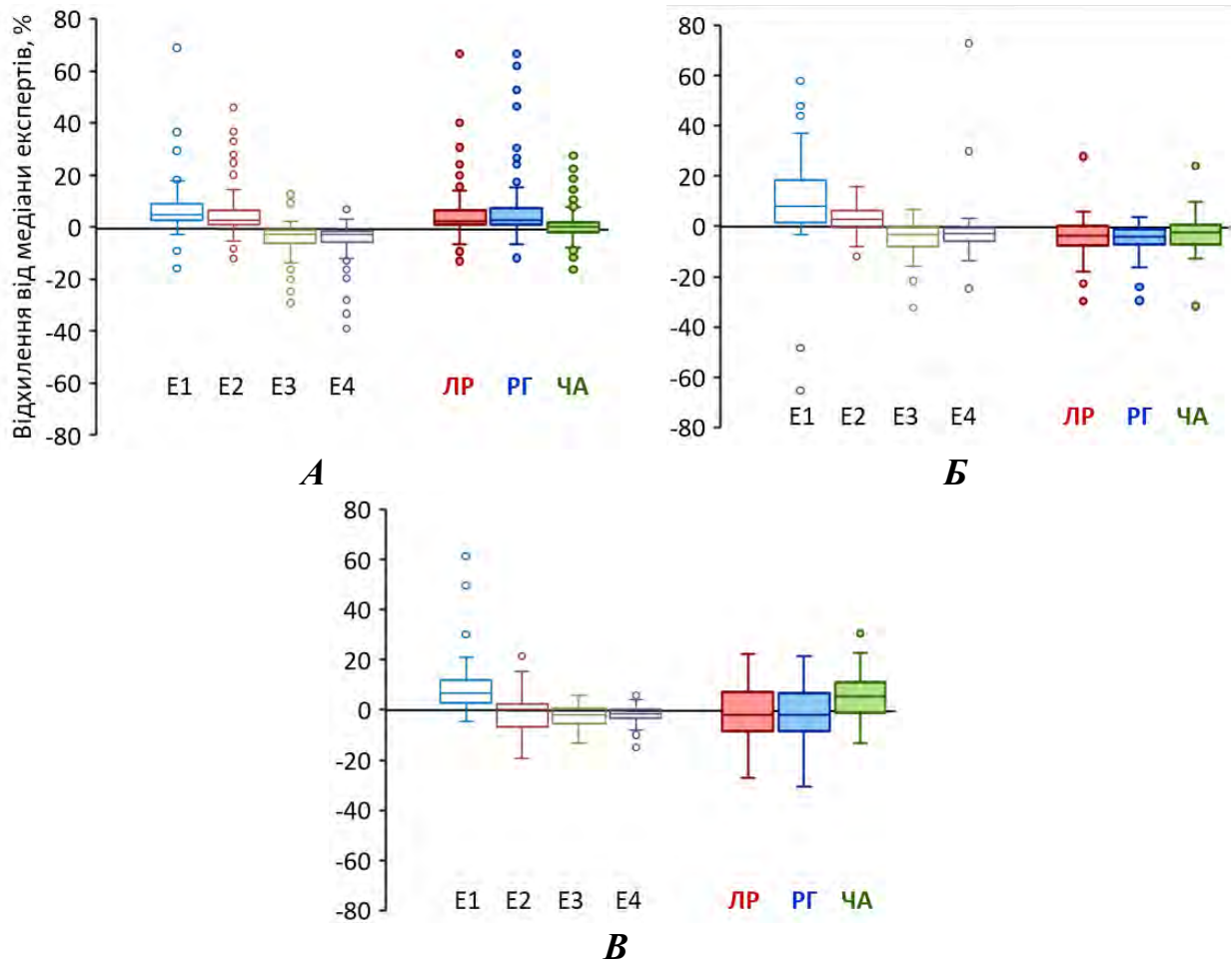


Рис. 3.3. Алгоритми працюють на рівні з експертами у оцінці швидкості дихання ізольованих мітохондрій печінки: А – завдання «максимум», Б – завдання «лінійність», В – завдання «мінімум», E1–E4 – експерти, ЛР – лінійна регресія, РГ – регресія Губера, ЧА – човниковий алгоритм; $n = 124$ (А), 34 (Б) або 32 (В)

У завданні «лінійність» не виявлено суттєвої різниці між алгоритмами й експертами 3 та 4, за винятком того, що експерт 4 допустив у одному випадку значне відхилення на 73% від медіани. А зважаючи на те, що збіжність між паралелями в цьому завданні у цього експерта була найкращою (табл. 3.2), не слід відкидати припущення, що у цьому випадку цей експерт був правий, а всі решта, включно з алгоритмами, зробили помилку. Альтернативно, експерт міг у

«непевному» для нього випадку опиратись на дані іншої паралелі, де швидкість була вищою, різниця між експертними оцінками була меншою, а отже запис був простішим для аналізу.

Таблиця 3.3

Результати аналізу проблемного запису дихання мітохондрій

Повтор	Е 1	Е 2	Е 3	Е 4	медіана	ЧА
1	0,014 (0,037)	0,015 (0,038)	0,013 (0,034)	0,014 (0,035)	0,014 (0,036)	0,015 (0,037)
2	0,006 (0,011)	0,012 (0,023)	0,009 (0,018)	0,018 (0,035)	0,010 (0,020)	0,013 (0,025)

у дужках – дані після перерахунку на коефіцієнти, ЧА – човниковий алгоритм

На рис. 3.4 представлено два повтори цього експерименту, з який проблемним виявився другий (Б), оскільки наприкінці запису відбувалось різке зростання швидкості дихання, яке може бути артефактом. У такій ситуації більшість експертів та алгоритми вибрали консервативні рішення, відкинувши нетипову ділянку. Тут варто додати, що збіжність визначали за перерахованими на додаткові коефіцієнти калібрування даними, які були невідомі для експертів. Отже, вибравши ризиковану ділянку для аналізу, експерт 4, за щасливим збігом обставин, досягнув ідеальної збіжності між паралелями. У таблиці 3.3 представлені дані оцінок експертів та алгоритму.

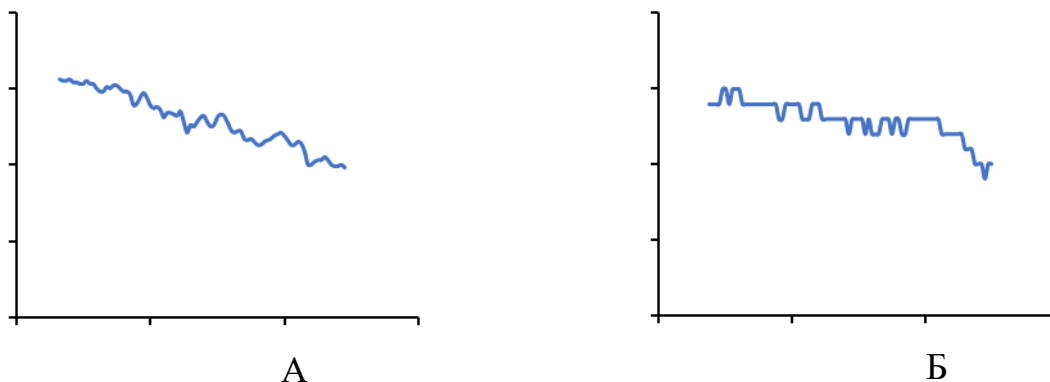


Рис. 3.4. Записи дихання мітохондрій у Стані 4 за Чансом; показані два технічні повтори, з яких більш проблемним для аналізу виявився повтор Б

Дещо несподіваними виявились результати у завданні «мінімум» (рис. 3.3 В). Алгоритми лінійної регресії та регресії Губера давали суттєві відхилення від медіани, причому в обидві сторони, хоча очікуваним було саме зниження

значень цими алгоритмами. Парадоксально, але експерти 3 і 4 часто знаходили ділянки з нижчими швидкостями, ніж регресія. Алгоритми мали строге обмеження мінімальної довжини фрагменту запису, на якому вони визначали швидкість – максимум серед тривалості чвертини запису і 30 с. Тому єдине пояснення низьких оцінок експертів – це те, що вони вибирали значно коротші ділянки за ліміт алгоритмів. Дані таблиці 3.2 свідчать про те, що експерт 1 мав найвищу збіжність оцінок між паралелями, проте його оцінки були значно вищими за медіану і подібними до човникового алгоритму, який раніше показував найкращі результати. З огляду на всі ці факти ми вважаємо, що тенденція експерта 1 до завищення оцінки швидкості в цьому завданні зіграла йому на користь, оскільки він ніколи не вибирав маргінальних низьких значень. Таким ж консервативним, однак більш надійним, виявився човниковий алгоритм.

Підсумки

Створено та випробувано програмний пакет, який здатний швидко та точно аналізувати записи дихання ізольованих клітин та мітохондрій. Значну частину даних у цій роботі (розділи 3.7, 3.11, 3.13) ми аналізували цим способом.

Публікації:

1. Manko B.V., **Manko B.O.**, Babsky A. Automatic analysis of biological suspensions oxygen consumptions signals // XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 90-річчю від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга- Сосонка Юрія Романовича (Львів, 26–28 квітня 2023 року) : Збірник тез. – Львів, 2023. – С. 188–189.

3.1.2. Алгоритми виокремлення клітин на мікрофотографіях та вимірювання флуоресценції

Для сегментації гепатоцитів та автоматичного визначення інтенсивності їх флуоресценції було написано макроси у програмі ImageJ. Запропоновано три алгоритми з поступовим ускладненням. Основними етапами першого алгоритму

(базовий) були: 1) застосування Гаусівського розмиття; 2) створення бінарної маски флуоресцентного зображення (у синьому каналі) за автоматичним порогом «Otsu» (dark background); 3) застосування алгоритму «Watershed»; 4) вибір об'єктів (функція «Analyze particles»), що відповідають необхідним розмірам (3000-15000 пікселів) та індексу круглості (0,8-1,0). Подібним чином створювали маску для мертвих клітин та їх фрагментів, що зафарбовані пропідій йодидом (у червоному каналі). Цю маску віднімали (imageCalculator("Subtract create", ...)) на початку аналізу для усунення накладання флуоресценції мертвих клітин.

Оскільки перший алгоритм був недостатньо чутливим (не виявляв усіх клітин), його було вдосконалено (алгоритм з посиленням виявленням). Окрім операцій, здійснених за базовим, він також включав додаткове застосування згортки матриці з розміром 9×9 «Mexican hat» (Табл. 3.4) до окремої необробленої копії зображення з наступним використанням порогу «Otsu», алгоритму «Watershed» та «Analyze particles». Обидві отримані маски поєднували за логічним оператором «OR».

Таблиця 3.4

Коефіцієнти матриці «Mexican hat»,
що наближено відповідають розподілу вейвлета Рікета

0	0	-1	-1	-1	0	0	0	0
0	-1	-1	-3	-3	-3	-1	-1	0
0	-1	-3	-3	-1	-3	-3	-1	0
-1	-3	-3	6	13	6	-3	-3	-1
-1	-3	-1	13	28	13	-1	-3	-1
-1	-3	-3	6	13	6	-3	-3	-1
0	-1	-3	-3	-1	-3	-3	-1	0
0	-1	-1	-3	-3	-3	-1	-1	0
0	0	-1	-1	-1	0	0	0	0

Третій алгоритм був націленим на зменшення включення у аналіз клітин, що були поза фокусом або накладань кількох клітин в різних фокальних площинах. Алгоритм «усунення розмиття», окрім всього попереднього, включав також

додатковий аналіз відповідних світлових фотографій клітин з виділенням областей клітин, що поза фокусом. Це здійснювали завдяки накладанню фільтра «Median» з діаметром 8 пікселів, створенням бінарної маски, заповнення замкнених контурів (Binary->Fill Holes) у копії маски та наступному створенню диференційної маски (imageCalculator("Difference create")). Після цього зони поза фокусом вилучали із аналізу на відповідних етапах.

На рис. 3.5 представлено приклад переваги третього алгоритму (Г) над базовим (В). Із прикладу видно, що алгоритм виділив майже всі релевантні клітини та лише одну клітину поза фокусом.

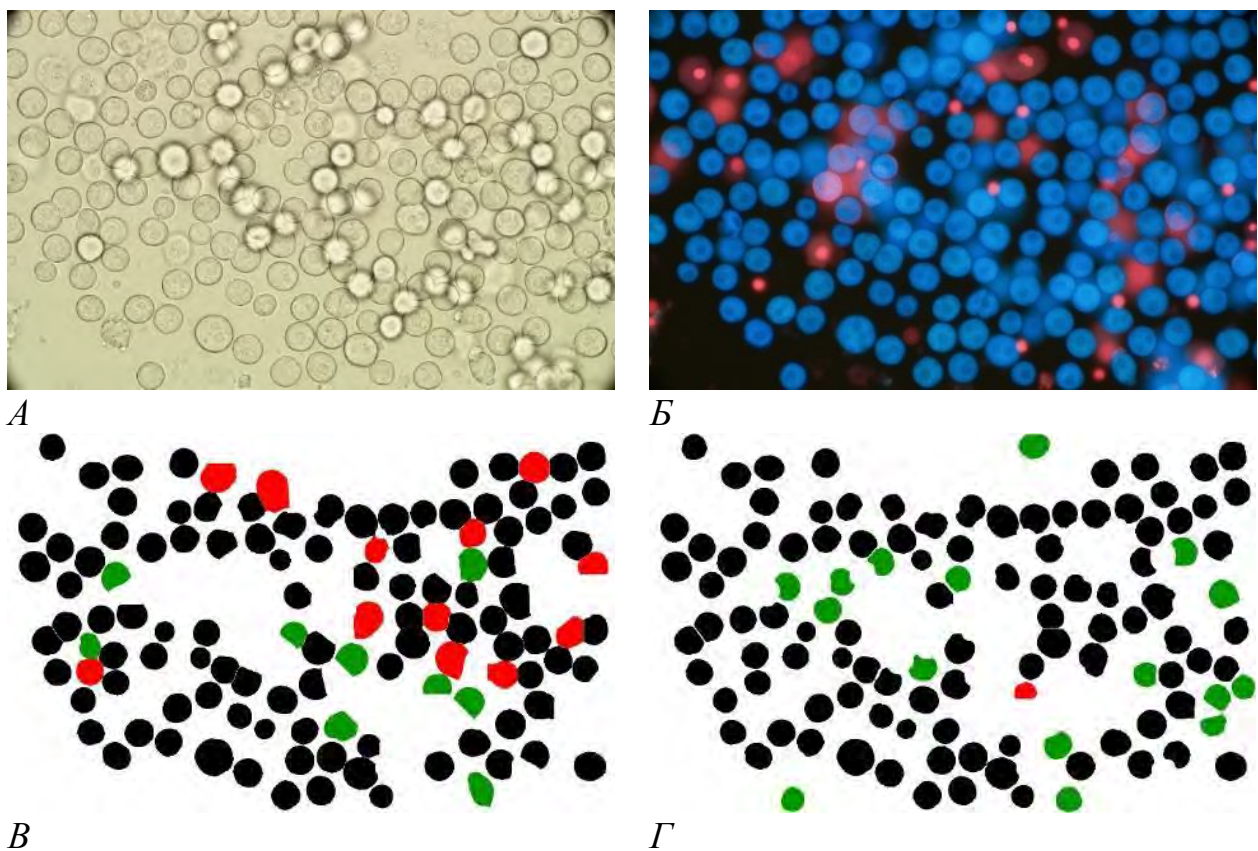


Рис. 3.5. Сегментація гепатоцитів на мікрофотографіях: А – світлова мікроскопія, Б – флуоресцентна мікроскопія (синій – автофлуоресценція НАДН, червоний – флуоресценція пропідій йодиду), результати роботи базового алгоритму (В) та алгоритму «усунення розмиття» представлено у вигляді масок, червоним зафарбовано хибно позитивні результати, зеленим, унікальні для кожного алгоритму істинно позитивні результати, чорним – спільні істинно позитивні результати

Перевірку роботи алгоритму сегментування було проведено на 50 різних наборах, які містили парні зображення світлової та флуоресцентної мікроскопії

(автофлуоресценція НАДН) гепатоцитів. Ці фото було вибрано випадковим чином серед 5 різних експериментів, здійснених на препаратах з різних тварин у різні дні. Загалом, на фото було 2329 клітин у фокусі та 561 клітина поза фокусом.

Результати роботи алгоритмів представлені у табл. 3.2. Базовий алгоритм мав досить добру повноту виявлення релевантних клітин – 0,89. Тобто, не було виявлено лише одну з 10 клітин. Однак хибнопозитивний рівень був значним – 0,24. Лише завдяки низькому процентному вмісту нерелевантних об’єктів влучність при цьому залишалась високою (0,94). Алгоритм з посиленням виявленням значно покращив повноту – аж до 0,96. Проте інші параметри були гіршими у порівнянні з базовим алгоритмом (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Оцінка роботи алгоритмів сегментації

Алгоритм	Влучність $ІП / (ІП + ХП)$	Повнота $ІП / П$	Хибнопозитивний рівень $ХП / Н$
1. Базовий	0,94	0,89	0,24
2. Посилене виявлення	0,92	0,96	0,37
3. Усунення розмиття	0,99	0,92	0,03

ІП – істинно позитивні, ХП – хибно позитивні, П – позитивні, Н – негативні

Найбільш перспективним виявився алгоритм з додатковим усуненням розмиття – влучність становила аж 0,99 за хибнопозитивного рівня 0,03. Тобто, на всіх проаналізованих фотографіях алгоритм позначив лише 16 хибно-позитивних клітин. Значення повноти було середнім між двома іншими алгоритмами – 0,92.

В подальшому з кожної сегментованої клітини було отримано середнє значення флуоресценції та її площу. Цифрові дані з кожної фотографії збережено у форматі .csv, а потім об’єднано і оброблено за допомогою короткого алгоритму написаного з мовою Python. Ці дані проаналізовано у наступних розділах.

Ватро додати, що спрощений варіант автоматичного аналізу флуоресценції панкреатичних ацинусів також використовувався у нашій роботі. Однак він не включав сегментації, оскільки форма та розміри ацинусів та їх груп не дають змоги зробити це простим алгоритмом Watershed. Тому ми просто встановлювали поріг за інтенсивністю і отримували середнє значення флуоресценції з району інтересу для кожної фотографії окремо.

Підсумки

Розроблено декілька простих і швидких алгоритмів для сегментації та аналізу флуоресценції клітин. Алгоритм з посиленням виявленням може бути дуже корисним для створення первинної маски у випадках, коли у дослідників наявні лише флуоресцентні зображення. Такі маски зручно коригувати вручну, видаливши нерелевантні зони з подальшим використанням для безпосереднього аналізу зображень або тренування моделей машинного навчання. З іншої сторони, алгоритм з усуненням розмиття найкраще підходить для негайного аналізу флуоресценції клітин, оскільки має дуже низький хибнопозитивний рівень.

Публікації:

1. Погоріла К., Дранчук Т., Мазур Г., Манько Б., Манько В. Програмний пайплайн для автоматичної сегментації ізольованих гепатоцитів і вимірювання мітохондріального мембранного потенціалу і флуоресценції НАДН // XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 90-річчю від дня народження професора Ореста Демківа (Львів, 18–20 квітня 2024 року) : Збірник тез. – Львів, 2024. – С. 330–331.

3.2. Особливості адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів

3.2.1. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів залози від субстрату окиснення

Адаптація дихання ізольованих клітин до деполяризації мембран мітохондрій за дії протонофора залежить від субстратів окиснення, які наявні у середовищі (глюкоза, піруват, амінокислоти тощо). Це було продемонстровано у ізольованих синаптосомах [81], кардіоміоцитах [220] чи острівцях Лангерганса [221]. На момент виконання наших досліджень не було проведено системних досліджень залежності роз'єданого дихання від постачання субстратів окиснення у ацинарних клітинах підшлункової залози. Ми припустили, що наявність глутаміну у середовищі пояснює суттєву різницю в оцінці максимальної швидкості дихання за дії FCCP [30], [75]. У дослідженні синтезу АТФ у ацинарних панкреатитах до середовища додавали піруват [18], однак його вплив на роз'єдане дихання не вивчений. Тому метою перших експериментів було охарактеризувати адаптаційну відповідь мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів на деполяризацію мітохондріальних мембран протонофором в залежності від наявності різних субстратів у середовищі.

* * *

Для оцінки впливу субстратів окиснення на дихання, стимульоване FCCP, у середовище додавали глюкозу, піруват або глутамін, а ізольовані панкреатичні ацинуси інкубувалися впродовж 15 хвилин при 37 °С. Суспензію вносили у полярографічну комірку; реєстрували базальне та FCCP-стимульоване дихання. FCCP додавався поетапно (кінцеві концентрації – 0,5, 1,0, 1,5 та 2,0 мкмоль/л) із приблизно 2-хвилинним інтервалом між кожним додаванням. Репрезентативні записи споживання кисню представлено на рис. 3.6 А.

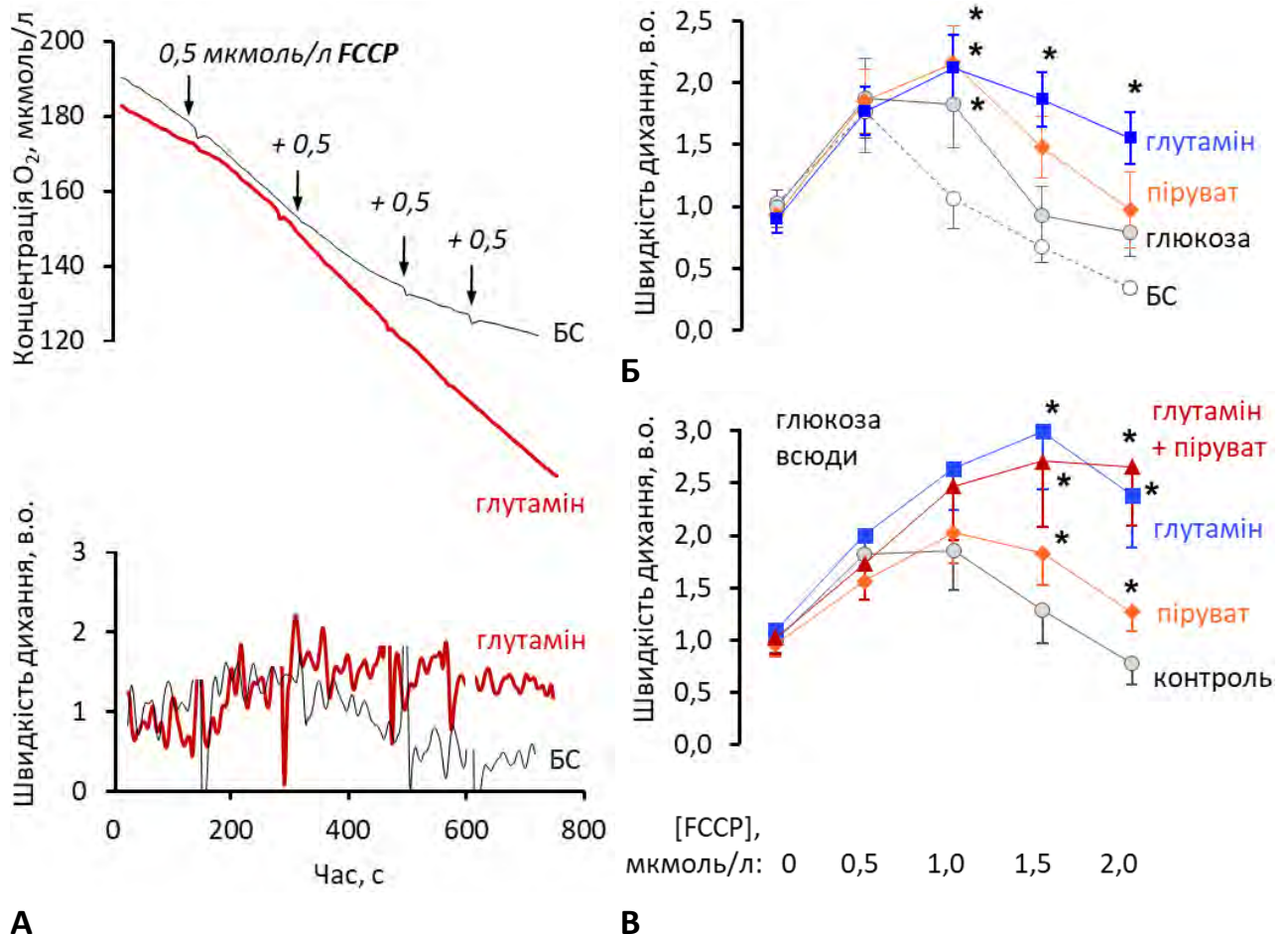


Рис. 3.6. Піруват і глютамін підтримують високу швидкість протонофор-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів; А – репрезентативний оригінальний запис дихання (зверху) та розрахована миттєва швидкість дихання (знизу); Б – контролем було середовище без субстратів (БС); В – глюкоза присутня у всіх експериментах; [глюкоза]=10 ммоль/л, [піруват]=2 ммоль/л, [глютамін]=2 ммоль/л, * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно контролю (В) або експерименту без субстрату (Б), $n=5$, в.о. – відносних одиниць

Швидкість базального дихання ацинусів не залежала від субстрату окиснення (Рис. 3.6 Б, В). Найнижча концентрація FCCP (0,5 мкмоль/л) спричиняла інтенсифікацію дихання до $1,76 \pm 0,33$ в.о. за відсутності субстратів у середовищі. Наявність субстратів окиснення не впливала на ці зміни дихання (рис. 3.6 Б). 1 мкмоль/л FCCP додатково стимулював дихання за окиснення пірувату або глютаміну, але пригнічував дихання у середовищі без субстратів. Подальше підвищення концентрації FCCP до 1,5 і 2,0 мкмоль/л призводило до зниження швидкості дихання у всіх випадках. Однак, наявність глютаміну спричиняла статистично вірогідне підвищення дихання навіть за цих високих

концентрації протонофора (рис. 3.6 Б). Отже, функціональна відповідь мітохондрій ацинарних клітин на деполяризацію залежить від наявності та типу субстрату окиснення: глюкоза, піруват та глутамін підтримують вищу швидкість дихання при зростанні концентрації протонофора, у порівнянні з експериментом без субстратів.

Наступні експерименти проводили за наявності глюкози (контроль) для підтримки гліколітичного синтезу АТФ за умови дефіциту окисного фосфорилування (за високих концентрації протонофора) та для оцінки впливу комбінацій субстратів на мітохондріальну функціональну активність. Коли глюкоза була присутня у середовищі, FCCP (0,5 мкмоль/л) стимулював споживання кисню до $1,83 \pm 0,30$ в.о., подібно, як і за комбінацій з піруватом та/або глутаміном (рис. 3.6 В). Після збільшення концентрації FCCP до 1 мкмоль/л швидкість дихання була вищою за додаткової наявності глутаміну чи глутаміну і пірувату (статистична значущість не підтверджена тестом Голма-Бонферроні). Ця тенденція ще краще проявилась за 1,5–2,0 мкмоль/л FCCP: глутамін, незалежно від наявності пірувату, статистично вірогідно підвищував швидкість роз'єданого дихання (рис. 3.6 В).

Отже, глюкоза і глутамін, на відміну від глюкози і пірувату, адитивно впливають на FCCP-стимульоване дихання панкреатичних ацинусів. Очевидно, це тому, що піруват є продуктом гліколізу, а окиснення глутаміну не включає початкові етапи циклу трикарбонових кислот.

У наступному експерименті ми дослідили вплив субстратів циклу Кребса (малат, ізоцитрат, сукцинат та α -кетоглутарат) на дихання панкреатичних ацинусів. Швидкість базального дихання практично не змінювалася після інкубації впродовж 15 хв з цими субстратами (рис. 3.7). Коли малат або ізоцитрат був наявний у середовищі, FCCP (0,5 мкмоль/л) стимулював дихання статистично вірогідно сильніше, ніж у контролі (глюкоза, Рис. 3.7, Б). Однак вже за 1 мкмоль/л FCCP відбувалось суттєве пригнічення дихання у порівнянні з контролем. На нашу думку, це свідчить про повільний транспорт та незначне накопичення у клітинах малату та ізоцитрату, які вичерпувались внаслідок

швидкого окиснення за стимуляції протонофором. Сукцинат або α -кетоглутарат статистично вірогідно не підвищували роз'єднане дихання (хоча деяка тенденція до підвищення була за 0,5 мкмоль/л FCCP), навпаки – споживання кисню було нижчим за 1 мкмоль/л FCCP, ніж у контролі (глюкоза, Рис. 2, В).

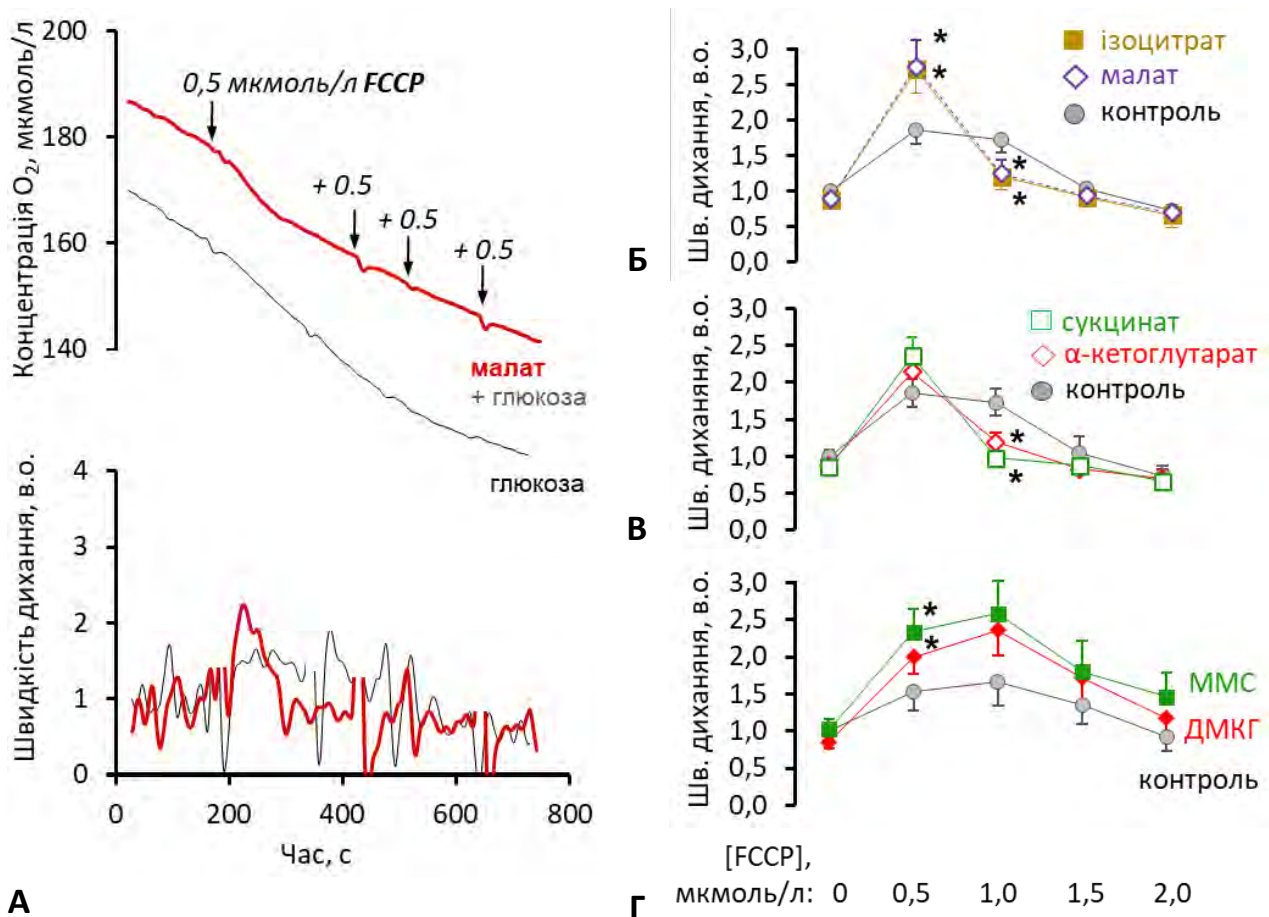


Рис. 3.7. Мембранопроникні естери субстратів циклу Кребса краще забезпечують підтримання протонофор-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів, ніж їх природні форми: А – репрезентативний оригінальний запис дихання (зверху) та розрахована миттєва швидкість дихання (знизу); контролем було середовище з глюкозою (10 ммоль/л); концентрація субстратів циклу Кребса – 2 ммоль/л, ММС – монометилсукцинат, ДМКГ – диметил- α -кетоглутарат, * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно контролю, $n=8$ або 6 (Г)

Аніонний транспортер плазматичної мембрани SLC13A3, що експресується у підшлунковій залозі, може переносити ди- та трикарбонових кислот циклу Кребса у клітини [222]. Щоб перевірити, чи швидкість транспорту обмежує окиснення сукцинату і α -кетоглутарату мітохондріями ацинарних клітин, ми також використовували їх метилові естери: монометилсукцинат і

диметил- α -кетоглутарат. Ці речовини значно підвищували швидкість споживання кисню за дії протонофора (Рис. 3.7, Г), а отже швидкість їх вільного проникнення шляхом дифузії та розщеплення естеразами значно перевищує невисоку транспортну здатність транспортерів плазматичної мембрани. Очевидно, що за фізіологічних умов (*in vivo*) субстратів циклу трикарбонових кислот в основному утворюються в клітинах підшлункової залози, а не транспортуються із позаклітинного середовища. Натомість, ацинарні клітини транспортують глютамін, концентрація якого в крові є достатньо високою.

Після первинного аналізу даних ми зауважили, що здатність підтримувати високий рівень роз'єданого дихання за зростання концентрації протонофора суттєво залежала від умов експерименту. Тому для характеристики адаптаційної здатності мітохондрій панкреатичних ацинусів при максимальних навантаженнях протонофором ми визначали два параметри (табл. 3.6): максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію FCCP (концентрацію, при якій досягалось максимальне дихання). Часто оптимальна концентрація була різною у кожному експерименті.

За умов відсутності субстратів у середовищі максимальна швидкість дихання та оптимальна концентрація протонофора були найнижчими у порівнянні з іншими експериментальними умовами (табл. 3.6). Фактично, максимальна стимуляція дихання наставала вже після внесення першої аліквоти FCCP. У таких випадках значення оптимальної концентрації протонофора може бути значно нижчим, ніж 0,5 мкмоль/л. Додавання різних субстратів окиснення призводило або до суттєвого зростання максимальної швидкості споживання кисню (ізоцитрат, малат, сукцинат, α -кетоглутарат), або ще і до збільшення оптимальної концентрації (глюкоза, піруват, глютамін, монометилсукцинат, диметил- α -кетоглутарат чи їх комбінації). Найвища адаптаційна здатність мітохондрій проявилась за наявності у середовищі комбінації глюкози, пірувату та глютаміну (табл. 3.6). Оскільки максимальна швидкість роз'єданого дихання суттєво залежала від субстрату окиснення, важливим висновком є те, що зареєстровані значення скоріше характеризують здатність клітин окиснювати

наявні субстрати у відповідь на навантаження протонофором, а не максимально можливу швидкість роботи мітохондріального електрон-транспортного ланцюга. Цей параметр найкраще вивчати на ізольованих мітохондріях за умов повного експериментального контролю над позамітохондріальним середовищем і вільним транспортом субстратів.

Таблиця 3.6

Характеристика роз'єднаного дихання
панкреатичних ацинусів за окиснення різних субстратів

Експериментальні умови	Оптимальна [FCCP], мкмоль/л	Максимальна швидкість дихання, в.о.	n
Без субстратів (<i>контроль</i>)	$\leq 0,50$	$1,76 \pm 0,33$	5
Глюкоза	$0,80 \pm 0,11$	$1,91 \pm 0,33$	
Піруват	$0,90 \pm 0,10$	$2,12 \pm 0,21 *$	
Глутамін	$1,00 \pm 0,00$	$2,12 \pm 0,26 *$	
Глюкоза (<i>контроль</i>)	$0,80 \pm 0,11$	$2,02 \pm 0,35$	6
+ Піруват	$1,10 \pm 0,08$	$2,03 \pm 0,29$	
+ Глутамін	$1,40 \pm 0,08$	$3,03 \pm 0,54 *$	
+ Піруват + Глутамін	$1,75 \pm 0,11$	$2,82 \pm 0,51 *$	
Глюкоза (<i>контроль</i>)	$0,75 \pm 0,13$	$1,91 \pm 0,20$	8
+ Ізоцитрат	$\leq 0,50$	$2,71 \pm 0,33 *$	
+ Малат	$\leq 0,50$	$2,75 \pm 0,38 *$	
+ α -кетоглутарат	$\leq 0,50$	$2,14 \pm 0,22$	
+ Сукцинат	$\leq 0,50$	$2,35 \pm 0,25$	
Глюкоза (<i>контроль</i>)	$0,92 \pm 0,08$	$1,73 \pm 0,29$	6
+ Диметил- α -кетоглутарат	$1,00 \pm 0,00$	$2,36 \pm 0,33 *$	
+ Монометил-сукцинат	$0,83 \pm 0,11$	$2,64 \pm 0,42 *$	

* – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем з $P < 0,05$

Оптимальна концентрація FCCP значно залежала від субстрату і була значною мірою зумовлена пригніченням дихання високими дозами FCCP. Детальніший аналіз записів показав, що зниження дихання не настає одразу після внесення FCCP у вищій за оптимальну концентрації, а поступово розвивається в часі. Швидкість дихання поступово зменшувалась після початкового стимулювання 0,5 мкмоль/л FCCP за окиснення глюкози і малату (рис. 3.7 А). У цьому випадку наступні аліквоти FCCP не призводили до подальшого зниження дихання. Тому ми припустили, що принаймні два фактори визначають динаміку

змін дихання, спричинених протонофором: концентрація і час. Для розділення цих факторів у наступній серії досліджень FCCP додавали лише один раз у комірку в концентрації 0,5 або 1,5 мкмоль/л.

На рис. 3.8 представлено оригінальні записи споживання дихання ацинарними панкреатитами за дії одної аліквоти FCCP. Після внесення протонофора можна умовно виділити три фази дихання: 1) коротка фаза прискорення дихання; 2) пік максимального дихання; 3) тривала фаза сповільнення (пригнічення) дихання.

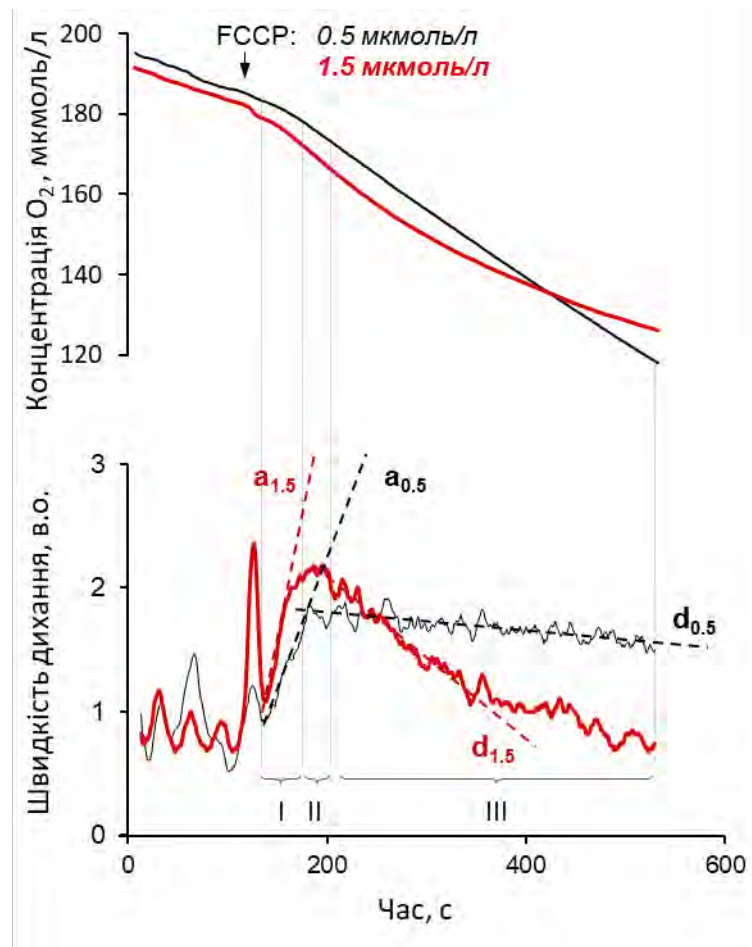


Рис. 3.8. Динаміка зміни роз'єданого дихання ацинарних панкреатитів, субстрат окиснення – глюкоза (10 ммоль/л)

Зміни швидкості дихання у фазах 1 та 3 є лінійними у значній частині запису. Тому коефіцієнти прискорення (a) чи сповільнення (d) розраховували за допомогою лінійної регресії залежності миттєвої швидкості від часу:

$$v(t) = v_0 + at$$

або

$$v(t) = v_0 - dt$$

У таблиці 3.7 підсумовано показники швидкостей роз'єднаного дихання та їх прискорення і сповільнення. Прискорення дихання після внесення FCCP слід проаналізувати окремо від інших показників, оскільки воно практично не корелює із максимальною швидкістю та сповільненням дихання. Це тому, що прискорення визначається іншими (досить швидкими) процесами – як фізичними (швидкістю відповіді кисневого електрода, дифузією протонофора), так і біологічними (реакцією мітохондріальних систем окиснення на деполяризацію, транспортом субстратів тощо). Встановлено, що прискорення споживання кисню залежить як від концентрації FCCP, так і від типу субстрату. Так, у більшості випадків (за винятком окиснення глутаміну) прискорення було набагато вищим після 1,5 мкмоль/л FCCP, ніж після 0,5 мкмоль/л (табл. 3.7). Прискорення за 1,5 мкмоль/л FCCP і за окиснення глутаміну було повільнішим у порівнянні з глюкозою (рис. 3.8). Навпаки, воно було значно вищим за наявності малату або диметил- α -кетоглутарату.

З цих даних ми робимо висновок, що основними чинниками, що визначають прискорення є швидкість дифузії FCCP з середовища у мітохондрії клітин (що зростає із концентрацією протонофора) та властивості катаболізму: загалом, субстрати циклу Кребса вступають в процеси окиснення швидше, ніж глюкоза, піруват чи глутамін. Оскільки виявлено значну (кратну) різницю у прискоренні між експериментами, ми не вважаємо відповідь електрода обмежуючим чинником. Цікавою є значна різниця у прискоренні між глутаміном та диметил- α -кетоглутаратом. Вона, вочевидь, зумовлена більш тривалим окисненням глутаміну за участі глутамінази і глутамат дегідрогенази (чи трансамінази) перед утворенням α -кетоглутарату.

Пікова (максимальна) швидкість дихання, визначена для фази 2, практично не відрізнялась між дослідями з 0,5 та 1,5 мкмоль/л FCCP. Лише за наявності глутаміну вона була статистично вірогідно вищою за 1,5 мкмоль/л FCCP, що відповідає результатам попередньої серії (рис. 3.6). Ці дані, у поєднанні з результатами аналізу сповільнення дихання підтверджують гіпотезу, що пригнічення дихання протонофорами в основному залежить від тривалості дії

FCCP, а за високих «неоптимальних» концентрацій розвивається швидше. Дійсно, сповільнення дихання практично завжди було статистично вірогідно сильнішим за 1,5 мкмоль/л FCCP (табл. 3.7).

Таблиця 3.7.

Параметри відповідей клітинного дихання
панкреатичних ацинусів на внесення FCCP за окиснення різних субстратів

Субстрат	FCCP, мкмоль/л	швидкість дихання, в. о. / хв	прискорення дихання, в. о. / хв ²	сповільнення дихання, в. о. / хв ²
Глюкоза	0	1,00 ± 0,10	-	0,068 ± 0,017
	0,5	1,71 ± 0,21	0,59 ± 0,11	0,074 ± 0,018
	1,5	1,68 ± 0,15	1,51 ± 0,16 #	0,185 ± 0,038 #
Піруват	0	0,96 ± 0,16	-	0,048 ± 0,013
	0,5	1,63 ± 0,24	0,56 ± 0,11	0,036 ± 0,008
	1,5	1,81 ± 0,16	1,51 ± 0,15 #	0,101 ± 0,021 #
Глутамін	0	0,95 ± 0,09	-	0,048 ± 0,010
	0,5	1,53 ± 0,07	0,79 ± 0,22	0,045 ± 0,007
	1,5	2,17 ± 0,22 #	0,78 ± 0,23 *	0,051 ± 0,009 *
Диметил-α-кетоглутарат	0	0,89 ± 0,13	-	0,063 ± 0,017
	0,5	2,08 ± 0,19	1,97 ± 0,19 *	0,045 ± 0,006
	1,5	2,04 ± 0,28	3,89 ± 0,46 * #	0,079 ± 0,023 *
Монометил-сукцинат	0	1,01 ± 0,10	-	0,067 ± 0,013
	0,5	1,79 ± 0,13	1,02 ± 0,17	0,078 ± 0,013
	1,5	2,05 ± 0,24	1,83 ± 0,19 #	0,234 ± 0,050 #
Малат	0	0,85 ± 0,13	-	0,045 ± 0,006
	0,5	1,73 ± 0,13	1,40 ± 0,23 *	0,161 ± 0,020 *
	1,5	1,84 ± 0,22	1,76 ± 0,24	0,438 ± 0,092 * #
Ізоцитрат	0	0,83 ± 0,13	-	0,055 ± 0,017
	0,5	1,56 ± 0,20	1,43 ± 0,42	0,239 ± 0,056 *
	1,5	1,67 ± 0,31	2,08 ± 0,53	0,315 ± 0,047 *

ANOVA з повтореннями підтвердила взаємодію факторів (субстрат і концентрація FCCP) у випадку сповільнення дихання, * – статистично вірогідна різниця щодо глюкози з $P < 0,05$, # – щодо значення за $[FCCP] = 0,5$ мкмоль/л з $P < 0,05$, $n = 6$

Варто зазначити, що базальне дихання (без протонофора) теж дещо сповільнювалось з часом. Можливо, це артефакт дифузії кисню у комірку, або наслідок залежності клітинного дихання від концентрації кисню, або ж ознака поступового зниження життєздатності клітин впродовж експерименту. У всіх

випадках, окрім малату та ізоцитрату, сповільнення за 0,5 мкмоль/л FCCP не відрізнялось від базального. Іншим цікавим винятком була нетипова стабільність дихання за окиснення глутаміну чи диметил- α -кетоглутарату – сповільнення не відрізнялось від базального за внесення 0,5 чи 1,5 мкмоль/л FCCP. Така здатність тривалий час забезпечувати високий рівень дихання вказує на важливу роль систем окиснення глутаміну у енергетичному забезпеченні ацинарних панкреатитів. Загалом, дані цього експерименту добре пояснюють значення раніше отриманих «оптимальних» концентрацій FCCP.

Цікаво, що часозалежне пригнічення роз'єданого дихання не є характерним лише для клітин, а спостерігається також у експериментах на ізольованих мітохондріях [82], [223], [224]. У мітохондріях підшлункової залози його було виявлено за окиснення сукцинату [82], а у мітохондріях печінки – лише коли був присутній α -кетоглутарат [223], [224]. Припускали, що залучення субстратного фосфорилування є механізмом цього пригнічення роз'єданого дихання у мітохондріях печінки [224]. Очевидно, що механізм є зовсім іншим у інтактних клітинах підшлункової залози, оскільки за окиснення диметил- α -кетоглутарату таке сповільнення не розвивалось.

Механізми часозалежного зниження роз'єданого дихання у клітинах не з'ясовані. Припускають, що можливими чинниками є зміни рН, концентрацій Ca^{2+} чи АТФ у цитозолі [26]. Зміни у рН у цитозолі за дії протонофора виникають завдяки врівноваженню градієнтів протонів з кислими компартментами та позаклітинним середовищем. Такі зміни є, найімовірніше, незалежними від постачання окисних субстратів. Оскільки за окиснення глутаміну та диметил- α -кетоглутарату ми не виявили (принаймні, за 0,5 чи 1,5 мкмоль/л FCCP) суттєвого сповільнення роз'єданого дихання, ми вважаємо, що зміни рН цитозолу не є визначальним чинником цього сповільнення. Натомість, сповільнення було найбільш вираженим для субстратів з очевидно обмеженим транспортом через плазматичну мембрану (малат, ізоцитрат). Тому можна зробити висновок, що саме швидкість транспорту і окиснення субстратів є основними чинниками, що зумовлюють стабільність роз'єданого дихання у ацинарних клітинах

підшлункової залози. Проте ми не знаємо, наскільки зберігається можливість мітохондріального синтезу АТФ за дії протонофорів у різних концентраціях і наскільки вичерпання його запасу корелює з поступовою втратою функціональної здатності мітохондрій, що виражається у зниженні максимального дихання.

Протонофори деполаризують внутрішню мембрану мітохондрій, і за механізмом негативного зворотного зв'язку швидкість роботи дихального ланцюга зростає. Оскільки відповідь мітохондріального дихання на внесення протонофора пов'язана із рівнем мембранного потенціалу, ми припустили, що від субстрату окиснення залежать не тільки параметри роз'єданого дихання, а й кінетика падіння мембранного потенціалу. Для перевірки гіпотези ми досліджували флуоресценцію потенціал-чутливого барвника родаміну 123 за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

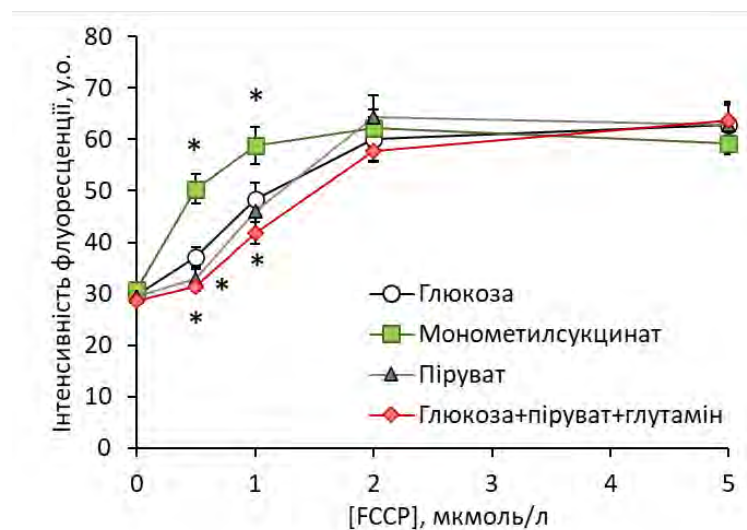


Рис. 3.9. Відповідь флуоресценції родаміну 123 у ізольованих панкреатичних ацинусах на дію протонофора залежить від субстрату окиснення: дані усереднені з усіх фотографій, зроблених в межах 90 с після інкубації з FCCP впродовж 60 с; * – статистично вірогідна різниця щодо глюкози з $P < 0,05$, $n = 6$

Для максимального наближення умов експерименту до дослідження дихання, ацинуси інкубували впродовж 15 хв з субстратом та родаміном 123 за 27°C, після чого додавали FCCP у вибраній концентрації та інкубували ще 1 хв. Ацинуси швидко поміщали на предметне скло та фотографували їх флуоресценцію у мікроскопі впродовж 90 с.

Інтенсивність флуоресценції клітин у контролі (без FCCP, але з додаванням олігоміцину у концентрації 5 мкмоль/л) не залежала від наявності субстратів окиснення (рис. 3.9). Вона зростала після інкубації з FCCP, що свідчить про вивільнення родамину 123 з мітохондрій у цитозоль і збільшення кількості вільного барвника, що здатний здійснювати флуоресценцію, так званий ефект деквенчингу флуоресценції [21]. Тому зростання флуоресценції ми трактували як падіння мембранного потенціалу мітохондрій. Як видно з рис. 3.9, зміна субстратів окиснення суттєво впливала на мітохондріальний мембранний потенціал: додавання пірувату або пірувату та глутамін до середовища з глюкозою знижувало падіння мітохондріального мембранного потенціалу, а заміна глюкози на монометилсукцинат, навпаки, прискорювала деполяризацію.

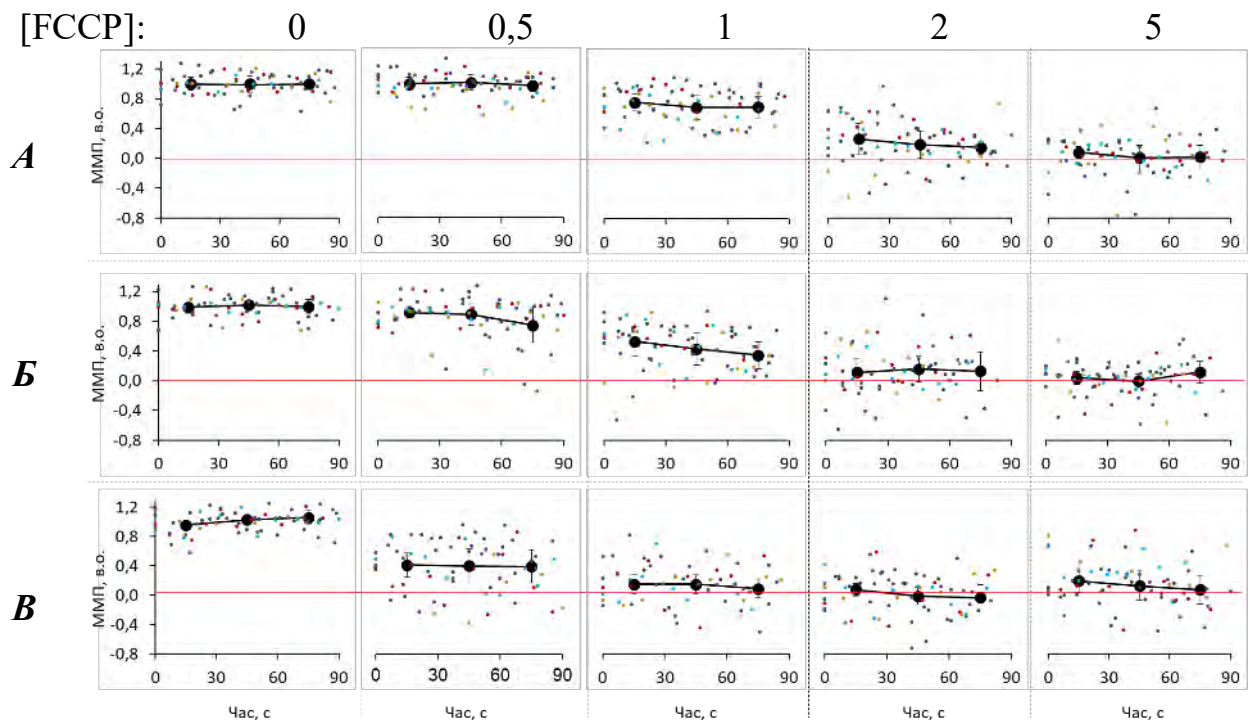


Рис. 3.10. Стабільність мітохондріального мембранного потенціалу панкреатичних ацинусів після інкубації впродовж 60 с з FCCP; [глюкоза] = 10 ммоль/л (*всюди*), [піруват], [глутамін] = 2 ммоль/л (**A**), [монометилсукцинат] (**B**) = 2 ммоль/л, [олігоміцин] – 5 мкмоль/л; малі маркери – середнє значення з фотографії, великі маркери – середнє з діапазонів часу (0–30 с, 31–60 с, 61–90 с), «нуль» – інтенсивність флуоресценції після інкубації з 5 мкмоль/л FCCP, а 1 – без FCCP; n = 6

Впродовж часу реєстрації флуоресценції мітохондріальний мембранний потенціал значно не змінювався, за винятком дослідів з глюкозою та 1 мкмоль/л FCCP (рис. 3.10). Отже, як у за дослідження дихання, ефект протонофора

наступав значно швидше, ніж за 1 хв, після чого встановлювався новий стан динамічної рівноваги між роботою дихального ланцюга та перенесенням протонів за участі FCCP з відносно стабільним мембранним потенціалом мітохондрій. Через методичну необхідність цей експеримент був проведений інакше, ніж дослідження дихання: не було здійснено поступового збільшення концентрації протонофора на тих самих клітинах; натомість кожную концентрацію вивчали на новій аліквоті клітин. Стабільність мітохондріального мембранного потенціалу дає змогу вважати, що умови експериментів не дуже відрізнялись, незважаючи на різний сумарний час дії FCCP.

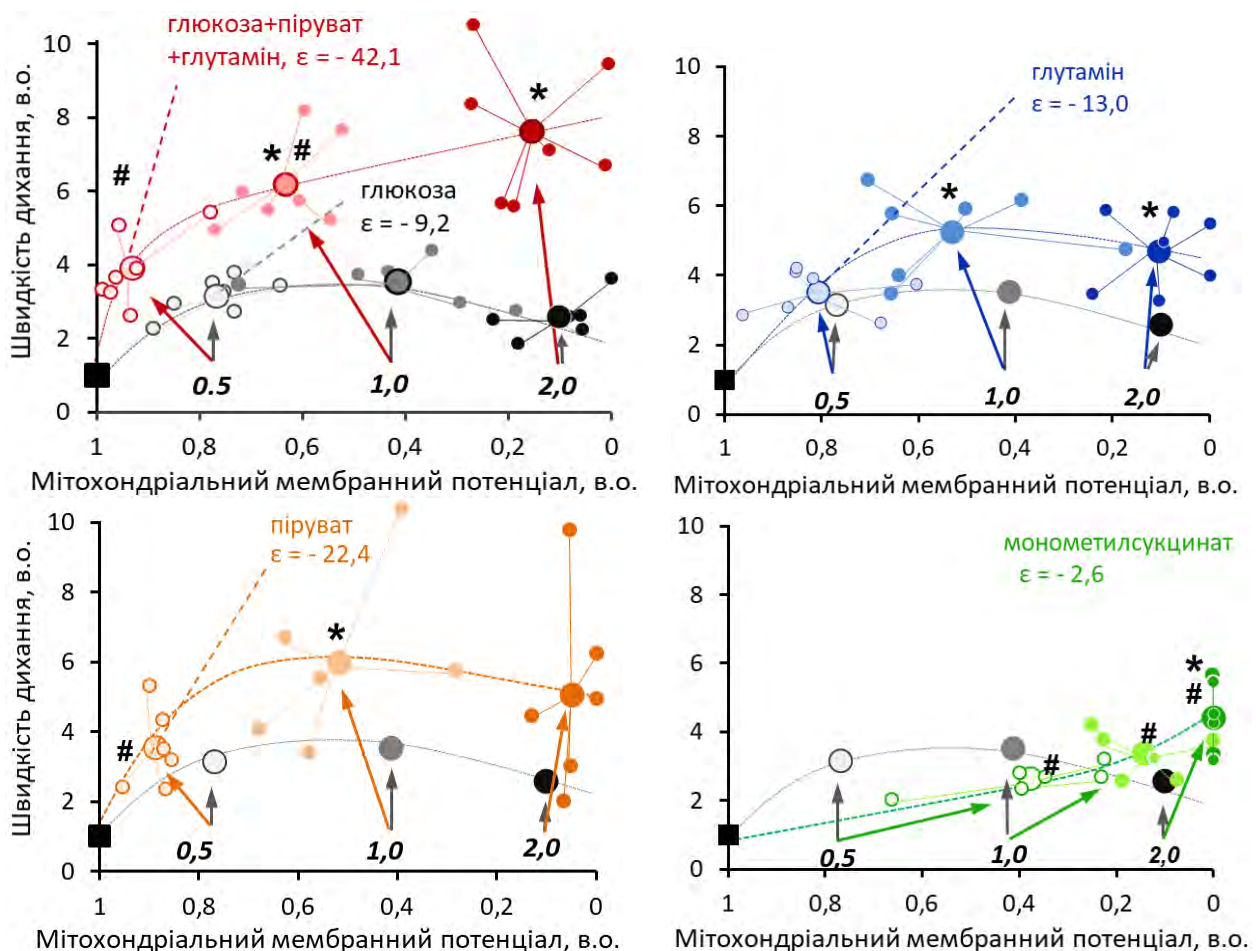


Рис. 3.11. Субстрат окиснення визначає залежність дихання від мітохондріального мембранного потенціалу панкреатичних ацинусів щурів: показано дані всіх експериментів (малі маркери) та середні значення груп (великі маркери), дані нормалізовано до значень за присутності олігоміцину (5 мкмоль/л, чорні квадрати), ϵ – коефіцієнт еластичності за зміни мітохондріального мембранного потенціалу, спричиненого 0,5 мкмоль/л FCCP, статистично вірогідна різниця швидкості дихання (*) чи рівня мітохондріального мембранного потенціалу (#) щодо експерименту з глюкозою з $P < 0,05$, $n = 6$

Як і очікувалось, швидкість дихання залежала від мітохондріального мембранного потенціалу (рис. 3.11). Для того, щоб охарактеризувати цю залежність, ми розраховували коефіцієнт еластичності для початкових змін дихання за дії 0,5 мкмоль/л FCCP за формулою:

$$\varepsilon = \frac{dv}{v} \cdot \frac{\Delta\Psi_m}{d(\Delta\Psi_m)},$$

де v – швидкість дихання, нечутливого до олігоміцину, $\Delta\Psi_m$ – максимальний мітохондріальний мембранний потенціал (олігоміцин, без FCCP); диференціали розраховані після додавання 0,5 мікромоль/л FCCP.

Коефіцієнт еластичності завжди був негативним і залежав від субстрату окиснення: комбінації глюкози, глуматіну та пірувату еластичність була найвищою (-42,1), а за окиснення монометилсукцинату – найнижчою (-2,6). Залежність дихання від мітохондріального мембранного потенціалу загалом відповідає встановленим кінетичним моделям [225], а коефіцієнти еластичності є подібними до отриманих на ізольованих мітохондріях[226]. Проте, коли монометилсукцинат був єдиним субстратом окиснення, коефіцієнт еластичності був дуже низьким. Тобто, відповіді дихання на деполяризацію були «затриманими», а дихальний ланцюг не міг компенсувати втрати мембранного потенціалу. Можливо, це пояснюється нижчим відношенням H^+/O за активності комплексу 2 дихального ланцюга. Добре відомо, що за окиснення сукцинату задіяні мітохондріальні комплекси 2, 3 і 4, які транспортують сумарно 6 йонів H^+ через внутрішню мітохондріальну мембрану за утилізації одного атома O ($H^+/O = 6$). Натомість, за окиснення НАДН₂ задіяні комплекси 1, 3 4, а співвідношення H^+/O становить 10.

Важливим фактом є те, що оптимальна комбінація субстратів (глюкоза, глутамін, піруват) не лише покращувала адаптаційну здатність мітохондрій, а й знижувала протоніф-індуковану деполяризацію. Відомо, що глутамін покращує стан пацієнтів з гострим панкреатитом [227], а піруват захищає ацинарні клітини *in vitro* від апоптозу та некрозу [228]. Можливо, механізмом

захисного впливу цих субстратів є саме зменшення деполяризації мітохондрій. Експериментальні дані перевірки цієї гіпотези представлені у розділі 3.6.

Підсумки

Максимальна швидкість та стабільність роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози значною мірою залежить від здатності клітин транспортувати і катаболізувати субстрати окиснення для забезпечення достатньої швидкості генерації відновлювальних еквівалентів і підтримання мембранного потенціалу. Найвища адаптаційна здатність мітохондрій цих клітин проявляється за комбінації глюкози з піруватом і глутаміном.

Основні публікації:

1. Manko B.O., Bilonoha O.O., Manko V.V. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization // Ukr. Biochem. J. – 2019. – Vol. 91, № 3. – P. 34–45.

3.2.2. Вплив первинних агоністів на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози

Секреторну функцію ацинарних клітин підшлункової залози регулює нейромедіатор ацетилхолін та інтестинальний гормон холецистокінін (ХЦК). Для забезпечення енергетичних потреб процесів секреції ці первинні агоністи через вторинного посередника Ca^{2+} спричиняють деполяризацію мітохондрій [21], [229], підвищення рівня НАД(Ф)Н [20], АТФ [18] та стимуляцію клітинного дихання [75]. Однак невивченою є роль різних шляхів окиснення та субстратного забезпечення ацинарних клітин у забезпеченні високого рівня мітохондріального дихання за активації процесів секреції.

Для підтримання нормального функціонування ацинарних клітин підшлункової залози надзвичайно важливою є роль інсуліну. Завдяки близькому розміщенню та прямому сполученні через кровоносні судини зв'язки між екзокринною та ендокринною частинами підшлункової залози є дуже активними. Інсулін у високій концентрації, який секретують β -клітини, в першу

чергу досягає ацинарних клітин [230] і впливає на базальну та стимульовану секрецію [231], [232], [233], експресію генів [234] і синтез травних ферментів [235]. Відомо, що діабет часто супроводжується недостатністю екзокринної функції підшлункової залози [236]. Проте вплив інсуліну на мітохондріальні окисні процеси у ацинарних клітинах не досліджений.

Метою наступних експериментів було дослідити особливості адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за стимуляції ацетилхоліном, ХЦК та інсуліном.

* * *

У попередніх дослідженнях ми вже вивчали механізми інтенсифікації дихання ацинарних клітин за дії холіноміметика карбахоліну [75]. Однак вплив ХЦК на дихання не досліджений. У першому експерименті ми додавали ХЦК у полярографічну комірку з ацинарними клітинами (рис. 3.12). ХЦК чинив різний вплив на дихання в залежності від його концентрації. Стимуляція у помірній концентрації гормону 0,1 нмоль/л викликала однофазне підвищення швидкості дихання на приблизно 10% впродовж 3 хв експерименту без очевидного піку дихання (рис. 3.12 А).

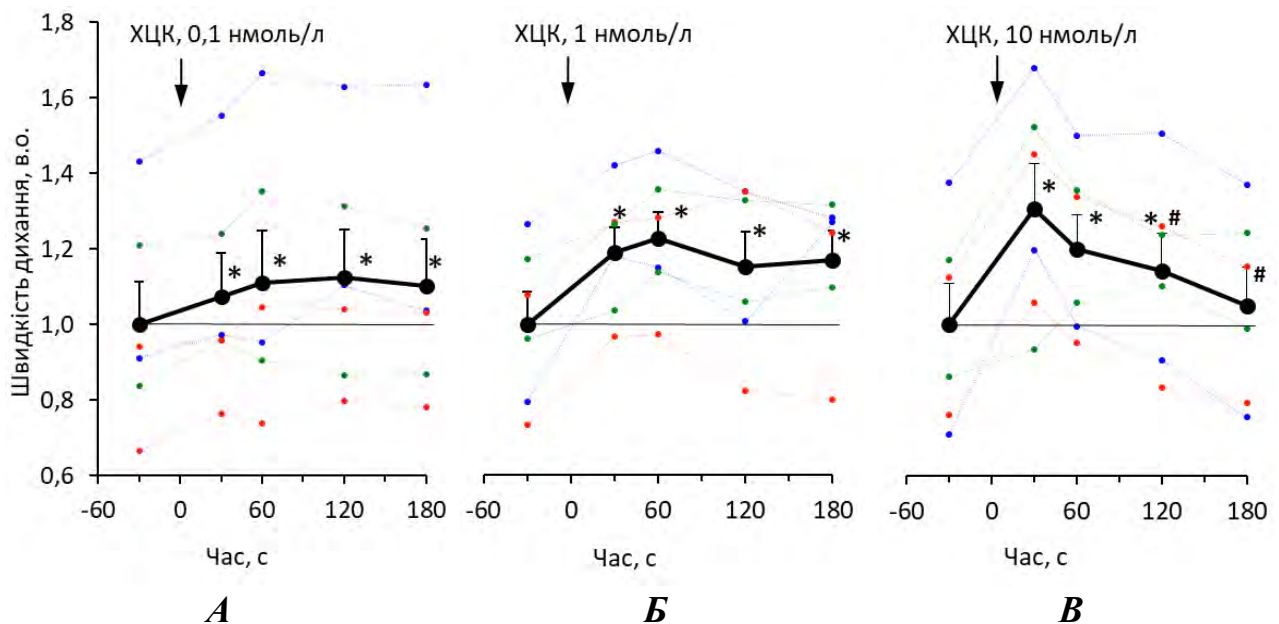


Рис. 3.12. Внесення ХЦК у комірку стимулює дихання панкреатичних ацинусів: тонкі лінії – результати окремих експериментів; у розчині були присутні глюкоза (10 ммоль/), глутамін та піруват (по 2 ммоль/л), * – статистично

вірогідна різниця щодо дихання без холецистонініну з $P < 0,05$, # – щодо дихання 30 с після внесення ХЦК з $P < 0,05$, $n = 6$

За гіперстимуляції (10 нмоль/л) виникав двофазний ефект – впродовж 30 с спостерігали початкове пікове зростання дихання на 30%, після чого дихання знижувалось до базального рівня (рис. 3.12 В). У відповідь на внесення 1 нмоль/л ХЦК споживання кисню панкреатичними ацинусами досягало піку (+20 %) приблизно через 1 хв (рис. 3.12 Б). Варто підкреслити значну варіабельність відповідей окремих препаратів (рис. 3.12, тонкі лінії). Такий вплив цього агоніста на базальне дихання є подібним до ефектів карбахоліну [75]. Пригнічення дихання за високих концентрацій може бути спричинене десенситизацією рецепторів до ХЦК і відповідає даним про низьку секреторну відповідь ізольованих ацинусів за гіперстимуляції [237].

На наступному етапі ми досліджували вплив 15 хв преінкубації з помірними концентраціями ацетилхоліну (4,5 мкмоль/л) та ХЦК (0,5 нмоль/л) на роз'єднане дихання (рис. 3.13). За окиснення глюкози обидва агоністи спричиняли стимуляцію базального дихання на 16–25%, однак не впливали на роз'єднане дихання (рис. 3.13 Б). Зростання швидкості базального дихання необхідне для підвищення синтезу АТФ за активації енергозатратних процесів секреції, як ми вже показали раніше [75].

Подібну закономірність спостерігали і за наявності крім глюкози ще й глутаміну у середовищі (рис. 3.13 Г). Однак за додавання пірувату ацетилхолін та ХЦК суттєво підвищували не лише базальне (на 36 і 37 %), а й роз'єднане дихання, причому за всіх концентрацій FCCP (Рис. 3.13 В). Параметри роз'єданого дихання представлено у таблиці 3.8. Вони, загалом, були подібними до отриманих у попередніх дослідженнях (розділ 3.1) Максимальне роз'єднане дихання зростало за дії ацетилхоліну та ХЦК збільшилася на 56 і 37,5% відповідно лише за наявності пірувату у середовищі. Однак оптимальна концентрація протонофора не зазнавала змін (табл. 3.8).

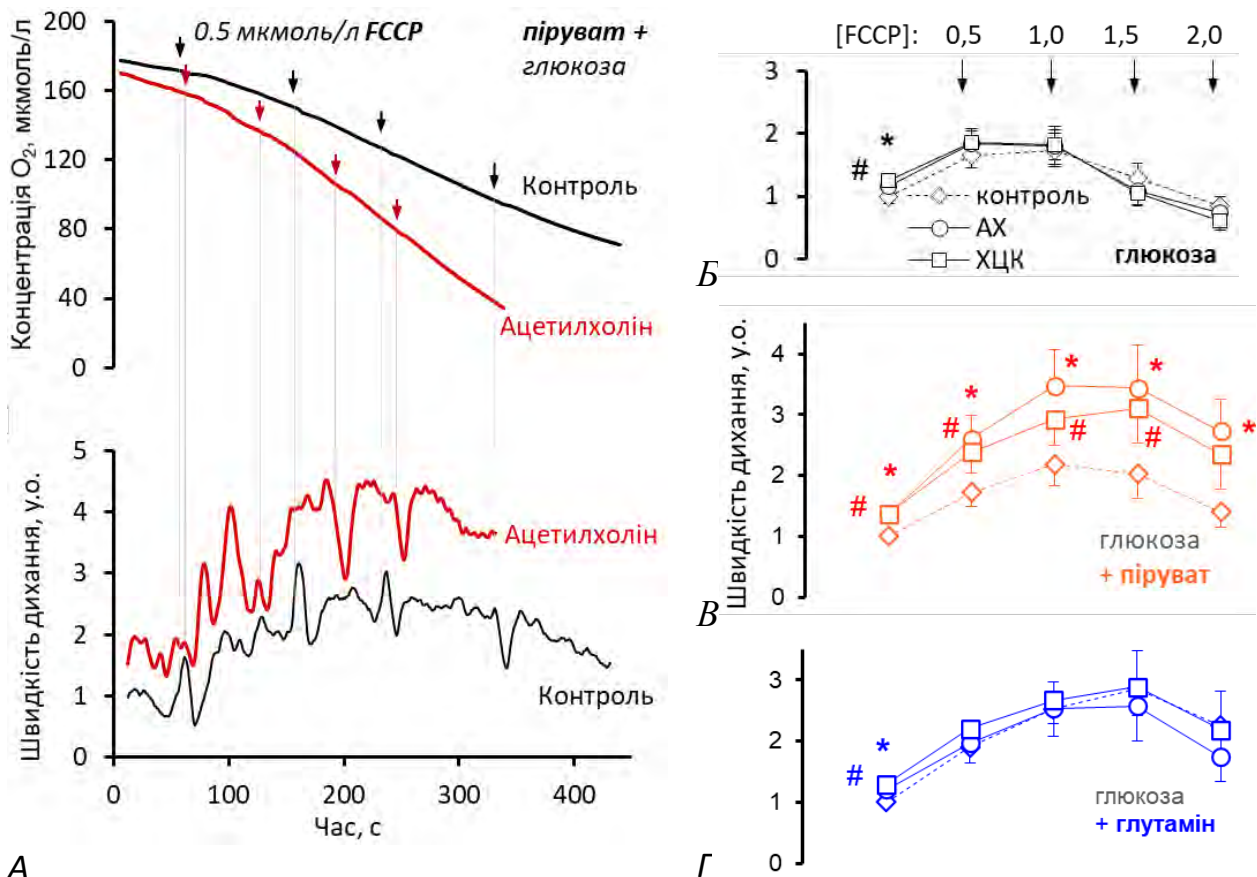


Рис. 3.13. Роз'єднане дихання ацинарних панкреатитів за дії первинних агоністів ацетилхоліну (АХ, 4,5 мкмоль/л) і ХЦК (0,5 нмоль/л): А– оригінальний запис та розраховані миттєві швидкості, інші фігури – дихання за окиснення глюкози (Б), глюкози і пірувату (В) або глюкози і глутаміну (Г); статистично вірогідна різниця щодо контролю за дії АХ (*) чи ХЦК (#) з $P < 0,05$; $n = 11$ (Б) або 6 (В, Г)

Очевидною причиною зростання швидкості окиснення пірувату є активація піруватдегідрогенизи іонами Ca^{2+} , що є вторинними посередниками за активації М3-холінорецепторів чи рецепторів ССК1 ацинарних клітин. Важливо, що Ca^{2+} збільшує кількість активного нефосфорильованого ензиму що призводить до зростання V_{max} [238], та швидкості дихання пермеабілізованих ацинарних клітин [239]. Ми припускаємо, що стимуляція базального дихання за умови відсутності пірувату у середовищі теж могла частково бути зумовлена підвищенням окиснення пірувату, утвореного у гліколізі. У наступній серії досліджень ми використовували естер субстрату іншої Ca^{2+} -залежної дегідрогенази диметил- α -кетоглутарат, для якої показано зростання K_m [238], а

не $V_{\max}$. У іншу пробу додавали монометилсукцинат як негативний контроль (комплекс 2 дихального ланцюга не є Ca^{2+} -залежним).

Виявилось, що ні базальне, ні роз'єднане дихання не змінювалось у цих експериментах за дії первинних агоністів (рис. 3.14). Очевидно, за насичуючих концентрацій субстрату (2 ммоль/л) не вдалось виявити можливий результат зниження K_m α -кетоглутаратдегідрогенази. Насторожує факт відсутності впливу ацетилхоліну та ХЦК на базальне дихання за умов наявності естерів субстратів. Це може свідчити про деякі порушення процесів трансдукції Ca^{2+} -сигналів чи секреції за дії цих речовин.

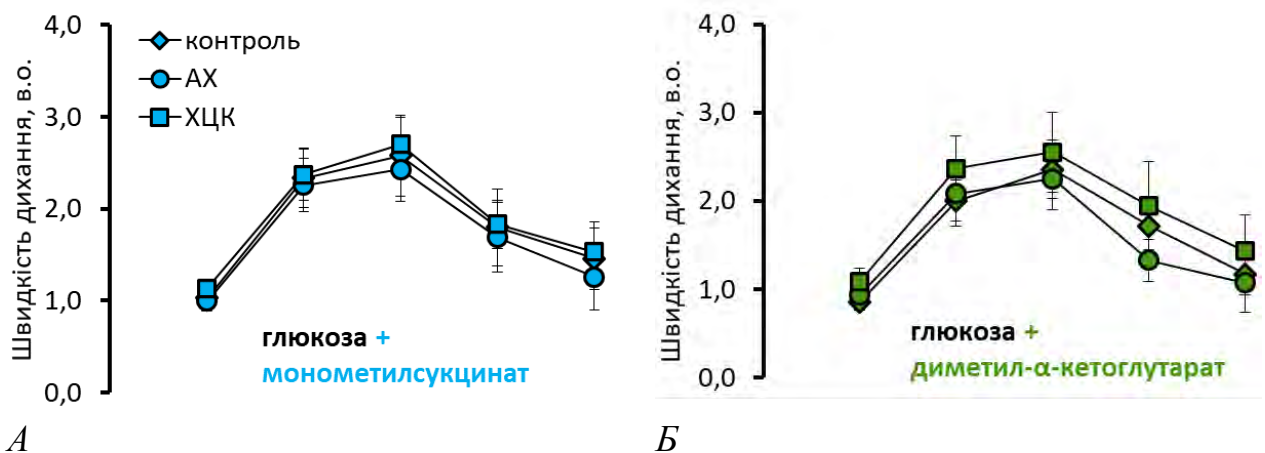


Рис. 3.14. Ацетилхолін (АХ) і ХЦК не впливають на роз'єднане дихання за наявності у середовищі монометилсукцинату (А) чи диметил- α -кетоглутарату (Б), $n = 6$

Отже, саме активація піруватдегідрогенази за стимуляції секреції забезпечує високу адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Такий механізм швидкої адаптації мітохондрій необхідний для забезпечення високого рівня синтезу АТФ за підвищених енергетичних потреб клітини. Оскільки швидкість стимульованого агоністами базального дихання була значно нижчою, ніж максимальне роз'єднане дихання (особливо за окиснення пірувату), клітини, ймовірно, ніколи повністю не використовують цей запас окисної здатності мітохондрій за фізіологічних умов (стимуляція секреції). Тим не менше, додаткове джерело пірувату підвищує зростання базального дихання, таким чином уможливлуючи швидше поповнення запасів АТФ для забезпечення секреції. Виявлене зростання роз'єданого дихання за окиснення

пірувату може бути захисним механізмом мітохондрій за дії патогенних чинників, що спричиняють значну деполяризацію їх мембрани. Саме тому у наступних дослідженнях (розділи 3.6 і 3.8) ми вивчали можливість застосування пірувату для підвищення життєздатності клітин підшлункової залози за дії шкідливих чинників.

У наступній серії експериментів ми інкубували ізольовані панкреатичні ацинуси впродовж 20 хв з інсуліном (100 нмоль/л) за 37 °С у базовому середовищі, що містило глюкозу або піруват. Тривалість інкубації було дещо збільшено для забезпечення інтерналізації рецепторів інсуліну. Виявилось, що інсулін стимулює базальне та роз'єднане дихання (за 0,5 мкмоль/л FCCP) за окиснення глюкози, але не пірувату (рис. 3.15, табл. 3.8). Як і у попередніх експериментах з ацетилхоліном, дихання зростало незначно – на 27 та 18 %, відповідно. Інсулін також підвищував максимальне роз'єднане дихання на 22 %, але не змінював оптимальної концентрації протонофора (табл. 3.8).

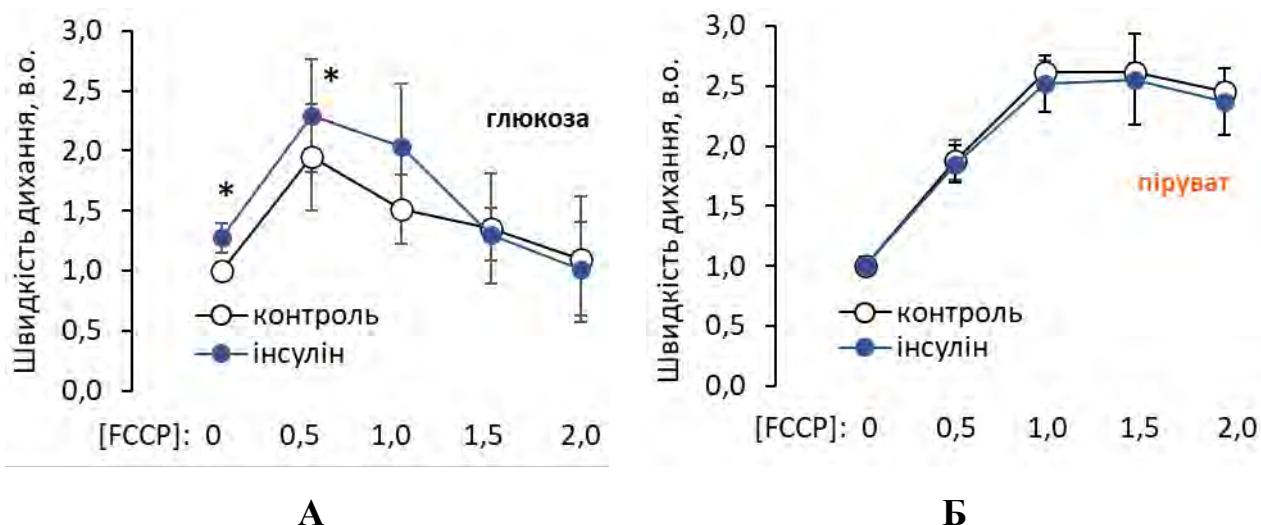


Рис. 3.15. Інсулін стимулює дихання панкреатичних ацинусів за окиснення глюкози (10 ммоль/л, А), але не пірувату (2 ммоль/л, Б): * – статистично вірогідна різниця щодо контролю згідно *парного* t-тесту з $P < 0,05$, $n = 4$

Ці зміни дихання доводять, що інсулін через вплив на його рецептори у ацинарних панкреацитах [140] стимулює метаболізм і/або транспорт глюкози, як і в інших тканинах. Відомо, що у клітинах підшлункової залози інсулін інтенсифікує гліколітичну, але не мітохондріальну, продукцію НАДН [142]. Як вважають [142], ці дані свідчать про переключення з мітохондріального на

гліколітичний шлях синтезу АТФ. Однак стимуляція інсуліном базального дихання за присутності глюкози свідчить також про підвищення мітохондріального окиснення. А оскільки цього не спостерігалось за присутності пірувату, ми припускаємо, що стимуляція дихання відбувалась шляхом утилізації в мітохондріях надлишку НАДН, утвореного в процесі гліколізу.

Відомо, що інсулін знижує спорідненість рецепторів до ХЦК у ацинарних панкреатитах [240]. Для дослідження можливої взаємодії між інсуліном і ХЦК у регуляції дихання, ми інкубували ацинарні клітини впродовж 30 хв з цими гормонами за присутності пірувату у середовищі. Як і у попередніх дослідженнях, дещо нижча концентрація ХЦК (0,1 нмоль/л) стимулювала базальне і роз'єднане дихання – на 64 та 35 %, відповідно (рис. 3.16). Інсулін повністю усував вплив ХЦК на дихання. Параметри роз'єданого дихання представлені у таблиці 3.8.

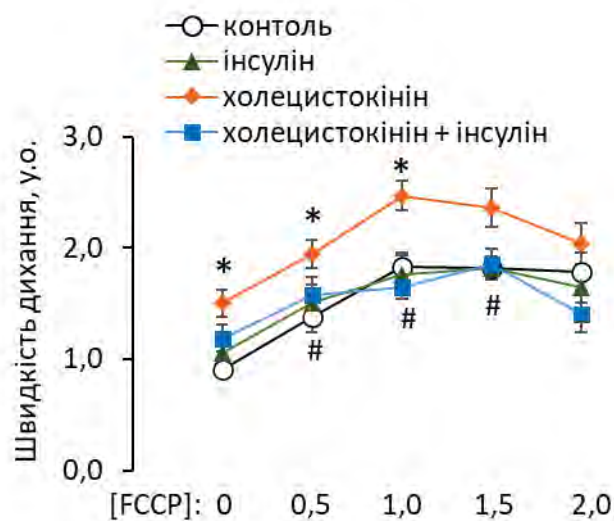


Рис. 3.16. Антагоністичний вплив інсуліну на стимульоване ХЦК дихання панкреатичних ацинусів: субстрат окиснення – піруват (2 ммоль/л); * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, # – статистично вірогідна різниця щодо експерименту з ХЦК; $n = 7$

Відомо, що інсулін у клітинах печінки [241] і адипоцитах [242] активує піруватдегідрогеназу, очевидно, для прискорення утилізації глюкози. Наші дані вказують на те, що у ацинарних клітинах цей механізм не реалізований: інсулін не лише не інтенсифікує дихання за присутності пірувату, а й усуває стимулюючий ефект ХЦК. Ми припускаємо, що причиною цього є модифікація

інсуліном Ca^{2+} -сигналів внаслідок активації Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани [142].

Таблиця 3.8.

Характеристика роз'єднаного дихання
панкреатичних ацинусів за дії ацетилхоліну, ХЦК та інсуліну

Умови	Оптимальна [FCCP], мкмоль/л	Максимальна швидкість дихання, в.о.
Глюкоза	$0,82 \pm 0,08$	$1,85 \pm 0,35$
+ ацетилхолін	$0,73 \pm 0,08$	$1,95 \pm 0,27$
+ ХЦК	$0,73 \pm 0,08$	$1,96 \pm 0,21$
Глюкоза і піруват	$1,17 \pm 0,10$	$2,32 \pm 0,45$
+ ацетилхолін	$1,10 \pm 0,19$	$3,62 \pm 0,64^*$
+ ХЦК	$1,33 \pm 0,10$	$3,19 \pm 0,53^*$
Глюкоза і глутамін	$1,42 \pm 0,08$	$2,89 \pm 0,60$
+ ацетилхолін	$1,30 \pm 0,12$	$2,76 \pm 0,49$
+ ХЦК	$1,42 \pm 0,08$	$2,91 \pm 0,46$
Глюкоза і монометилсукцинат	$0,83 \pm 0,11$	$2,64 \pm 0,42$
+ ацетилхолін	$0,92 \pm 0,08$	$2,25 \pm 0,35$
+ ХЦК	$1,00 \pm 0,00$	$2,70 \pm 0,29$
Глюкоза і диметил- α -кетоглутарат	$1,00 \pm 0,00$	$2,36 \pm 0,33$
+ ацетилхолін	$1,00 \pm 0,00$	$2,54 \pm 0,35$
+ ХЦК	$0,92 \pm 0,08$	$2,72 \pm 0,46$
Глюкоза	$0,50 \pm 0,00$	$1,95 \pm 0,44$
+ інсулін (20 хв)	$0,63 \pm 0,13$	$2,39 \pm 0,41$
Піруват	$1,38 \pm 0,13$	$2,66 \pm 0,09$
+ інсулін (20 хв)	$1,25 \pm 0,14$	$2,71 \pm 0,31$
Піруват	$1,29 \pm 0,15$	$1,93 \pm 0,12$
+ інсулін (30 хв)	$1,21 \pm 0,10$	$1,86 \pm 0,11$
+ ХЦК (30 хв)	$1,14 \pm 0,09$	$2,61 \pm 0,11^*$
+ інсулін і ХЦК (30 хв)	$1,36 \pm 0,14$	$1,90 \pm 0,15 \#$

час інкубації – 15 хв за винятком випадків, вказаних у дужках; * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без агоністів), # – порівняно з дією ХЦК, $P < 0,05$

Підсумки

Первинні агоністи ацетилхолін, холецистокінін та інсулін стимулюють окисні шляхи у ацинарних клітинах підшлункової залози, що проявляється у підвищенні швидкості базального та максимального дихання, але не його

стабільності. За впливу ацетилхоліну і холецистокініну ключовою є інтенсифікація окиснення пірувату, а інсулін посилює катаболізм глюкози.

Основні публікації:

1. Білонога О.О., Манько Б.О., Манько В.В. Влив ацетилхоліну та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози // Фізіол. журн. – 2019. – Т. 65, № 4. – С. 73–81.
2. Bilonoha O., Manko B.O., Manko V. Effects of insulin on adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2020. – Випуск 83. – С. 24–30.

3.2.3. Залежність роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів від їх життєздатності

Дослідження ізольованих клітин *in vitro* слід проводити на препаратах з високою життєздатністю і функціональною активністю, що максимально наближені до стану клітин в організмі. Традиційні методи дослідження життєздатності, такі як фарбування трипановим синім чи тест МТТ недостатньо повно характеризують стан клітин. Відомо, що клітинне дихання і стан мітохондрій корелюють із життєздатністю клітин. Так, у клітинах нирок холодове ушкодження спричиняє порушення морфології клітин, втрату цілісності плазматичної мембрани і зниження базального та роз'єданого дихання практично до нуля [27]. У кардіоміоцитах зниження максимального роз'єданого дихання відбувається паралельно із зростанням кількості некротичних клітин за експериментальної гіпоксії-реперфузії [29].

У ізольованих ацинарних панкреатитах гідроген пероксид, менадіон [10] та антиоксидант mitoQ [28] дозозалежно знижують швидкість роз'єданого дихання та цілісність плазматичної мембрани. Базальне дихання знижується або зростає залежно від діючої речовини. Цікаво, що у деяких експериментах зниження дихання наступало раніше, ніж інші ознаки втрати життєздатності

клітин [28], [24]. Тому у наступних експериментах ми досліджували можливість використання параметрів роз'єданого дихання для оцінки життєздатності ізольованих панкреатичних ацинусів.

* * *

Для найкращого виявлення можливих закономірностей для аналізу було взято велику вибірку контрольних (за окиснення глюкози) записів дихання препаратів панкреатичних ацинусів, отриманих із 74 різних тварин. 59 з них було досліджено із використанням приладу YSI 5300 (експеримент 1), а решту – за допомогою 6-канального оксиметра Strathkelvin SI929 (експеримент 2). Цілісність плазматичних мембран оцінювали за фарбування трипановим синім і вона була вищою у експерименті 2. Дані експерименту 1 були розділені на 2 кластери відповідно до кількості трипан-позитивних клітин із порогом у 95%. Відповідно, у кластері 2 кількість некротичних клітин була статистично вірогідно нижчою (рис. 3.17 А), а у експерименті 2 – ще нижчою (< 2 %).

Ми припустили, що максимальна швидкість роз'єданого дихання залежить від кількості некротичних клітин. Однак різниці між трьома групами даних не виявлено (рис. 3.17 Б). Мабуть, різниця у життєздатності клітин була надто малою, щоб виявити зміни максимальної швидкості дихання.

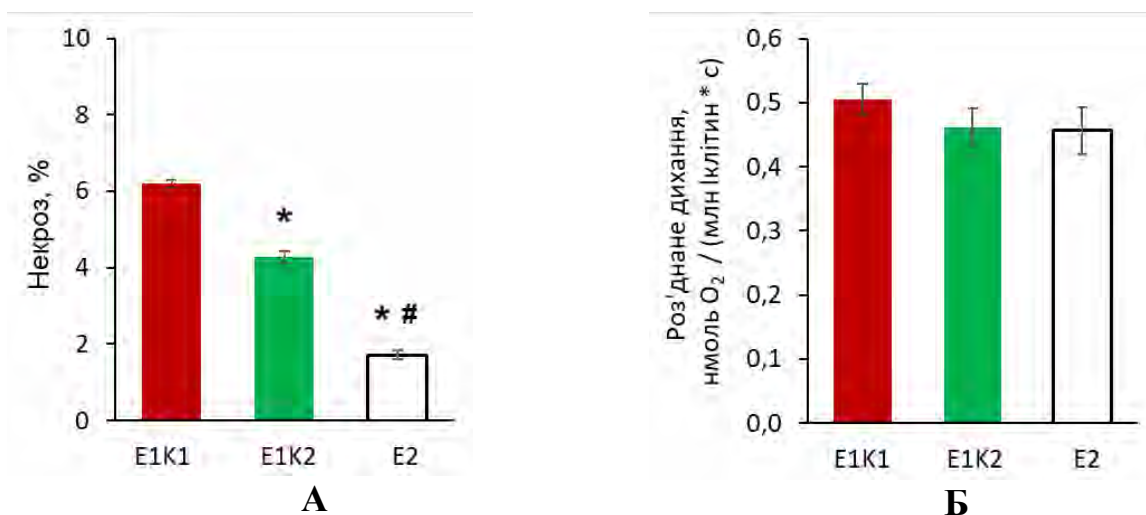


Рис. 3.17. Життєздатність (А) та максимальне роз'єдане дихання панкреатичних ацинусів: E1K1 – експеримент 1 кластер 1 (n=41), E1K2 – експеримент 1 кластер 2 (n = 18), E2 – експеримент 2 (n = 15), * – статистично вірогідна різниця щодо E1K1, # – щодо E1K2, P < 0,05

Детальніший аналіз швидкості роз'єданого дихання виявив, що за 2 мкмоль/л FCCP воно було статистично вірогідно нижчим у групі з найменшою життєздатністю (E1K1, рис. 3.18). Це свідчить про знижену стабільність роз'єданого дихання. Базальне дихання та роз'єдане дихання за низьких концентрацій протонофора не відрізнялось між групами. Не виявлено також різниці у диханні між кластером 2 експерименту 1 та експериментом 2, хоча ці дані отримані у різний час і з використанням різних приладів, а за рівнем життєздатності ці групи відрізнялись між собою.

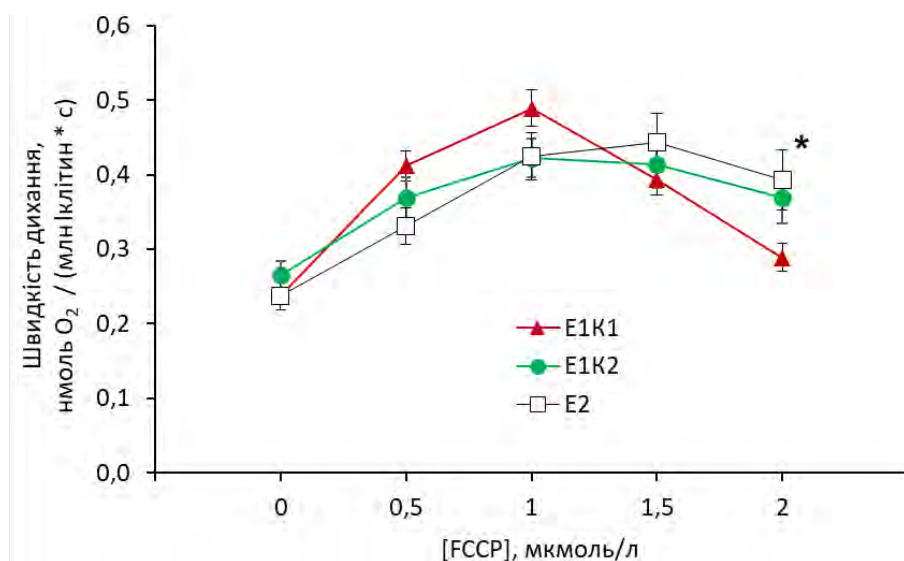


Рис. 3.18. Роз'єдане дихання панкреатичних ацинусів з різною життєздатністю: E1K1 – експеримент 1 кластер 1 (n=41), E1K2 – експеримент 1 кластер 2 (n = 18), E2 – експеримент 2 (n = 15), * – статистично вірогідна різниця щодо E1K1, P < 0,05

Для більш точної характеристики стабільності роз'єданого дихання ми розраховували коефіцієнт стабільності (КС) за формулою:

$$КС = (V_{1,5} + V_{2,0}) / (V_{0,5} + V_{1,0}),$$

де індекс біля швидкості (V) роз'єданого дихання відповідає концентрації протонофора у мкмоль/л.

Дані залежності стабільності роз'єданого дихання від відсотка клітин з цілісною плазматичною мембраною представлено на рис. 3.18. Над горизонтальною лінією – це експерименти, у яких швидкість дихання не знижувалась або зростала після внесення FCCP у концентраціях 1,5 – 2 мкмоль/л. Виявилось, що більшість (31 із 41) препаратів ацинусів у кластері 1 експерименту

1 мали стабільність нижче 1,0, на відміну від двох інших кластерів (рис. 3.19). Ми також провели кореляційний аналіз між стабільністю дихання та кількістю трипан-негативних клітин і встановили, що коефіцієнт Пірсона r становив 0,53 для всієї вибірки ($n = 74$, $P < 0,001$) та 0,47 для експерименту 1 ($n = 59$, $P < 0,001$). Отже, чим менша життєздатність клітин, тим нижчою є стабільність роз'єданого дихання.

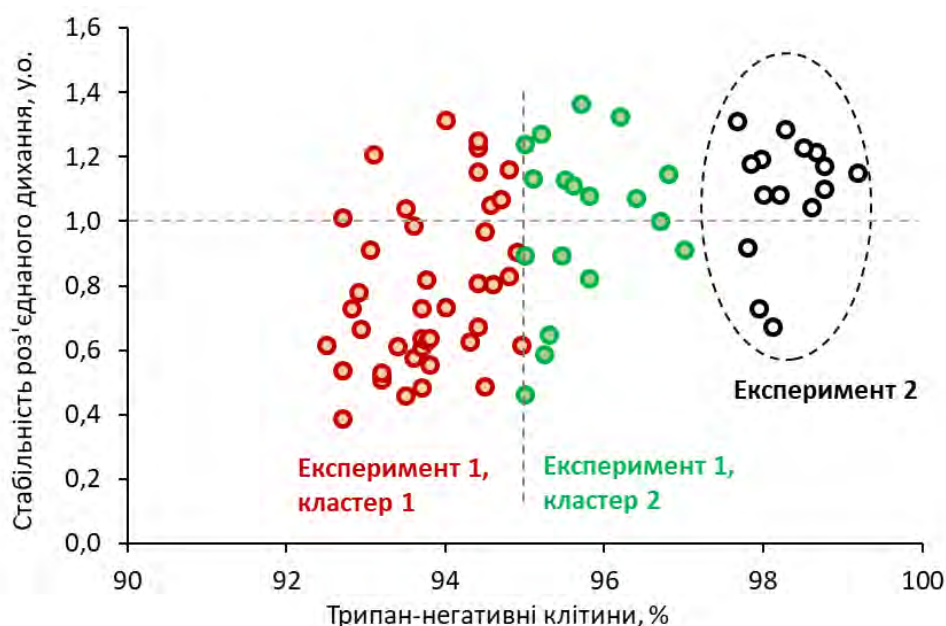


Рис. 3.19. Стабільність роз'єданого дихання ізолюваних панкреатичних ацинусів залежить від життєздатності клітин: експеримент 1 проведено з використанням приладу YSI 5300, експеримент 2 – Strathkelvin SI929; кластер 1 – життєздатність клітин нижче 95 % (червоні точки), кластер 2 – життєздатність клітин понад 95 % (зелені точки), $n = 74$

Результати дослідження показали, що незначна різниця у кількості трипан-позитивних клітин суттєво впливає на стабільність роз'єданого дихання. Ми припустили, що стабільність дихання залежить від стану (більшості) клітин з цілісними мембранами, який був гіршим у препаратах з більшою кількістю трипан-позитивних клітин. Те, що клітини з ушкодженою плазматичною мембраною не вносять значного вкладу у сумарну швидкість дихання, показано попередніми роботами на пермеабілізованих [71] чи ушкоджених клітинах [27].

Тест МТТ є концептуально подібним підходом до вивчення метаболічної активності клітин, оскільки він ґрунтується на активності НАД(Ф)Н-залежних оксидоредуктаз. У людських трофобласт-подібних клітинах зниження

максимальної швидкості роз'єданого дихання за дії лінолевої кислоти корелює з результатами МТТ-тесту [243]. Проте у астроцитах глутамат знижував максимальне роз'єдане дихання, але не впливав на життєздатність згідно МТТ-тесту [244]. Такі результати за дії глутаміну ми також отримали і описали у розділі 3.6. Важливою проблемою інтерпретації зниження швидкості роз'єданого дихання та інших метаболічних параметрів є те, що часто причиною не є зниження життєздатності клітин. Це та деякі інші проблеми метаболічних тестів вже були описані в нещодавній статті Stepanenko et al. [245].

Результати цього експерименту приводять до кількох важливих висновків. По-перше, ми підтвердили, що недостатньо покладатись виключно на один підхід (цілісність плазматичної мембрани або метаболічна активність) до оцінки життєздатності клітин. По-друге, в експериментах доцільно використовувати тільки препарати ацинусів підшлункової залози з високою життєздатністю (> 95 % трипан-негативних) для недопущення (нефізіологічних) змін метаболізму, пов'язаних з ушкодженням клітин. І, по-третє, загальноприйнята методика визначення максимального роз'єданого дихання виявляється недостатньо чутливою для виявлення мітохондріальних і клітинних пошкоджень. Натомість, стабільність роз'єданого дихання за високих доз протонофорів є більш чутливим до пошкодження клітин параметром. Проте необхідно продовжити дослідження, щоб встановити, чи можна подібним чином виявити раннє пошкодження мітохондрій і клітин, спричинене іншими факторами.

Підсумки

Стабільність роз'єданого дихання є чутливим параметром для оцінки життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози.

Основні публікації:

1. Zub A, Manko B.V., **Manko B.O.**, Manko V., Babsky A. Uncoupled respiration stability of isolated pancreatic acini as a novel functional test for cell vitality // Biol. Stud. – 2023. – Vol.17(3). – P. 243–252.

3.3. Роль пірувату і глутаміну в забезпеченні стійкості ацинарних клітин підшлункової залози до токсичної дії етанолу за стимуляції холецистокініном

Ушкодження мітохондрій, як відомо, є залученим у патогенезі гострого панкреатиту. Було показано, що у тканинах підшлункової залози пацієнтів з гострим панкреатитом відбувається фрагментація мітохондрій [59]. Дослідження на моделях тварин вказують на те, що перевантаження мітохондрій йонами Ca^{2+} і активація мітохондріальної пори перехідної провідності може бути раннім етапом розвитку панкреатиту [9], [82]. Ця гіпотеза підтверджується тим, що інгібітори регулятора пори циклофіліну D знижують некроз ацинарних клітин, ізольованих з мишей [246] чи пацієнтів [82], а також покращують стан тварин з експериментальним панкреатитом [164].

На сьогодні загальноприйнятим є те, що саме споживання алкоголю є найважливішим чинником виникнення гострого панкреатиту. У дослідженнях *in vitro* показано, що ушкодження мітохондрій можуть бути проміжним етапом токсичної дії етанолу. Так, у ізольованих ацинарних клітинах мишей етанол спричиняв значну деполяризацію мітохондріальної мембрани та зниження рівня НАД⁺ [158]. Окрім того, продукти неокисного метаболізму етанолу етилові естери жирних кислот також токсичні для ацинарних панкреатитів. Етилові естери пальмітолеїнової кислоти спричиняють некроз ацинарних клітин підшлункової залози, тоді як комбінація етанолу з пальмітолеїновою кислотою – деполяризацію мітохондрій та зниження НАДН [11].

Гіперстимуляція секреції ХЦК є популярною моделлю гострого панкреатиту гризунів. ХЦК у високих концентраціях або його комбінація з алкоголем, спричиняє ушкодження ацинарних клітин у гризунів, як *in vitro* [206], [247], так і *in vivo* [158], [248]. Після гіперстимуляції ХЦК спостерігається деполяризація мітохондрій [158], і можливо це є визначальним чинником розвитку дисфункції та смерті клітини на додачу до інших механізмів, таких як тривале підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі [59], [206],

внутрішньоклітинна активація трипсиногену [208] і/або дезорганізація цитоскелету [207].

Токсична дія етанолу, ХЦК та інших агентів *in vitro* на мітохондріальні функції та життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози сильно варіює у різних дослідженнях. Не зрозуміло, наскільки добре ці ефекти *in vitro* відображають справжні процеси патогенезу людської хвороби особливо з огляду на те, що (1) за умов експерименту використовують короткочасну дію високих концентрацій патогенних стимулів, а (2) мітохондріальні процеси досліджують в різних умовах, за наявності чи відсутності глутаміну чи пірувату у середовищі [11], [158], [206]. У розділі 3.3 нами переконливо показано, що наявність пірувату чи глутаміну не лише суттєво впливає на відповідь клітинного дихання на деполяризацію мітохондрій, а й може знижувати деполяризуючий ефект протонофора завдяки постачанню додаткових відновлювальних еквівалентів. У нещодавньому дослідженні присутність пірувату або галактози у середовищі усувала патологічні ефекти багатьох чинників у ацинарних клітинах [167].

Тому метою наступних експериментів було перевірити, чи ефекти етанолу і ХЦК *in vitro* у помірних концентраціях, відповідних клінічним випадкам, на мітохондріальну окисну функцію, життєздатність та морфологію ізольованих панкреатичних ацинусів щурів залежить від додавання пірувату та глутаміну до середовища, а також дізнатись, які умови *in vitro* найкраще відтворюють вплив введення ХЦК і етанолу щурам.

* * *

У розділі 3.4 ми дослідили короткочасні ефекти ХЦК на дихання ацинарних клітин підшлункової залози. Для виявлення можливих негативних впливів, ми збільшили тривалість інкубації до 30 хв та досліджували різні концентрації цього гормону. У базовому середовищі, що містило глутамін і піруват ХЦК у помірній концентрації (0,1 нмоль/л) підвищував базальне та максимальне роз'єднане дихання на 32,0% та 25,6%, відповідно. Однак ХЦК не впливав на дихання, пригнічене інгібітором АТФ-синтази олігоміцином (рис. 3.20 А).

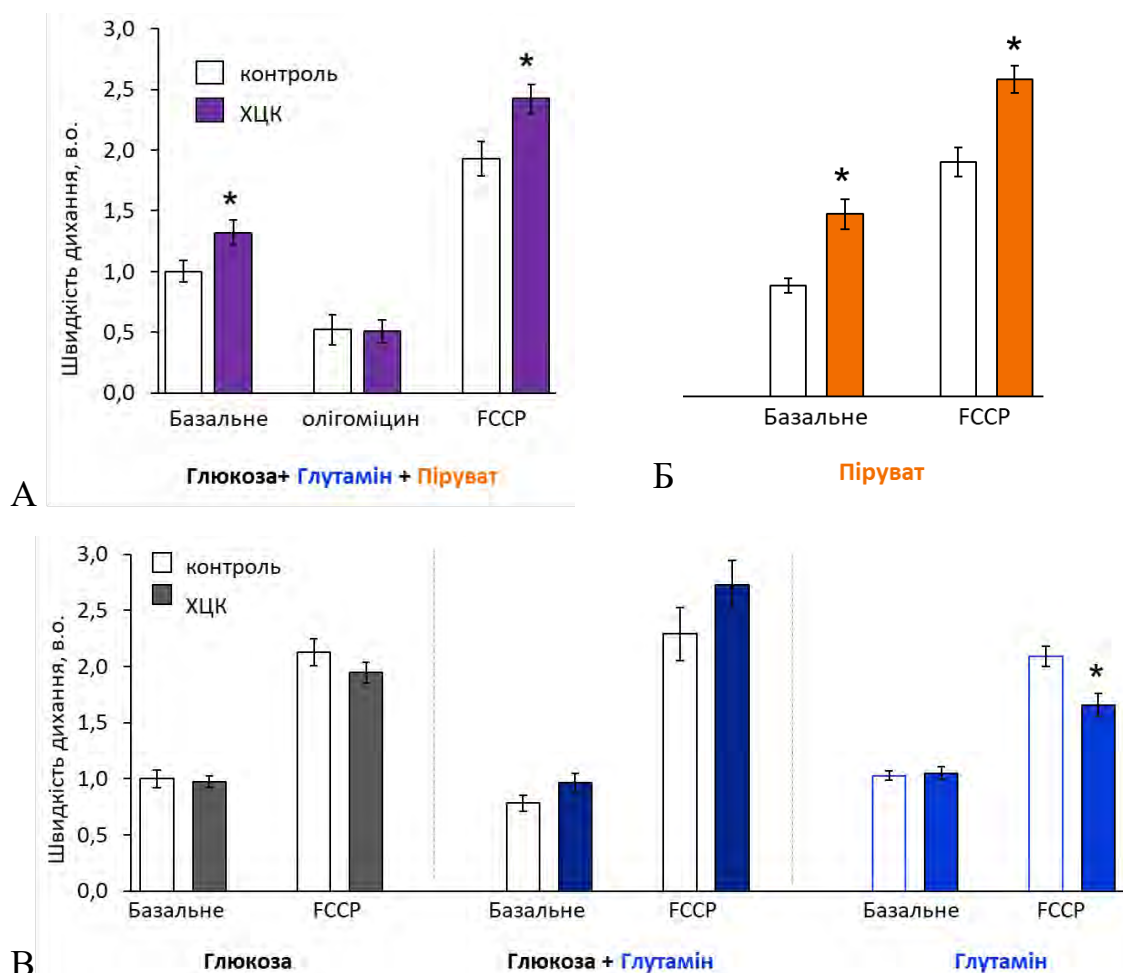


Рис. 3.20. Дихання панкреатичних ацинусів за стимуляції ХЦК (0,1 нмоль/л) залежить від наявності пірувату і глутаміну у середовищі: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 10$ (А) або 6 (Б, В)

Важливо, що виявлена стимуляція дихання відбувалась саме завдяки наявності пірувату у середовищі. Це було підтверджено наступними експериментами, у яких використовували різні середовища: з глюкозою, з глутаміном, з піруватом, а також з глюкозою і глутаміном. Лише у середовищі з піруватом (рис. 3.20 Б) була виявлена стимуляція дихання ХЦК. Натомість, статистично вірогідне зниження роз'єданого дихання спостерігалось у середовищі з глутаміном і без глюкози (рис. 3.20 В). При цьому не спостерігали змін стабільності роз'єданого дихання (дані не представлені). Варто зазначити, що ХЦК не впливав на базальне дихання за присутності глутаміну чи глюкози, що може свідчити про припинення секреторної діяльності через 30 хв інкубації. Наявність пірувату, очевидно, сприяє продовженню активації дихання, пов'язаної із секреторними процесами.

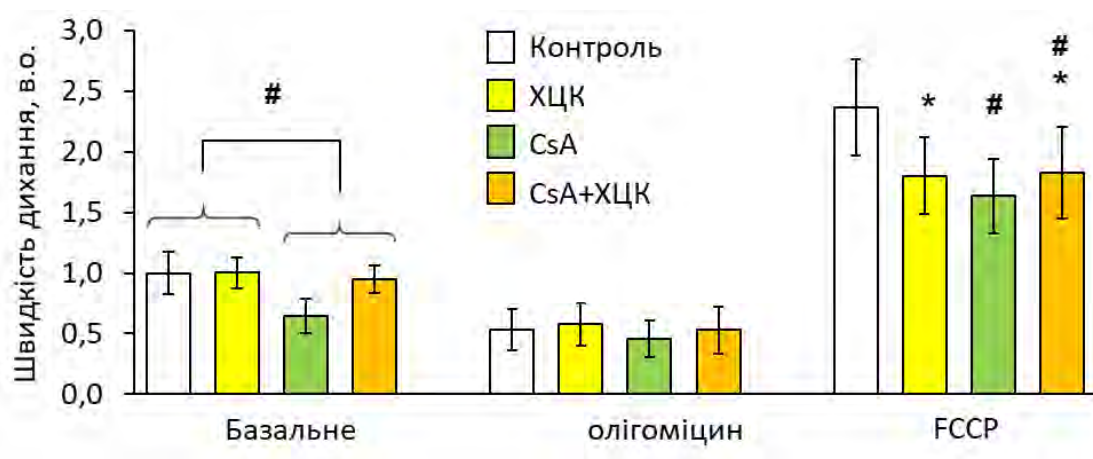


Рис. 3.21. Холецистокінін (ХЦК) і циклоспорин А (CsA, 25 мкмоль/л) знижують дихання панкреатичних ацинусів: статистично вірогідний вплив ХЦК (*) або CsA (#) згідно ANOVA з $P < 0,05$, $n = 6$

Інкубування панкреатичних ацинусів з холецистокініном у високій концентрації (10 нмоль/л) у базовому середовищі впродовж 30 хв (рис. 3.21). або 60 хв ($n=10$, дані не представлені) спричиняло зниження максимального роз'єданого дихання на близько 15%. Не було виявлено істотного впливу ХЦК на базальне чи олігоміцин-нечутливе дихання, що вказує на відсутність порушень sprzęження між диханням і окисним фосфорилуванням (рис. 3.21).

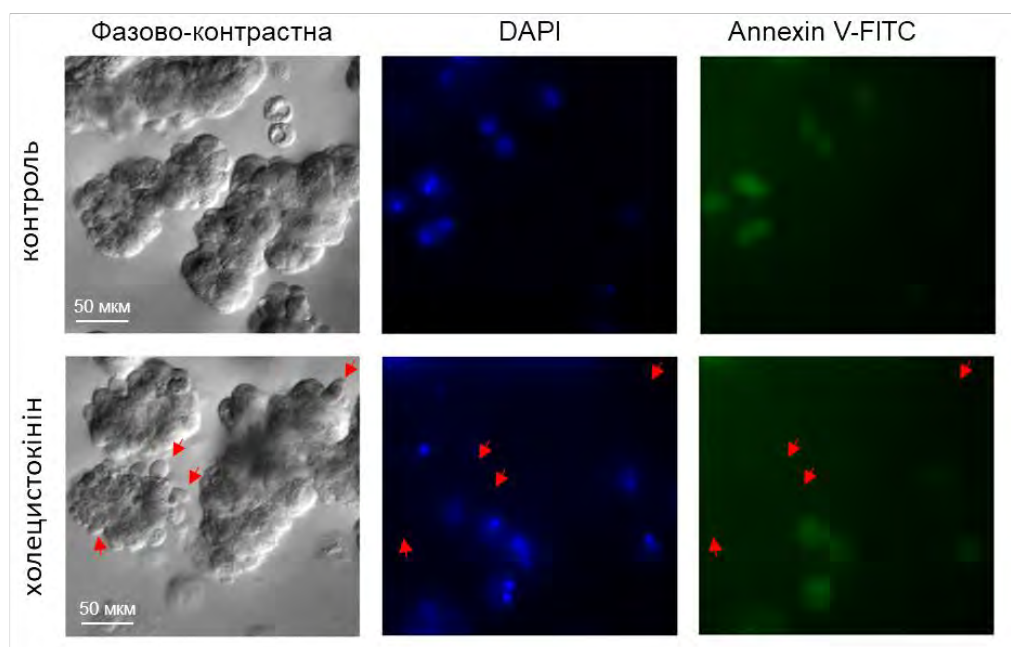


Рис. 3.22. Мікрофотографії панкреатичних ацинусів за дії 10 нмоль/л ХЦК; стрілками позначено місця блебів плазматичної мембрани

Для перевірки, чи негативний ефект 10 нмоль/л ХЦК на роз'єднане дихання пов'язаний із активацією мітохондріальної пори перехідної провідності, ми використали її інгібітор CsA (25 мкмоль/л), з яким преінкубували ацинуси впродовж 10 хв до інкубації з ХЦК. Встановлено, що CsA не усував інгібіторний ефект ХЦК на роз'єднане дихання. Більше того, він сам спричиняв зниження як базального, так і роз'єданого дихання (рис. 3.21). Не виявлено впливу CsA на олігоміцин-нечутливе дихання. Отже, CsA не збільшує процеси «витоку» протонів, не пов'язаного з окисним фосфорилуванням. Проте зниження базального дихання та відсутність змін олігоміцин-нечутливого дихання вказує на зниження саме окисного фосфорилування за дії CsA. Це добре узгоджується з даними, що мітохондріальна пора перехідної провідності формується білком АТФ-синтазою [249].

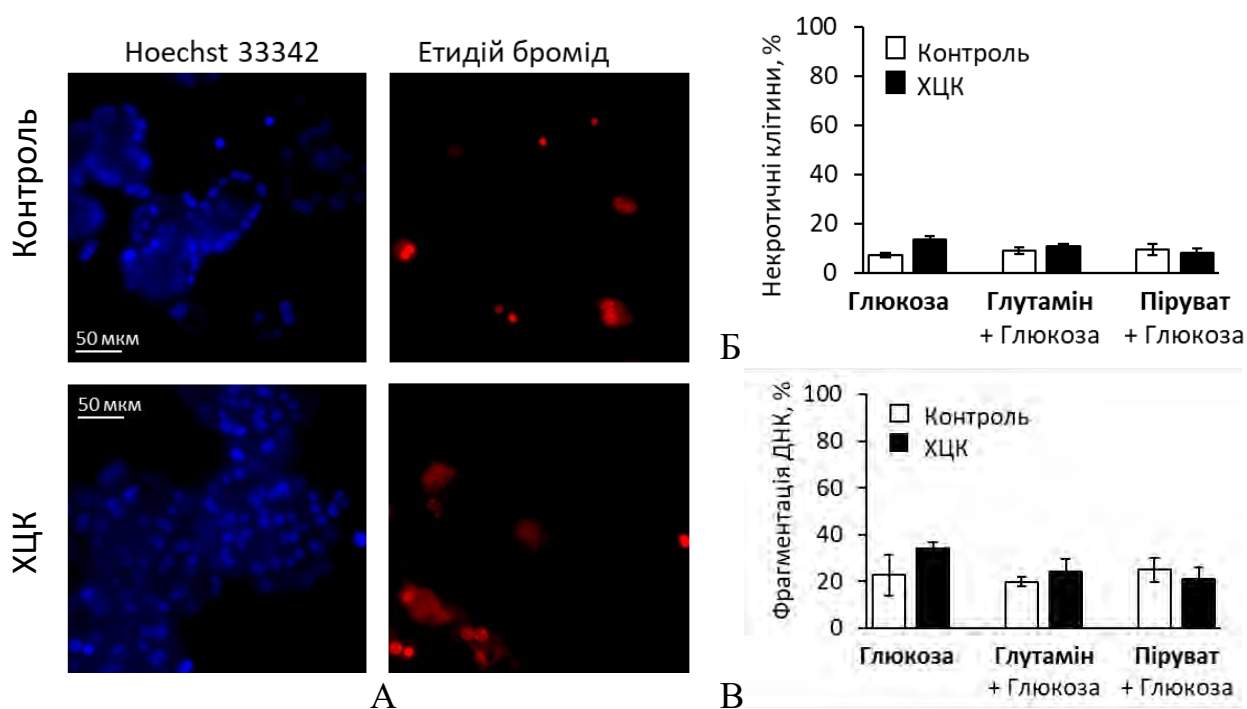


Рис. 3.23. Гіперстимуляція ХЦК (10 нмоль/л) не спричиняє загибелі панкреатичних ацинусів (Б) чи фрагментації їх ДНК (В), $n = 3$

Також ми вивчали вплив 10 нмоль/л ХЦК на морфологію та життєздатність ацинарних панкреатитів. Після 60 хв інкубації у базовому середовищі (з глутаміном і піруватом) ХЦК спричиняв блебінг плазматичної мембрани, але не підвищував рівень некрозу (рис. 3.22), що підтверджено фарбуванням DAPI,

який не проникав у живі клітини. Фарбування Annexin V-FITC було виявлене у клітинах, зафарбованих DAPI, але не у живих клітинах з блебами (рис. 3.22). Отже, блебінг не був пов'язаним із апоптозом.

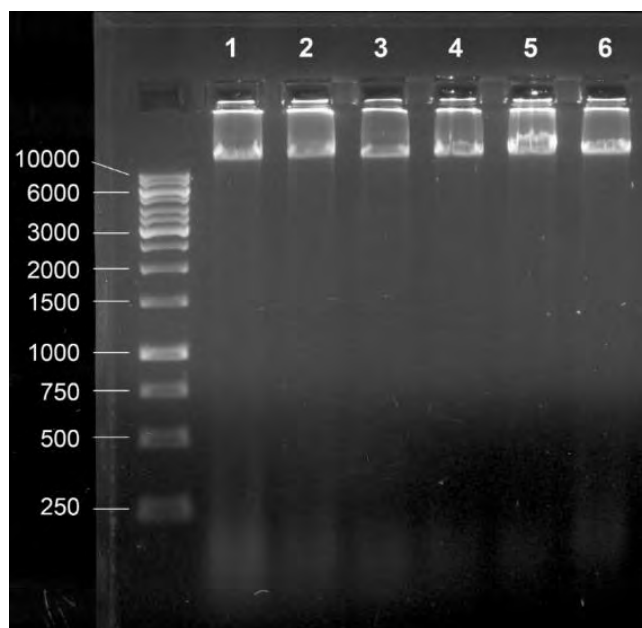


Рис. 3.24. Електрофорез у агарозному гелі ДНК ацинарних клітин підшлункової залози після 60 хв інкубації з: 1, 4 – глюкозою, 2, 5 – глюкозою і піруват, 3, 6 – глюкозою і глутаміном; 1, 2, 3 – контроль, 4, 5, 6 – ХЦК (10 нмоль/л)

У іншій серії досліджень ми оцінили, чи здатні глутамін або піруват захищати ацинарні клітини від ушкодження за гіперстимуляції ХЦК. Однак у жодному експерименті нами не було виявлено статистично вірогідного підвищення рівня некрозу після інкубації впродовж 60 хв з ХЦК (10 нмоль/л), за фарбуванням Hoechst 33342 і етидій бромідом (рис. 3.23). Кількість некротичних клітин не перевищувала 15%. Деяка тенденція до зростання некрозу спостерігалась у розчині з глюкозою. Також не було доказів індукції апоптозу: не відбувалось підвищення кількості фрагментованого ДНК, визначеного дифеніламіновим методом (рис. 3.23). Окрім того, електрофорез ДНК у агарозному гелі не показував фрагментації на дискретні частини (рис 3.24), що відповідає даним попереднього дослідження [207]. Ці дані свідчать про стійкість ізольованих ацинусів щурів до гіперстимуляції ХЦК, на відміну від ізольованих ацинарних клітин мишей [206]. Неочікуваним виявилось те, що за умов інкубації з глюкозою чи з додаванням глутаміну або пірувату не спостерігали блебінгу,

який відбувався у попередньому експерименті за наявності і пірувату, і глутаміну (рис. 3.22).

Для моделювання типового випадку вживання алкоголю у поєднанні з стимуляцією секреції ми використали помірні концентрації етанолу (20 ммоль/л) та ХЦК (0,1 нмоль/л) і вивчили їх вплив на дихання панкреатичних ацинусів. У цьому і подібних експериментах ХЦК та етанол додавали одночасно до базового позаклітинного середовища. Після 30 хв інкубації ХЦК (0,1, але не 10 нмоль/л) спричиняв типове підвищення швидкості базального дихання, яке було пригнічене етанолом (рис. 3.25). Також підтверджено статистично вірогідний вплив ХЦК на роз'єднане дихання, однак не етанолу. Подібні змін спостерігали через 60 хв інкубації (дані не представлено), однак окрім них ще виявлено стимуляцію базального дихання етанолом. Також, етанол усував стимуляцію роз'єданого дихання ХЦК.

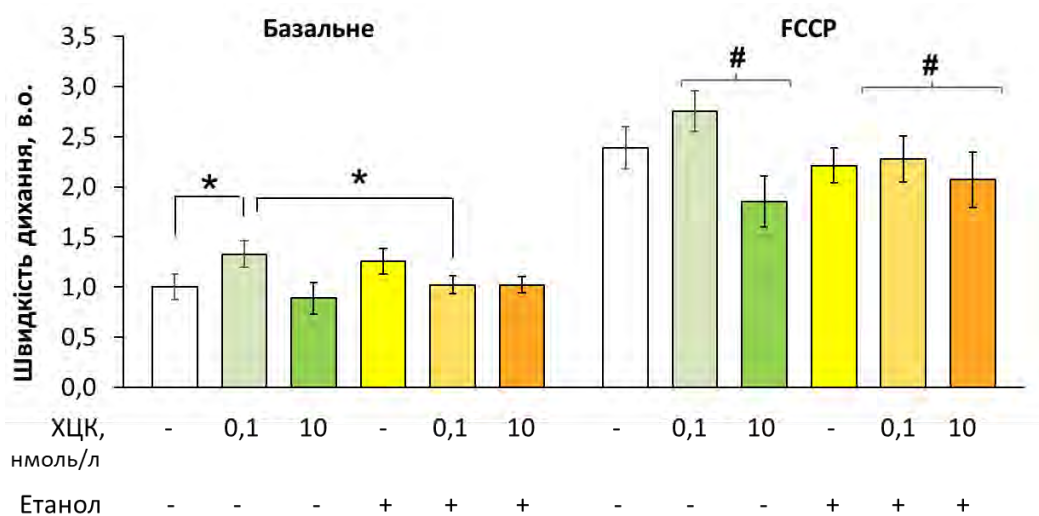


Рис. 3.25. Дихання панкреатичних ацинусів за інкубації з ХЦК і етанолом (30 хв) у базовому позаклітинному середовищі, що містило глюкозу, піруват і глутамін: # – статистично вірогідний вплив ХЦК згідно з ANOVA, $P < 0,05$, * – статистично вірогідна різниця $P < 0,05$ згідно post-hoc тестів, $n = 7$

Відомо, що етанол у високих концентраціях пригнічує стимульовану секрецію амілази, принаймні у ізольованих ацинарних клітинах мишей [250]. Тому ми також дослідили вплив етанолу *in vitro* на секрецію амілази панкреатичними ацинусами. Базальний рівень секреції був низьким і становив $2,3\% \pm 0,3\%$ і $3,9\% \pm 0,5\%$ від загального вмісту в клітинах через 30 та 60 хв

інкубації відповідно (рис. 3.26). ХЦК (0,1 нмоль/л) суттєво підвищував секрецію амілази (до $13,5\% \pm 1,6\%$ за 30 хв та $16,7\% \pm 1,5\%$ за 60 хв). ХЦК у високій концентрації (10 нмоль/л) спричиняв нижчу секреторну відповідь. Етанол не впливав на базальну секрецію, але статистично вірогідно знижував відповідь на стимуляцію ХЦК (рис. 3.26).

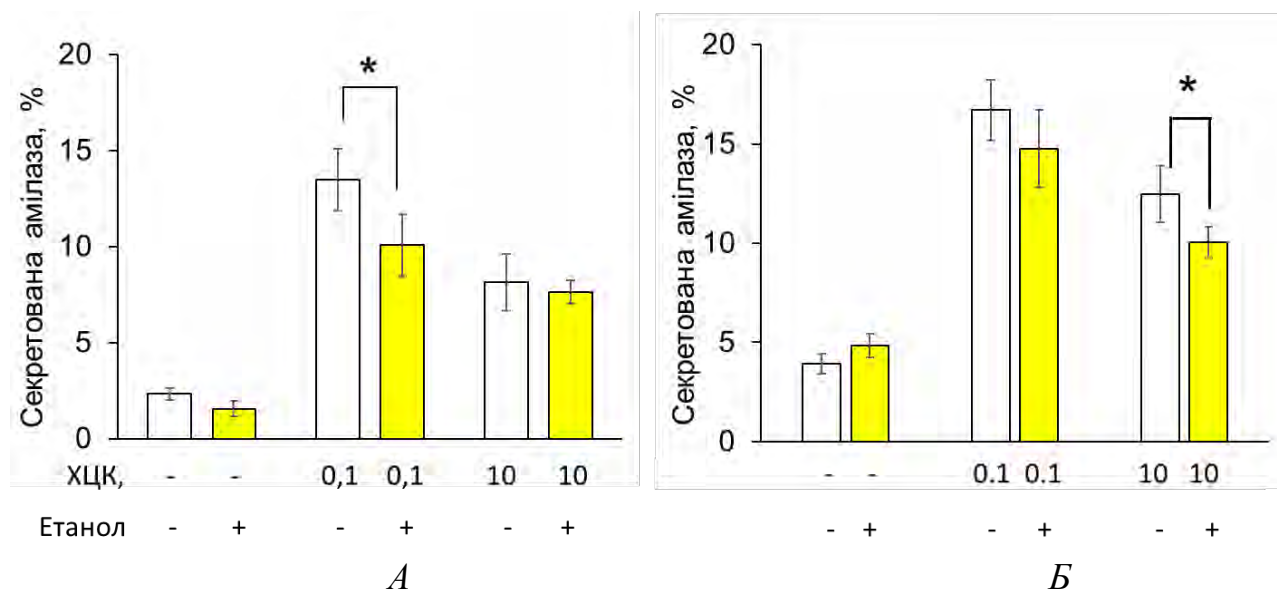


Рис. 3.26. Етанол пригнічує стимульовану ХЦК секрецію амілази панкреатичними ацинусами за інкубації впродовж 30 (А) та 60 хв (Б): концентрації ХЦК вказані у нмоль/л, * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ згідно post-hoc тестів $n = 7$

Стимуляція базального дихання етанолом чи ХЦК може бути пов'язана з деполяризацією мембрани мітохондрій, що було раніше показано за дії високих концентрацій етанолу (50–100 ммоль/л) [158]. Ми дослідили мітохондріальний мембранний потенціал за допомогою потенціал-чутливого флуоресцентного зонду родаміну 123 у режимі де-квенчингу за його високої концентрації (20 мкмоль/л). За таких умов зростання флуоресценції відбувається за зниження мітохондріального мембранного потенціалу завдяки перерозподілу частини зв'язаного барвника з придушеною флуоресценцією з мітохондрій у цитозоль. Як видно з рис. 3.27, у контролі флуоресценція родаміну 123 неоднорідна, що вказує на акумуляцію в мітохондріях, тоді як комбінація FCCP (2 мкмоль/л) з ротеноном (10 мкмоль/л) впродовж 20 хв спричиняла однорідну цитоплазматичну флуоресценцію (рис. 3.27).

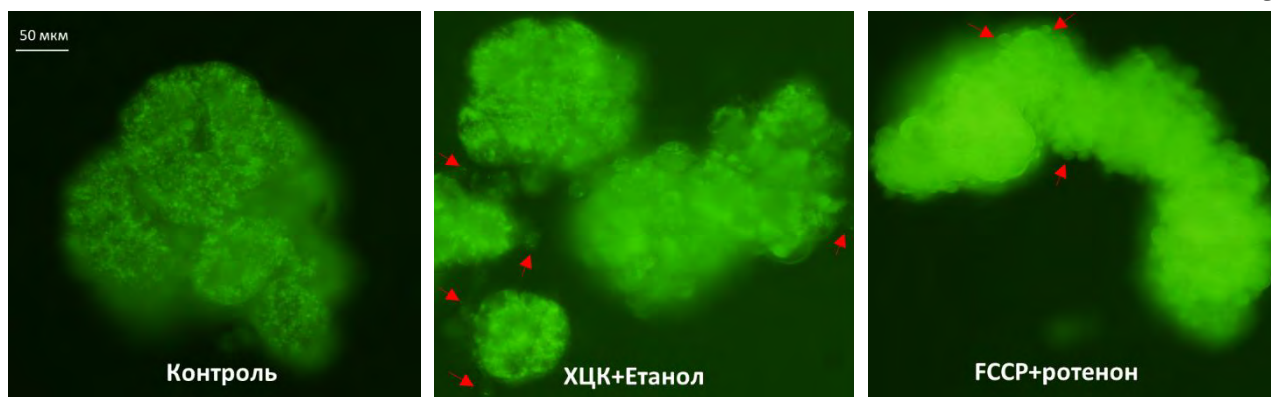


Рис. 3.27. Мікрофотографії флуоресценції панкреатичних ацинусів, забарвлених родаміном 123, стрілки вказують на блеби плазматичної мембрани

За умов інкубації у позаклітинному середовищі впродовж 2 годин ми не спостерігали впливу ХЦК (0,1 нмоль/л) на інтенсивність флуоресценції родаміну 123 (рис. 3.28). Етанол спричиняв помірне підвищення інтенсивності флуоресценції, але різниця не була статистично вірогідною ($P=0,0507$, рис 3.28). Повна деполяризація спостерігалась лише за наявності ротенону та FCCP.

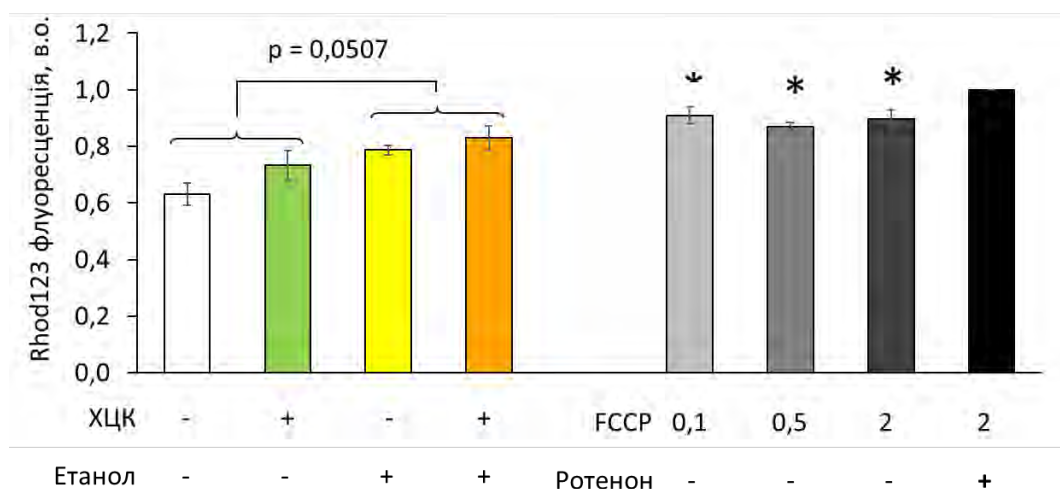


Рис. 3.28. Вплив етанолу та ХЦК на флуоресценцію родаміну 123 у панкреатичних ацинусах: інкубація впродовж 2 год у базовому середовищі, * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, $n = 4$

На жаль, цей методичний підхід, як виявився, мав недостатній динамічний діапазон порівняно з даним інших авторів [21]. Можливо це тому, що барвник навантажували впродовж останніх 15 хв експерименту, вже після більшості тривалості дії досліджуваних агентів, а не перед їх додаванням [21], а також через значні розміри ацинусів і можливі труднощі у дифузії барвника. Для таких

цілей краще використовувати барвник TMRM у низьких концентраціях, до якого ми не мали доступу на час експерименту.

Оскільки інтенсивність сигналу залежала як від накопичення барвника в клітинах загалом (більше барвника – більший сигнал), так і від його компартменталізації (більше барвника в мітохондріях – менший сигнал). Оскільки накопичення залежить від активності транспортерів плазматичної мембрани [251], необхідно було оцінити його накопичення у клітинах. Це було здійснено спеціально розробленим спектрофотометричним методом. Виявилось, що в межах нашого експерименту не було статистично вірогідної різниці між групами у концентрації накопиченого родаміну 123 (рис. 3.29). Після перерахування значень флуоресценції на кількість накопиченого родаміну 123 не було виявлено статистично вірогідного впливу ХЦК чи етанолу.

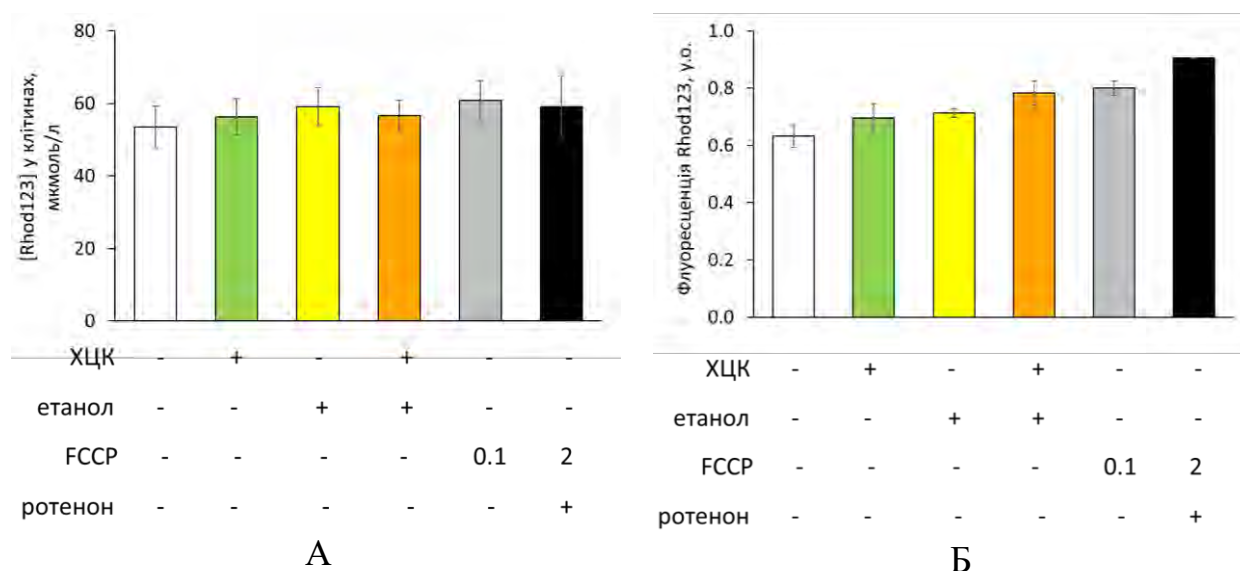


Рис. 3.29. Накопичення родаміну 123 (А) та корегований рівень його флуоресценції у панкреатичних ацинусах, $n = 4$

Також ми проаналізували некроз та блебінг клітин після 2 годин інкубації з 0,1 нмоль/л ХЦК та 20 ммоль/л етанолу. Ця комбінація спричинила мале (близько 5 %) але статистично вірогідне підвищення кількості некротичних клітин (рис. 3.30), на відміну від дії окремих речовин. Блебінг майже не спостерігався у контрольних клітин і після інкубації лише з етанолом (рис. 3.30). Проте він виникав за дії ХЦК, а кількість клітин з блебами зростала вдвічі за його

одночасної дії з етанолом. Цікаво, що сильний блебінг також виникав через 20 хв інкубації з FCCP і ротеноном (рис. 3.30), але не за дії самого FCCP.

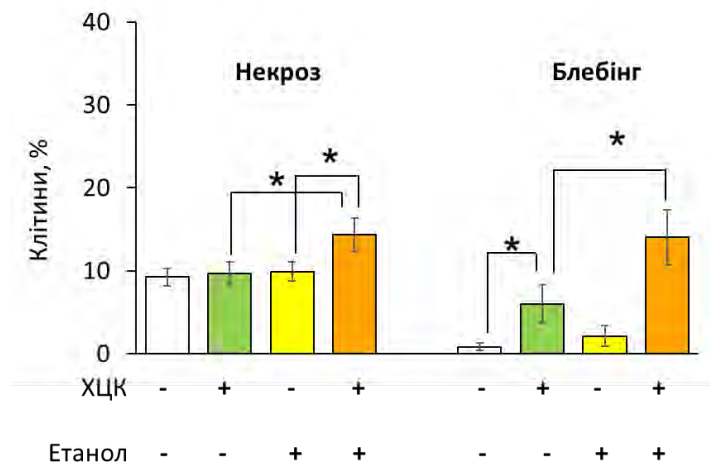


Рис. 3.30. Життєздатність та морфологія ацинарних клітин підшлункової залози за дії етанолу і ХЦК у базовому позаклітинному середовищі: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, $n = 6$

Усі описані ефекти етанолу і ХЦК були досліджені за умов інкубації в базовому середовищі, що містило піруват, глутамін і додаток незамінних амінокислот MEM. Для перевірки гіпотези, що ефекти ХЦК і етанолу залежать від присутності субстратів у середовищі, ми провели додаткові експерименти.

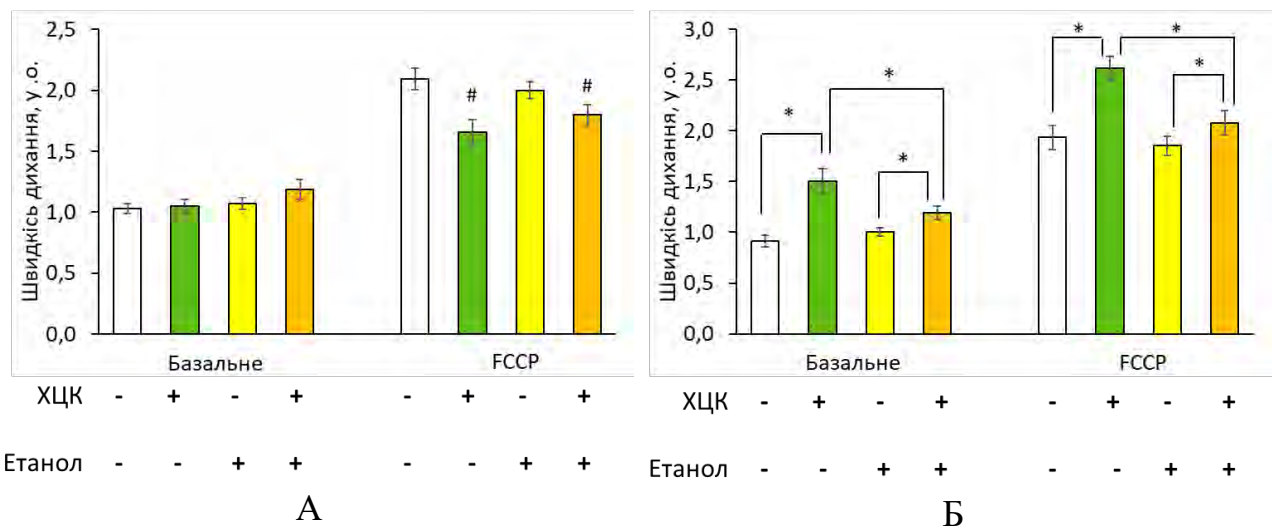


Рис.3.31. Вплив етанолу та ХЦК на дихання панкреатичних ацинусів за окиснення глутаміну (А) або пірувату (Б): # – статистично вірогідний вплив ХЦК згідно ANOVA з повторами, * –, доведена взаємодія між факторами, статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ підтверджена post-hoc тестами, $n=6$

У першій серії досліджень ми інкубували клітини впродовж 30 хв у середовищі, що містило лише глутамін або лише піруват. Дисперсійний аналіз

показав, що за окиснення глютаміну ХЦК (0,1 ммоль/л) вірогідно знижував максимальну швидкість роз'єданого дихання (рис. 3.31). Натомість, за окиснення пірувату спостерігалась взаємодія між факторами (етанол та ХЦК) у дії на базальне та роз'єдане дихання. ХЦК стимулював дихання, тоді як етанол (20 ммоль/л) частково пригнічував цю стимуляцію, хоча сам не впливав на дихання (рис. 3.31).

У іншому експерименті для дослідження дихання ацинуси спочатку преінкубували впродовж 30 хв з комбінацією ХЦК (0,1 ммоль/л) і етанолу (20 ммоль/л) у різних середовищах, що містили лише частину субстратів: глюкозу, піруват, глютамін чи додаток незамінних амінокислот, або всі ці речовини (рис. 3.32). Тоді додавали всі відсутні компоненти і продовжували інкубації впродовж 15 хв, після чого досліджували дихання. Це було зроблено для виявлення максимальної швидкості роз'єданого дихання, яку можна спостерігати лише коли у розчині є комбінація глюкози, глютаміну і пірувату, як описано у розділі 3.3.

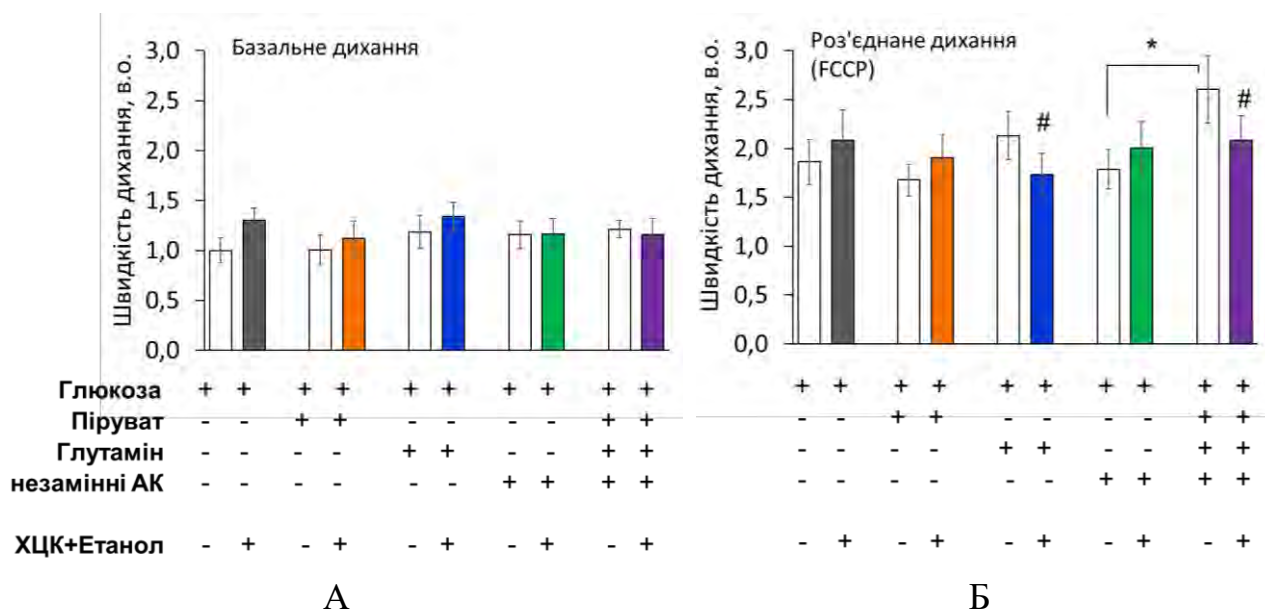


Рис. 3.32. Вплив складу середовища на ефекти етанолу та ХЦК на базальне (А) і роз'єдане (Б) дихання панкреатичних ацинусів: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ підтверджена post-hoc тестами, # –щодо контролю (без ХЦК і етанолу) з $P < 0,05$, $n=7$

Однак ми не виявили різниці у максимальній швидкості дихання в контролях між цим та попереднім експериментом: швидкість роз'єданого

дихання була в середньому в 2 рази вищим порівняно з базальним. Лише коли глутамін і піруват були присутні весь час експерименту, максимальне роз'єднане дихання було статистично вірогідно вищим (рис. 3.32). Базальне дихання не залежало від присутності субстратів під час преінкубації, ні від впливу ХЦК / етанолу. Виявилось також, що комбінація етанолу з ХЦК спричинила зниження роз'єданого дихання у двох випадках, коли глутамін був присутнім весь час експерименту. Не виявлено впливу додатку незамінних амінокислот на дихання (рис. 3.32).

На основі декількох попередніх експериментів можна зробити висновок, що глутамін є причиною зниження роз'єданого дихання за інкубації з ХЦК (незалежно від присутності етанолу), однак етанол усуває стимуляторний вплив ХЦК на дихання за окиснення пірувату.

Для кращого розуміння механізмів впливу досліджуваних агентів ми також визначали рівень автофлуоресценції НАД(Ф)Н, мітохондріальний мембранний потенціал, життєздатність та морфологію клітин. Ацинуси інкубували у середовищах з глюкозою, глутаміном і /або піруватом впродовж 2 годин. Збільшення тривалості інкубації частково пов'язане із необхідністю навантаження барвника родаміну 123 впродовж останніх 15 хв та більш віддаленими змінами життєздатності клітин.

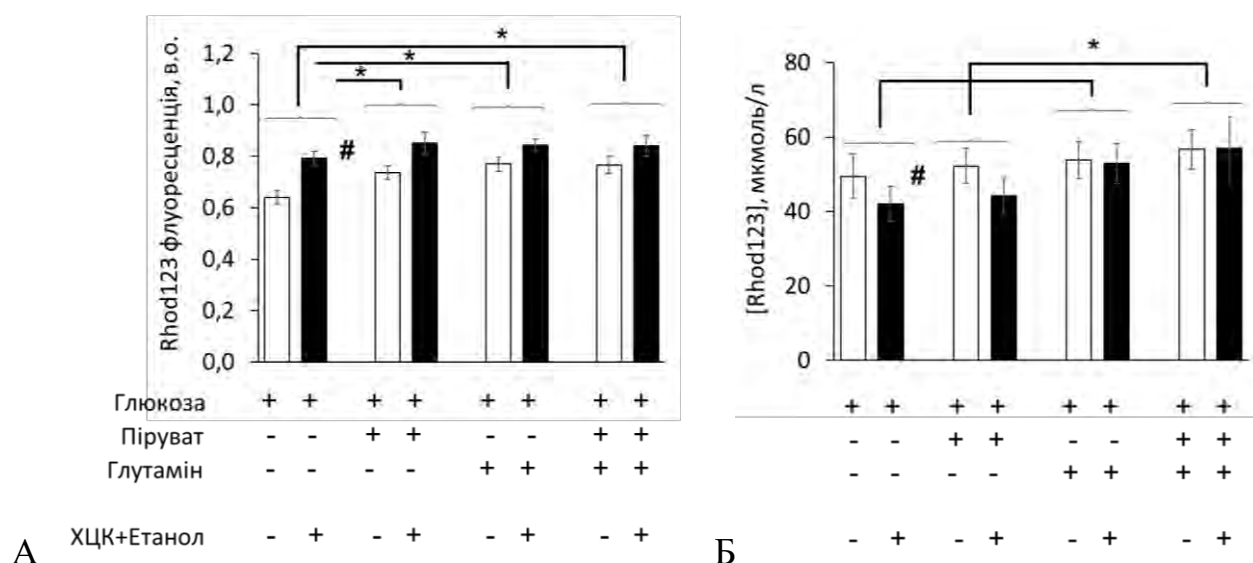


Рис. 3.33. Флуоресценція (А) та накопичення (Б) родаміну 123 за різних умов середовища та дії ХЦК й етанолу: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, # –щодо контролю (без ХЦК і етанолу) з $P < 0,05$, $n=6$

Двофакторний дисперсійний аналіз показав, що як флуоресценція, так і накопичення родаміну 123 залежали від типу субстрату окиснення, а також змінювались під дією суміші ХЦК з етанолом (рис. 3.33). Для врахування різної кількості накопичення барвника і оцінки лише змін флуоресценції, пов'язаних із мембранним потенціалом мітохондрій ми перерахували показники флуоресценції на кількість накопиченого барвника у клітинах (рис. 3.34А). Після таких розрахунків статистично вірогідне зростання флуоресценції (зниження мембранного потенціалу) спостерігалось лише за дії ХЦК й етанолу і лише у випадках, коли в середовищі не було глютаміну (рис. 3.34А).

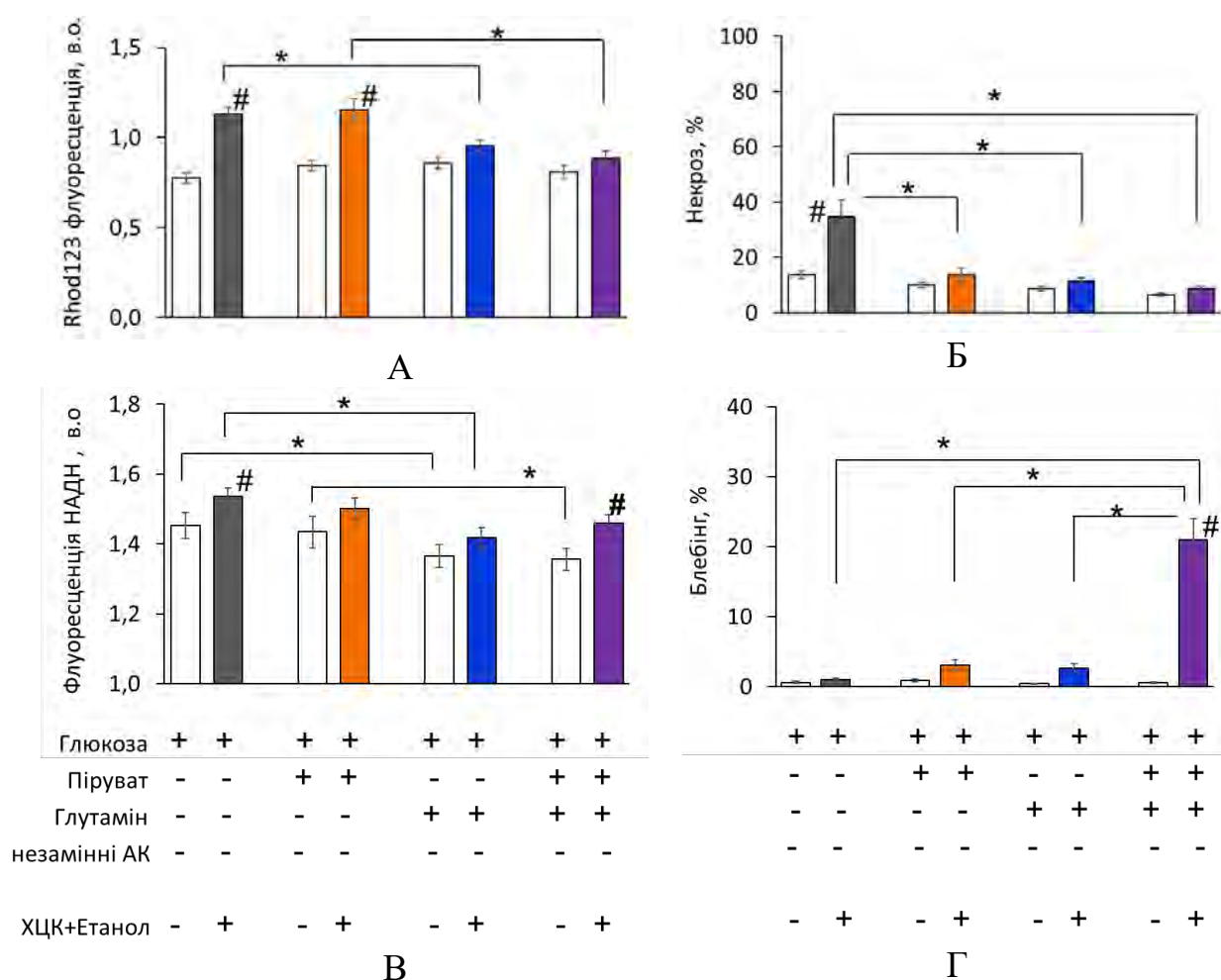


Рис. 3.34. Скорегована флуоресценція родаміну 123 (Rhod123, А), НАД(Ф)Н (В), некроз (Б) і блебінг (Г) ацинарних клітин підшлункової залози за дії ХЦК і етанолу: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, # –щодо контролю (без ХЦК і етанолу) з $P < 0,05$, $n=7$ або 6 (А)

Глутамін також спричиняв зниження автофлуоресценції НАД(Ф)Н як в контролі, так і за інкубації з ХЦК і етанолом (рис. 3.34). За дії цієї суміші ми

спостерігали досить значне підвищення автофлуоресценції у всіх випадках, однак воно виявилось статистично вірогідним лише за окиснення глюкози чи суміші глюкози, глутаміну і пірувату. Комбінація ХЦК й етанолу спричиняла суттєве зростання кількості некротичних клітин (до 35%), коли у середовищі була присутня лише глюкоза. Однак наявність глутамату, пірувату чи їх обох повністю запобігала підвищенню смерті клітин (рис. 3.34). Було виявлено статистично значуще зростання блебінгу за дії ХЦК й етанолу, причому лише за одночасної наявності у середовищі глюкози, глутаміну й пірувату (рис. 3.34). Блебінг також зростав через 1 годину інкубації ($n = 3$, дані не представлено). Це підтверджує раніше отриману закономірність за впливу ХЦК.

Для вивчення впливу короточасної дії етанолу та ХЦК на панкреатичні ацинуси було проведено експеримент *in vivo*. Концентрацію етанолу у плазмі через 2 години після його внутрішньошлункового визначали двома методами. Згідно з оксидазно-пероксидазним методом, вона становила $25,6 \pm 4,7$ ммоль/л після введення лише етанолу та $18,8 \pm 3,2$ ммоль/л у тварин, яким вводили ще й ХЦК (рис. 3.35А). Ці результати узгоджувались із даними газової хроматографії: $28,4 \pm 3,3$ після введення етанолу і $21,9 \pm 10,5$ ммоль/л після введення етанолу й ХЦК. Активність амілази у крові не зростала у жодній з груп тварин, що вказує на відсутність ознак ушкодження підшлункової залози (рис. 3.35Б).

Для дослідження впливу ХЦК й етанолу на підшлункову залозу ми ізолювали панкреатичні ацинуси через 2 години після введення етанолу й через 1 годину після ін'єкції ХЦК. Кількість некротичних клітин у свіжих ізолюваних ацинусах не змінювалась (рис. 3.35В), як і загальна кількість виділених клітин (не представлено). Проте, зростала частка клітин з мембранними блебами у групі тварин, яким вводили ХЦК і етанол – до 30% від загальної кількості клітин (рис. 3.35Г). Не виявлено зростання блебінгу за окремої дії ХЦК чи етанолу. Дещо високий рівень блебінгу ($\sim 10\%$) у контролі є типовим для свіжої суспензії ізолюваних ацинусів і зазвичай клітини набувають нормальної морфології через годину після ізолювання.

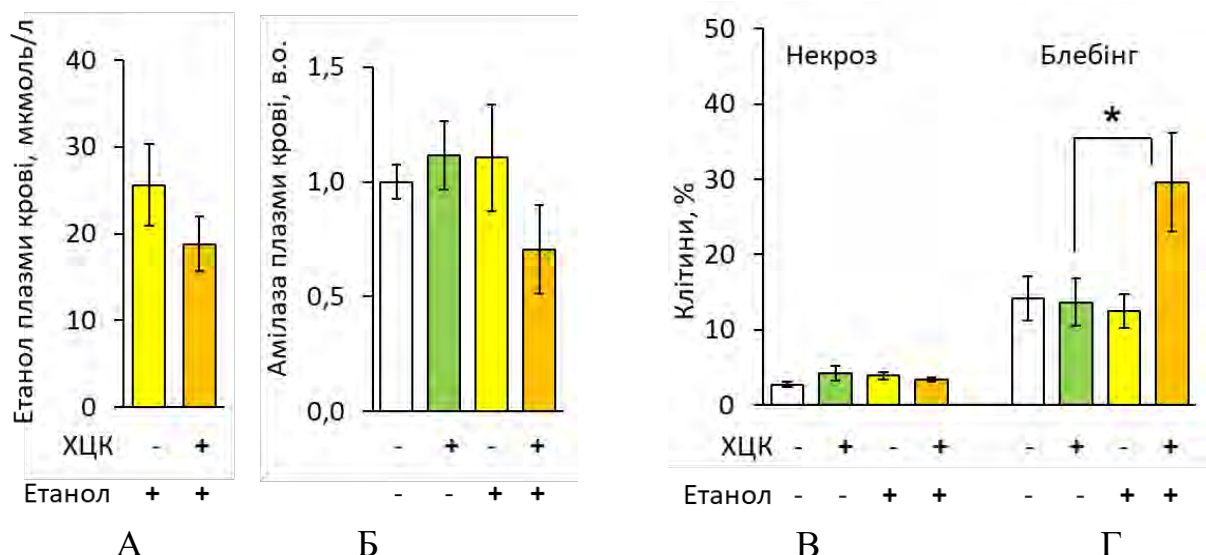


Рис. 3.35. Концентрація етанолу (А) та активність амілази (Б) у плазмі щурів після введення етанолу і/або ХЦК, а також життєздатність (В) і блебінг ацинарних клітин підшлункової залози одразу після виділення: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, $n = 7$

Базальне дихання ізольованих ацинусів було статистично нижчим у тварин після введення етанолу, незалежно від субстрату окиснення, згідно двофакторного дисперсійного аналізу (рис 3.36). Максимальна швидкість роз'єданого дихання залежала як від субстрату (була вищою за наявності глутаміну чи пірувату), так і від введення етанолу / ХЦК. Не виявлено взаємодії між цими групами факторів. Ні етанол, ні ХЦК самі по собі не впливали на роз'єдане дихання, але їх комбінація спричиняла статистично вірогідне зниження роз'єданого дихання на 25–50%, залежно від субстрату окиснення (рис 3.36). Не виявлено ніяких змін стабільності роз'єданого дихання за введення етанолу чи ХЦК.

Ці дослідження ставлять під сумнів ідею, що гострі токсичні впливи етанолу і ХЦК, виявлені на ізольованих ацинарних клітин у багатьох дослідженнях є релевантними до патогенезу гострого панкреатиту у людини. На це вказують дані, що піруват чи глутамін *in vitro* повністю запобігає некрозу ацинарних клітин за дії ХЦК і етанолу. Це може пояснити розбіжності у некротичних ефектах ХЦК між дослідженнями, в яких додавали [247], [252] або не додавали [206] глутамін у середовище. Ці результати також підтримують нещодавнє відкриття захисного впливу пірувату *in vitro* [167]. Важливо, що

гострі ефекти ХЦК й етанолу у щурів *in vivo* відтворювались *in vitro* лише коли у середовищі були і піруват і глутамін, за відсутності некрозу в обох експериментах. Тому можна зробити висновок, що будь-які токсичні впливи ХЦК й етанолу, а цілком можливо і багатьох інших речовин [167] *in vitro* у умовах недостаті субстратного забезпечення не слід розглядати як адекватну модель ушкоджень клітин за панкреатиту.

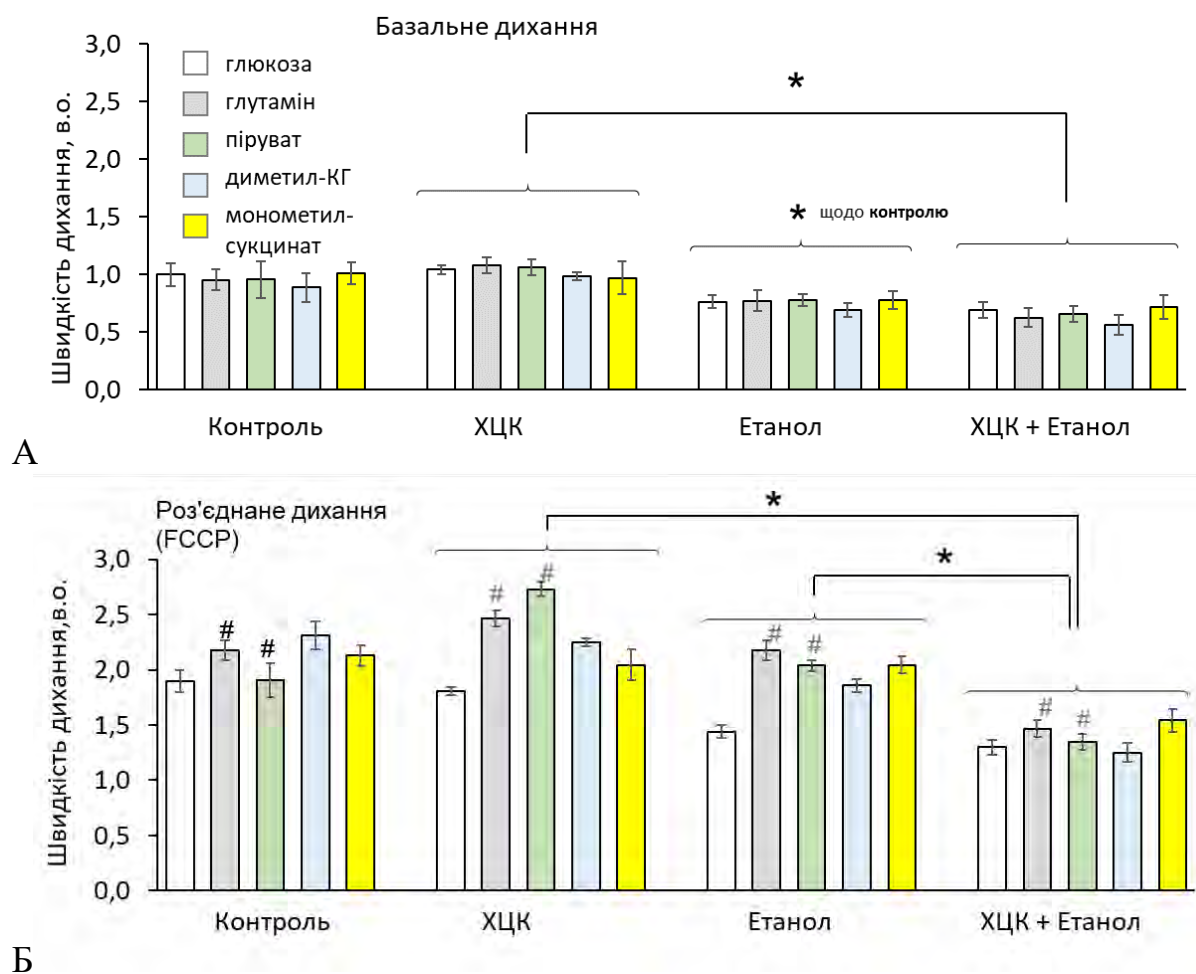


Рис. 3.36. Базальне (А) та роз'єднане (Б) дихання панкреатичних ацинусів виділених із тварин, яким вводили етанол і/або ХЦК: * – статистично вірогідна різниця згідно ANOVA з $P < 0,05$; # – статистично вірогідний вплив пірувату і глутаміну з $P < 0,05$, $n = 7$ (у кожній групі тварин)

Важливим питанням є те, чи можуть будь-які ефекти суміші етанолу з ХЦК на мітохондріальні функції, що виявлені в наших експериментах, бути корисними для розуміння патогенезу людського захворювання. Етанол *in vitro* спричиняє зміни мітохондріальних функцій [158], Ca^{2+} -сигналювання [11], [141], продукції активних форм кисню і секреції панкреатичних ацинусів [250]. Однак

це показано за концентрацій 50–100 ммоль/л, що зрідка спостерігаються у крові пацієнтів і спричиняють високий ризик зупинки дихання і смерті. Пацієнти з алкогольним панкреатитом можуть споживати помірні кількості алкоголю, а його концентрація у плазмі крові становить менше, ніж 50 ммоль/л [253], [254]. Проте люди, що вживають дуже багато алкоголю, не обов'язково хворіють на панкреатит [254], очевидно, через інші фактори, залучені у патогенезі.

У нашому дослідженні ми встановили, що у щурів концентрації етанолу, що відповідають частим клінічним випадкам у людини (20–25 ммоль/л) все ще впливають на мітохондріальне дихання та мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин, і ці ефекти посилюються за стимуляції ХЦК. Деякі дослідження на людських ацинарних клітинах показали відсутність прямої стимуляції секреції ХЦК [255], що пояснюється низькою експресією рецепторів ССК-А. Це, звичайно, робить сумнівною будь-яку користь від моделей холецистокінінового панкреатиту гризунів. Проте нещодавні дані на зрізах підшлункової залози людини довели не лише те, що 0,1 нмоль/л ХЦК стимулюють секрецію амілази, а й що комбінація з 20 ммоль/л етанолу (та сама, яку ми використовували) індукувала молекулярні маркери формування автофагосом [256]. Тому результати наших досліджень дають нам змогу постулювати, що у людей етанол може бути особливо токсичним для мітохондрій підшлункової залози за умови поєднання з стимуляцією її секреції (ХЦК, і, ймовірно, ацетилхоліном). Тому цілком можливо, що повторюване порушення діяльності мітохондрій є одним із механізмів розвитку панкреатиту внаслідок зловживання алкоголем.

Піруват та глютамін мали дуже різний вплив на мітохондріальне окиснення ацинарних клітин підшлункової залози щурів. Піруват є необхідним для відповіді дихання на стимуляцію ацетилхоліном чи ХЦК, як показано тут й у наших попередніх дослідженнях (розділі 3.4). Відомо, що мітохондрії відповідають на таку стимуляцію підвищенням швидкості дихання, деполяризацією, зростанням рівня НАДН і синтезу АТФ [18], [20], [21], [75] для компенсації витрат енергії на секрецію. Ми виявили, що наявність пірувату в

середовищі забезпечує стимуляцію базального і максимального роз'єданого дихання за тривалої дії ХЦК, як і за дії карбахоліну на дихання панкреатичних ацинусів у попередньому дослідженні [75]. Механізмом є, найімовірніше, активація піруватдегідрогенази йонами Ca^{2+} , що вивільняються з внутрішньоклітинних депо. Це підтверджено виявленими впливами Ca^{2+} -сигналів на різні мітохондріальні параметри ізольованих ацинарних клітин [18], [20], [21], а також зростанням $V_{\max}$ дихання пермеабілізованих ацинарних клітин за окиснення пірувату під дією Ca^{2+} [239]. Ми продемонстрували, що етанол *in vitro* пригнічує стимуляцію ХЦК дихання за присутності пірувату. Піруват також не впливав на зміни мітохондріального мембранного потенціалу чи рівня НАД(Ф)Н за дії ХЦК і етанолу, але все одно зупиняв некроз – за незрозумілим для нас механізмом.

Натомість, окиснення глютаміну не змінюється за помірної стимуляції ХЦК, за умов одночасної присутності глюкози. Проте, у декількох атипових випадках присутність глютаміну була, мабуть, необхідною умовою зниження роз'єданого дихання: 1) помірна стимуляція ХЦК за відсутності глюкози у середовищі; 2) гіперстимуляція ХЦК, коли були присутні також глюкоза і піруват; 3) помірна стимуляція ХЦК у поєднанні з етанолом (глютамін і глюкоза у середовищі, з чи без пірувату). Зниження роз'єданого дихання спостерігається на моделі гострого панкреатиту [31] і може вказувати на ушкодження мітохондрій шляхом акивації мітохондріальної пори перехідної провідності [82]. Тим не менше, у наших експериментах CsA не запобігав зниженню роз'єданого дихання за стимуляції ХЦК; олігоміцин-нечутливе дихання не змінювалось; врешті, клітини не зазнавали апоптозу чи некрозу.

Можливою гіпотезою для пояснення зниження швидкості роз'єданого дихання за присутності глютаміну є можлива роль аміаку, утвореного внаслідок гідролізу глютаміну глютаміназою. Висувають гіпотезу, що у астроцитах глютамін відіграє роль як джерело токсичного аміаку за печінкової енцефалопатії [257], [258]. Описаний випадок гострого панкреатиту, пов'язаний із гіперамонемією [259]. Відомо також, що йони амонію впливають на секрецію ізольованих

ацинарних клітин підшлункової залози [260], проте не знижують їх життєздатності. Ми перевірили, чи можуть йони амонію (у формі NH_4Cl) негативно впливати на дихання ізольованих панкреатичних ацинусів в залежності від стимуляції їх ХЦК чи ацетилхоліном.

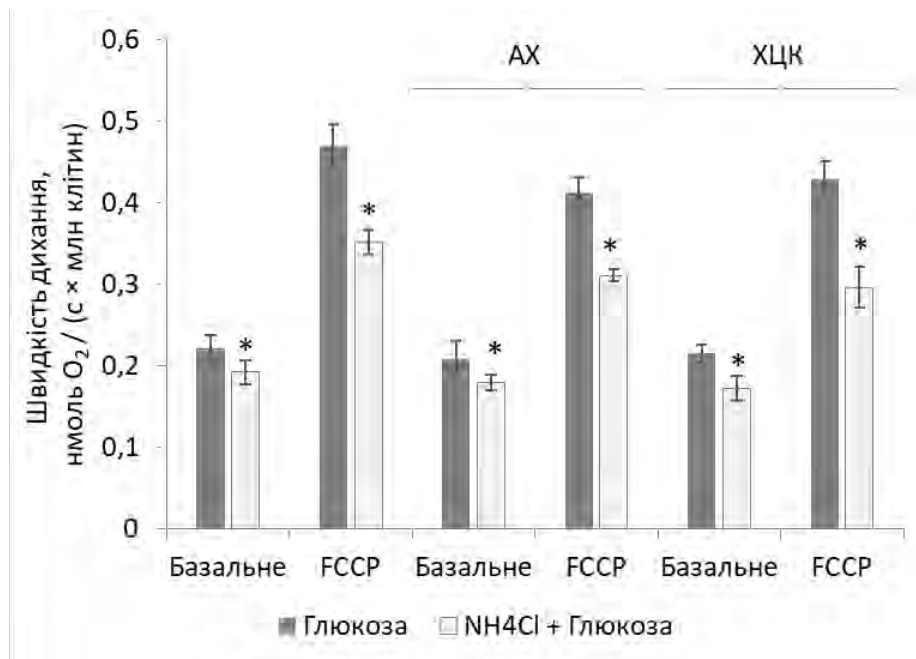


Рис 3.37. NH_4Cl пригнічує дихання панкреатичних ацинусів щурів за стимуляції ацетилхоліном (AX) чи ХЦК: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (глюкоза) згідно ANOVA з $P < 0,05$, $n=5$

Встановлено, що у середовищі з глюкозою, незалежно від стимуляції ацетилхоліном (10 мкмоль/л) чи ХЦК (0,1 нмоль/л), після інкубації ацинусів з 5 ммоль/л NH_4Cl впродовж 30 хв ця сполука статистично вірогідно знижувала як базальне, так і роз'єднане дихання (рис. 3.37). Дисперсійний аналіз не довів впливу ацетилхоліну і ХЦК чи взаємодії між чинникам. Очевидно, за 30 хв дії ефекти стимулююча дія цих речовин за умов досліду припинялась. Це узгоджується з тим, що практично вся стимульована секреція відбувається в перші 30 хв дії агоністів (рис. 3.37).

Ми також оцінили стабільність роз'єданого дихання як співвідношення швидкостей дихання за 1 ммоль/л та 0,5 ммоль/л FCCP – дещо інакше, ніж у попередніх розділах, оскільки у цьому експерименті швидкості дихання за вищих концентрацій протонофора не були показовими (різко знижувались).

Йони амонію статистично вірогідно знижували стабільність роз'єданого дихання (табл. 3.9).

Таблиця 3.9

Стабільність роз'єданого дихання панкреатичих ацинусів за дії NH_4Cl

	Глюкоза	Глюкоза + NH_4Cl
Контроль	$1,15 \pm 0,05$	$0,98 \pm 0,07$ *
Ацетилхолін	$1,19 \pm 0,07$	$0,88 \pm 0,10$ *
ХЦК	$1,19 \pm 0,12$	$0,94 \pm 0,06$ *

* – статистично вірогідна різниця щодо глюкози з $P < 0,05$, $n=5$

Отже, йони амонію здатні знижувати роз'єдане дихання ацинарних клітин підшлункової залози. І хоча їх ефект проявляється і без стимуляції клітин ХЦК, на відміну від глютаміну, можна припустити, що за стимуляції ХЦК якраз і відбувається посилений катаболізм глютаміну з вивільненням амонію та подальшим зниженням роз'єданого дихання. Однак це не пояснює ефектів глютаміну на рівень НАДН та мітохондріального мембранного потенціалу.

Можливо, виявлене зниження роз'єданого дихання за окиснення глютаміну пов'язане з якимись змінами метаболізму, що обмежують максимальну здатність дихального ланцюга. Відомо, що у клітинах з ушкодженими мітохондріями, за умов гіпоксії [261] або фармакологічної блокади комплексів дихального ланцюга [262] відбувається відновлювальне карбоксилювання глютаміну. Така гіпотеза підтверджується зниженням автофлуоресценції НАД(Ф)Н і відсутністю деполяризації мітохондрій за дії ХЦК й етанолу коли глютамін був присутнім у середовищі у наших експериментах. Залишається незрозумілим, як ці процеси могли забезпечувати високу життєздатність ацинарних клітин. Тому необхідно продовжити дослідження регуляції метаболізму глютаміну у ацинарних клітинах.

Іншим цікавим спостереженням цього дослідження є те, що піруват та глютамін також впливають на морфологію ацинарних клітин підшлункової залози за дії ХЦК й етанолу. Відомо, що блебінг цих клітин за стимуляції ХЦК опосередкований активацією Rho і Rac та перерозподілом актинового

цитоскелету [263]. Цей механізм ймовірно подібний і за ротенон-індукованого блебінгу у нейронах гіпокампа [264]. У нашому дослідженні етанол підсилював блебінг спричинений тривалою помірною стимуляцією клітин ХЦК. Це може бути пов'язано із здатністю коротколанцюгових спиртів індукувати rho-асоційовану протеїнкіназу і блебінг у інших типах клітин [265], [266]. Етанол у комбінації з помірною стимуляцією ХЦК спричиняє базолатеральну секрецію, подібно до гіперстимуляції ХЦК [267], проте блебінг не був описаний у цьому дослідженні. Припускаємо це тому, що піруват не був присутнім у середовищі. Нез'ясованою залишається причина, чому і піруват і глутамін є обов'язковими для розвитку блебінгу ацинарних клітин. Показовим є те, що за одночасної присутності обох субстратів домінували ефекти глутаміну на мембранний потенціал, дихання мітохондрій та рівень НАД(Ф)Н. Зв'язок глутаміну із блебінгом також виявлений у інших наших експериментах, описаних у розділі 3.7. Ми припускаємо, що присутність пірувату збільшила швидкість окиснення метаболіту глутаміну глутамату завдяки активності глутаматдегідрогенази. Це корелює із встановленим раніше синергійним впливом пірувату і глутаміну на роз'єднане дихання.

Нормальна концентрація пірувату в крові є на 2 порядки нижчою, ніж у наших експериментах *in vitro*. Можливо, у експерименті блеби не утворювались *in vivo*, а лише під час і після процедури виділення ацинусів після контакту з базовим середовищем, що містило глутамін і піруват. Для перевірки цього припущення потрібний додатковий аналіз динаміки утворення блебів та наслідків для клітин. Тому отримані результати не можуть дати відповідь на запитання, чи такі морфологічні зміни можуть відбуватись *in vivo* і чи вони стосуються розвитку захворювань підшлункової залози у людини. Іншим обмеженням цього дослідження є те, що впливи ХЦК та етанолу *in vitro* та *in vivo* не еквівалентні, а їхнє пряме порівняння не завжди доцільне. Це хоча б тому, що ХЦК та етанол були присутні у середовищі в момент вимірювання їх ефектів *in vitro*, але не у експерименті *in vivo*. Це, мабуть, є однією з причин чому етанол *in vitro* спричиняв інтенсифікацію базального дихання, а *in vivo* – його пригнічення.

Загалом, вплив введення ХЦК і етанолу на базальне та роз'єднане дихання був більш переконливим, ніж зниження лише базального дихання за дії лише етанолу, особливо зважаючи на відсутність порушень морфології клітин. Тому ми провели ще одну серію досліджень, повторивши введення тієї самої дози (4 г/кг) етанолу щурам. Через 3 год після введення щурів декапітували, виділяли панкреатичні ацинуси і досліджували їх дихання (рис. 3.38).

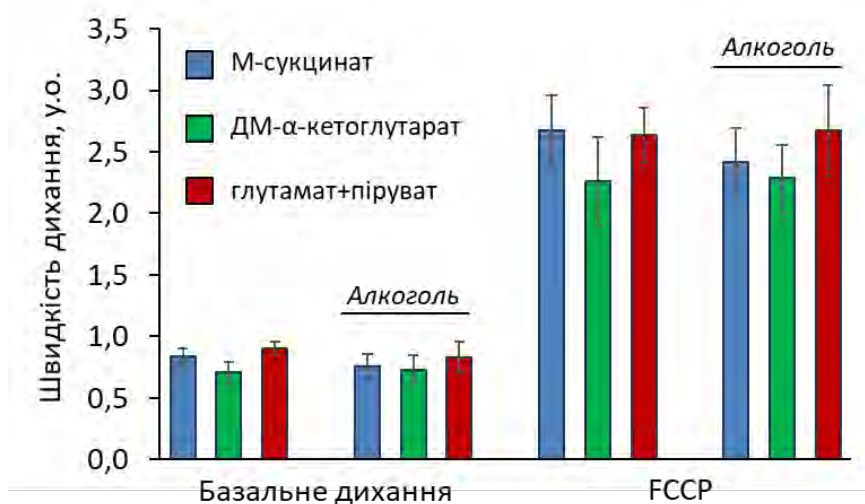


Рис. 3.38. Дихання панкреатичних ацинусів виділених через 3 год після введення етанолу щурам: у всіх експериментах у середовищі була глюкоза у комбінації з іншими субстратами, вказаними на рисунку, $n = 8$ (у кожній групі тварин)

В цьому експерименті не було виявлено впливу введення етанолу на базальне чи максимальне роз'єднане дихання ацинусів, або на його стабільність (не представлено). Не було також виявлено змін морфології клітин. Отже, ефект зниження базального дихання панкреатичних ацинусів після введення етанолу, якщо і є, то дуже короткочасний. Наступні дослідження (розділ 3.12) хронічного введення етанолу підтвердили відсутність його впливу на дихання ацинарних клітин.

Підсумки

Брак достатнього забезпечення субстратами окиснення *in vitro* робить ацинарні клітини вразливими до некротичних процесів за дії помірної концентрації етанолу у комбінації з ХЦК; цього не спостерігалось за присутності

пірувату і/або глутаміну. За короткочасного впливу ХЦК і етанолу *in vivo* відбувається зниження швидкості дихання ацинарних клітин та індукція блебінгу, але не некроз.

Основні публікації:

1. Manko B.O., Bilonoha O.O., Voloshyn D.M., Zub A.M., Ivasechko I.I., Manko V.V. Pyruvate and glutamine define the effects of cholecystokinin and ethanol on mitochondrial oxidation, necrosis, and morphology of rat pancreatic acini // *Pancreas*. – 2021. – Vol. 50 (3). – P.972–981.
2. Zub A., Manko O.V., **Manko B.O.** The effects of ammonia and glutamine on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. – 2021. – Вип. 84. – С. 105–112.
3. Bilonoha O., Manko B.O., Mazur H., Manko V. Effects of acute alcohol intoxication on the respiration and dehydrogenase activity of rat pancreatic acini // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. – 2024. – Вип. 92. – С. 132–137.

3.4. Амінокислоти як безпечне джерело енергії для ацинарних клітин підшлункової залози

Ацинарні клітини підшлункової залози забезпечують активний транспорт амінокислот [32] для постійного синтезу та секреції травних ферментів [268]. Окрім синтезу білка, амінокислоти відіграють важливу роль у метаболізмі і виживанні цих клітин. Деякі амінокислоти, як глутамін, аланін і лейцин можуть бути первинними джерелами енергії та метаболітів для панкреатичних клітин. У розділі 3.3 ми виявили, що глутамін суттєво підвищує роз'єднане дихання ізольованих панкреатичних ацинусів. Крім того відомо, що підшлункова залоза мишей може використовувати аланін і лейцин як енергетичні субстрати [35].

Патогенез гострого панкреатиту пов'язаний з порушеннями метаболізму амінокислот. З одного боку, за гострого панкреатиту спостерігають суттєві зміни концентрації амінокислот у плазмі крові пацієнтів [41]. З іншого боку, порушення

транспорту чи метаболізму амінокислот призводять до високої захворюваності на гострий панкреатит. Зокрема відомо, що терапія раку аспарагіназою може спричиняти випадки панкреатиту [40], ймовірно через важливе значення аспарагіну для ацинарних клітин підшлункової залози [269]. Окрім того, гострий панкреатит асоційований із декількома рідкісними генетичними порушеннями транспорту чи метаболізму амінокислот: цитрулінемія другого типу (дефект цитрину – транспортера аспартату/глутамату) [37], лізинуричною непереносимістю білка (дефект SLC7A7 – компоненту транспортера катіонних амінокислот) [36], [38] і дефект пропіоніл-КоА-карбоксилази, яка бере участь у метаболізмі метіоніну, валіну, лейцину, ізолейцину, і треоніну [39].

Харчові добавки відіграють ключову роль у лікуванні пацієнтів з гострим панкреатитом і знижують кількість інфекційних ускладнень та смертність [270], [271]. Зараз активно вивчають ефективність високоенергетичних раціонів у терапії пацієнтів з гострим панкреатитом [272], [273]. Застосування амінокислотних добавок може покращувати результати лікування пацієнтів. Є докази, що раннє внутрішньовенне введення дипептиду аланілглутаміну покращує стан пацієнтів з гострим панкреатитом [47]. Крім того, лікування низькими дозами лізину пригнічувало запалення у мишей з експериментальним гострим панкреатитом [44]. Проте користь від амінокислот може бути повністю нівельована можливим шкідливим впливом, оскільки деякі амінокислоти є токсичними для підшлункової залози у високих дозах. Наприклад, аргінін, орнітин та гістидин (20 ммоль/л) спричиняють смерть ізольованих ацинарних клітинах мишей вже за 6–10 годин [54]. Більше того, внутрішньоочеревинне введення аргініну, лізину, орнітину або гістидину спричиняє некротизуючий панкреатит у гризунів [52], [54], [58]. Передозування L-аргініном може бути причиною двох описаних випадків гострого панкреатиту у людей [55], [56]. Механізми цих токсичних впливів амінокислот на підшлункову залозу не до кінця з'ясовані, однак вважають, що центральною ланкою є ушкодження мітохондрій [57], [58], [59].

Отож, метою наступних експериментів було виявити найбільш придатних амінокислот для енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози. Для цього ми досліджували роз'єднане дихання цих клітин та їх життєздатність за дії амінокислот: аланіну, глутаміну, глутамату, аспарагіну, аспартату, лізину, гістидину, аргініну.

* * *

Для дослідження здатності панкреатичних ацинусів щурів окиснювати амінокислоти їх інкубували за стандартною схемою впродовж 15 хв у середовищі з додаванням різних концентрацій амінокислот (0,1 – 20 ммоль/л). У частині експериментів була наявна також глюкоза. Після цього реєстрували базальне та роз'єднане дихання.

Таблиця 3.10

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності глутаміну					
[Глутамін], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	0,93 ± 0,07	1,35 ± 0,09	1,62 ± 0,14	1,64 ± 0,11	1,37 ± 0,14
0,1	0,99 ± 0,06	1,30 ± 0,09	1,59 ± 0,11	1,67 ± 0,13	1,65 ± 0,18
1	0,96 ± 0,07	1,28 ± 0,10	1,61 ± 0,13	1,94 ± 0,12	1,98 ± 0,11 *
5	1,03 ± 0,10	1,33 ± 0,11	1,60 ± 0,12	1,83 ± 0,18	2,02 ± 0,20 *
20	0,87 ± 0,06	1,13 ± 0,08	1,38 ± 0,04	1,55 ± 0,05	1,70 ± 0,08
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	1,18 ± 0,07	1,61 ± 0,09	1,97 ± 0,12	1,94 ± 0,11	1,66 ± 0,14
0,1	0,91 ± 0,07	1,34 ± 0,07	1,74 ± 0,06	1,79 ± 0,15	1,69 ± 0,19
1	1,06 ± 0,09	1,52 ± 0,11	1,79 ± 0,14	2,06 ± 0,16	2,34 ± 0,20 *
5	1,04 ± 0,08	1,42 ± 0,10	1,71 ± 0,13	1,97 ± 0,14	2,20 ± 0,15 *
20	1,03 ± 0,09	1,56 ± 0,12	1,78 ± 0,12	2,08 ± 0,19	2,17 ± 0,21 *

* – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без глутаміну); n = 8

Як і у попередніх експериментах з субстратами окиснення, амінокислоти не впливали на базальне дихання (табл. 3.10–3.17). Також не було виявлено впливу низької концентрації амінокислот (0,1 ммоль/л) на роз'єднане дихання. Іншою загальною рисою цих результатів було те, що у випадках, коли

амінокислоти стимулювали роз'яне дихання, воно зросло із зростанням концентрації амінокислоти, часто аж до 20 ммоль/л.

За окиснення глутаміну (табл. 3.10) загалом підтверджено дані попередніх досліджень. Глутамін у концентраціях 1–20 ммоль/л статистично вірогідно підвищував дихання за високої концентрації FCCP (2 мкмоль/л). І цей ефект зберігався незалежно від наявності глюкози. Ці результати очікувані: глутамін є важливим джерелом енергії і може окиснюватись глутаміназою до глутамату, після чого можлива його перетворення до α -кетоглутарату глутаматдегідрогеназою або амінотрансферазами. Не виявлено впливу глутаміну за низької концентрації (0,1 ммоль/л) або за низьких доз протонофора. Отже, глюкоза і ендogenous субстрати забезпечували переважну частину окисної здатності мітохондрій ацинарних клітин за цих умов.

Глутамат (метаболіт глутаміну) спричиняв набагато сильніше зростання роз'яданого дихання – більш ніж втричі за високих концентрацій (табл. 3.11). Оскільки глутамат досліджували в останню чергу, а інші амінокислоти не проявляли своєї дії за 0,1 мкмоль/л, цю концентрацію глутамату не досліджували. Іншою відмінністю від глутаміну було те, що глутамат проявляв свій вплив вже за низьких концентрацій протонофора (0,5–1 мкмоль/л).

Таблиця 3.11

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності глутамату					
[глутамат], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	0,91 ± 0,06	1,24 ± 0,10	1,12 ± 0,05	0,79 ± 0,05	0,55 ± 0,02
1	1,07 ± 0,07	1,50 ± 0,10 *	1,38 ± 0,07	1,06 ± 0,13 *	0,76 ± 0,08
5	1,03 ± 0,05	1,50 ± 0,12 *	1,78 ± 0,15 *	1,51 ± 0,15 *	1,19 ± 0,12 *
20	0,89 ± 0,08	1,75 ± 0,14 *	2,33 ± 0,19 *	2,12 ± 0,14 *	1,62 ± 0,14 *
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	1,00 ± 0,04	1,31 ± 0,07	1,31 ± 0,12	1,09 ± 0,14	0,74 ± 0,09
1	1,01 ± 0,11	1,55 ± 0,20	1,71 ± 0,28 *	1,49 ± 0,19 *	1,21 ± 0,17 *
5	0,96 ± 0,05	1,57 ± 0,11	1,76 ± 0,15 *	1,59 ± 0,17 *	1,39 ± 0,13 *
20	0,96 ± 0,07	1,72 ± 0,17	2,18 ± 0,29 *	2,14 ± 0,22 *	1,72 ± 0,19 *

* – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без глутамату), n = 5–6

Наявність глюкози у середовищі також мало впливала на встановлені залежності. Це, мабуть, вказує на активацію конвергентних метаболічних шляхів постачання субстратів окиснення у цикл Кребса: за окиснення глюкози утворюється піруват, а глутамату чи глутаміну – α -кетоглутарат. Крім того, наявність додаткового пірувату дає змогу прискорити реакцію трансамінування глутамату за участі аланінаміотрансферази.

Таблиця 3.12

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності аланіну					
[аланін], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	0,97 ± 0,05	1,67 ± 0,13	2,02 ± 0,21	1,21 ± 0,19	0,76 ± 0,12
0,1	1,02 ± 0,05	1,95 ± 0,10 #	2,17 ± 0,16	1,41 ± 0,13	0,99 ± 0,02
1	0,99 ± 0,03	1,62 ± 0,13	2,23 ± 0,12	1,45 ± 0,20	1,13 ± 0,19
5	0,94 ± 0,06	1,67 ± 0,16	2,27 ± 0,12	1,71 ± 0,10 *	1,48 ± 0,10 *
20	0,84 ± 0,04	1,61 ± 0,12	1,95 ± 0,07	1,36 ± 0,09	1,34 ± 0,10 *
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	1,07 ± 0,03	1,82 ± 0,14	2,33 ± 0,13	1,61 ± 0,18	0,98 ± 0,10
0,1	1,04 ± 0,08	1,95 ± 0,18	2,22 ± 0,20	1,57 ± 0,26	1,15 ± 0,18
1	0,94 ± 0,05	1,93 ± 0,09	2,15 ± 0,08	1,72 ± 0,16	1,31 ± 0,13
5	1,03 ± 0,06	1,60 ± 0,12	1,97 ± 0,19	1,53 ± 0,20	1,35 ± 0,13
20	1,16 ± 0,06	1,76 ± 0,12	2,24 ± 0,12	1,80 ± 0,16	1,71 ± 0,18 *

* – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без аланіну)

– підозра щодо хибнопозитивного результату, n = 6

Аланін у клітинах перетворюється до пірувату через трансамінування, тому не дивно, що його вплив на роз'єднане дихання був загалом подібним до цього субстрату (табл. 3.12). Так, за відсутності у середовищі глюкози аланін стимулював роз'єднане дихання (за 1,5–2 мкмоль/л FCCP) лише у високих концентраціях (5–20 ммоль/л). Однак у цьому випадку глюкоза суттєво впливала на таку залежність: за її наявності аланін лише у концентрації 20 ммоль/л стимулював роз'єднане дихання, і то лише за 2 мкмоль/л FCCP. Цього і слід було очікувати, оскільки основним метаболітом обох субстратів є піруват. Тому, мабуть, аланін як додаткове (крім гліколізу) джерело пірувату вже не впливав так сильно, як за відсутності глюкози.

Лізин, як і аланін, окиснюється до ацетил-КоА, але значно довшим шляхом через α -аміноадипінову кислоту, причому в основному у печінці. Тим не менше, отримані закономірності за окиснення лізину були подібними до аланіну. Так, за відсутності інших джерел енергії у середовищі високі концентрації лізину (5–20 ммоль/л) підвищували роз'єднане дихання ацинарних клітин підшлункової залози за 1,5 чи 2 мкмоль/л FCCP (табл. 3.13). Також, за наявності глюкози лізин статистично вірогідно підвищував роз'єднане дихання лише в одному випадку – у концентрації 5 ммоль/л за максимальної дози протонофора.

Таблиця 3.13

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності лізину					
[лізин], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	0,94 ± 0,05	1,88 ± 0,16	2,20 ± 0,19	1,09 ± 0,10	0,78 ± 0,08
0,1	0,98 ± 0,07	1,90 ± 0,10	2,03 ± 0,11	1,28 ± 0,18	0,84 ± 0,09
1	0,91 ± 0,03	1,79 ± 0,10	2,00 ± 0,14	1,14 ± 0,18	0,80 ± 0,09
5	0,95 ± 0,04	1,73 ± 0,11	2,17 ± 0,12	1,66 ± 0,18 *	0,90 ± 0,09
20	0,94 ± 0,04	2,15 ± 0,14	2,46 ± 0,17	1,56 ± 0,24 *	1,18 ± 0,14 *
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	1,03 ± 0,04	2,06 ± 0,11	2,38 ± 0,18	1,49 ± 0,20	0,91 ± 0,10
0,1	1,11 ± 0,06	2,16 ± 0,16	2,38 ± 0,13	1,48 ± 0,07	1,04 ± 0,05
1	1,07 ± 0,05	1,94 ± 0,16	2,05 ± 0,16	1,32 ± 0,16	0,99 ± 0,09
5	1,01 ± 0,05	1,90 ± 0,14	2,29 ± 0,16	1,76 ± 0,17	1,31 ± 0,15 *
20	1,05 ± 0,04	2,09 ± 0,09	2,39 ± 0,11	1,63 ± 0,15	1,28 ± 0,10

* – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без лізину); n = 9

Тому, загалом, мітохондрії ацинарних клітини підшлункової залози активно (достатньо для виявлення у експерименті) окиснюють лізин, як і аланін. Однак це відбувається лише за умов, коли відсутні альтернативні джерела енергії, мітохондріальний мембранний потенціал суттєво знижений, а концентрації цих амінокислот є на порядок вищими фізіологічних. Проте не можна відкидати можливості низької швидкості мітохондріального окиснення цих амінокислот за інших умов, що є нижчою, ніж поріг виявлення методу.

Оскільки в межах цих серій досліджень отримано досить великий масив даних, для покращення статистичного аналізу і зниження ймовірності отримання

хибнопозитивних результатів було використано ANOVA з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією рівня α за Голма-Бонферроні. Ми також спеціально обмежили кількість порівнянь лише до тих, які були найбільш інформативними: в межах кожного набору даних за однієї концентрації FCCP порівнювали вплив амінокислот до контролю без амінокислот. Тим не менше, розраховувати на повну відсутність таких випадків помилково. Тому у подальшому аналізі ми не надавали наукового пояснення тим статистично вірогідним змінам, які виникали спорадично і всупереч загальним тенденціям концентраційних залежностей У таблицях 3.12–3.17 такі випадки позначені символом #. Таких підозр щодо хибнопозитивних результатів було 1,25%, або 4 серед усіх 320 порівнянь (три зростання та одне зниження швидкості дихання). Це значно нижчий рівень помилки першого типу, ніж очікуваних 16 випадків, якби ми використовували статистичні тести з рівнем $\alpha=5\%$ без належної корекції для багаторазових порівнянь.

Таблиця 3.14

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності аспартату

[аспартат], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	1,00 ± 0,09	1,31 ± 0,09	1,44 ± 0,12	1,36 ± 0,16	1,06 ± 0,19
0,1	0,97 ± 0,06	1,32 ± 0,08	1,58 ± 0,10	1,46 ± 0,14	1,15 ± 0,17
1	1,07 ± 0,05	1,32 ± 0,05	1,69 ± 0,09	1,62 ± 0,11	1,23 ± 0,11
5	1,01 ± 0,09	1,39 ± 0,05	1,77 ± 0,08	1,85 ± 0,11 *	1,52 ± 0,13 *
20	0,93 ± 0,03	1,27 ± 0,09	1,55 ± 0,14	1,70 ± 0,18	1,35 ± 0,13
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	1,11 ± 0,06	1,52 ± 0,10	1,75 ± 0,11	1,83 ± 0,11	1,53 ± 0,11
0,1	0,93 ± 0,09	1,34 ± 0,11	1,56 ± 0,12	1,46 ± 0,10	1,10 ± 0,07 #
1	1,08 ± 0,04	1,47 ± 0,09	1,78 ± 0,12	1,66 ± 0,15	1,29 ± 0,16
5	1,05 ± 0,04	1,45 ± 0,08	1,85 ± 0,10	1,84 ± 0,12	1,55 ± 0,14
20	0,85 ± 0,07	1,16 ± 0,12	1,61 ± 0,15	1,90 ± 0,19	1,69 ± 0,19

* – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без аспартату)

– підозра щодо хибнопозитивного результату; n = 8

Окремим аргументом на користь цього припущення є те, що напрямки ефектів за помилки першого типу мають бути рівноймовірними (50 % зростання

і 50 % зниження дихання). В усіх дослідженнях ми отримали лише 1 випадок **зниження** швидкості дихання за найнижчої концентрації аспартату (0,1 ммоль/л), який не вкладається у загальну тенденцію впливу амінокислот: не відтворився ні за вищих концентрацій цієї амінокислоти чи інших доз протонофора, ні у паралельному експерименті за додаткової присутності глюкози, ні за дії подібної амінокислоти аспарагіну чи взагалі будь-якої іншої.

Останньою із амінокислот, окиснення яких у мітохондріях ацинарних клітин вдалось підтвердити з достатньою надійністю, був аспартат (табл. 3.14), проте його ефекти були найнижчими і проявлялись лише за відсутності глюкози у середовищі. А саме, аспартат у концентрації 5 ммоль/л статистично вірогідно підвищував роз'єднане дихання за 1,5–2 мкмоль/л протонофора. Ця амінокислота може вступати в цикл Кребса шляхом трансамінування аспартамінотрансферазою з утворенням малату. Раніше у розділі 3.3 ми показали, що малат впливає на роз'єднане дихання ацинарних клітин, проте цей вплив був дуже короткочасним.

Таблиця 3.15

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності аспарагіну

[аспарагін], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	1,00 ± 0,06	1,24 ± 0,06	1,38 ± 0,09	1,45 ± 0,08	1,29 ± 0,11
0,1	1,06 ± 0,03	1,30 ± 0,04	1,49 ± 0,07	1,59 ± 0,07	1,46 ± 0,07
1	1,03 ± 0,08	1,28 ± 0,06	1,63 ± 0,11	1,75 ± 0,12	1,64 ± 0,12
5	0,92 ± 0,06	1,37 ± 0,11	1,71 ± 0,15	1,81 ± 0,17	1,59 ± 0,20
20	0,87 ± 0,05	1,45 ± 0,11	1,75 ± 0,15	1,72 ± 0,15	1,27 ± 0,21
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	1,14 ± 0,03	1,47 ± 0,06	1,68 ± 0,07	1,82 ± 0,10	1,72 ± 0,16
0,1	1,01 ± 0,06	1,31 ± 0,06	1,54 ± 0,06	1,67 ± 0,13	1,50 ± 0,17
1	1,10 ± 0,07	1,39 ± 0,12	1,56 ± 0,13	1,74 ± 0,13	1,61 ± 0,12
5	0,96 ± 0,07	1,26 ± 0,08	1,57 ± 0,10	1,92 ± 0,19	1,86 ± 0,16
20	0,90 ± 0,04	1,18 ± 0,06	1,50 ± 0,10	1,68 ± 0,10	1,55 ± 0,15
n = 8					

Не виявлено жодних ознак залучення аспарагіну до процесів окиснення в ацинарних клітинах (табл. 3.15). Це й не дивно, адже у цих клітинах аспарагіназа не експресується [274]. Так само й гістидин (табл. 3.16) і аргінін (табл. 3.17) не стимулюють роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози щурів. Хоча підшлункова залоза може експресувати (принаймні, у людини) перший ензим катаболізму гістидину – гістидинамонійліази [275], підтверджень експресії інших ензимів нема. Дані з бази Human Protein Atlas вказують на відсутність експресії уроканазы чи гістидин декарбоксилази у підшлунковій залозі людини [276], [277].

У підшлунковій залозі не відбувається метаболізм аргініну шляхами з ключовими ензимами аргінін декарбоксилазою, аргіназою та NO-синтазою. Однак виявлена ензиматична активність аргінін-гліцин-амінотрансферази і гуанідиноацетат-N-метилтрансферази [278], [279] в підшлунковій залозі щурів дає можливість постулювати активність шляху синтезу креатину з аргініну в цьому органі.

Таблиця 3.16

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності гістидину

[Гістидин], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	0,92 ± 0,07	1,14 ± 0,10	1,36 ± 0,11	1,44 ± 0,13	1,36 ± 0,12
0,1	0,97 ± 0,03	1,18 ± 0,05	1,54 ± 0,12	1,65 ± 0,14	1,46 ± 0,15
1	1,07 ± 0,07	1,45 ± 0,09	1,67 ± 0,13	1,89 ± 0,08	1,68 ± 0,18
5	0,99 ± 0,03	1,28 ± 0,06	1,56 ± 0,11	1,74 ± 0,15	1,68 ± 0,18
20	1,01 ± 0,06	1,27 ± 0,09	1,67 ± 0,11	1,67 ± 0,12	1,42 ± 0,12
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	1,06 ± 0,08	1,36 ± 0,10	1,63 ± 0,11	1,72 ± 0,10	1,55 ± 0,12
0,1	1,04 ± 0,08	1,36 ± 0,11	1,63 ± 0,14	1,81 ± 0,20	1,95 ± 0,24
1	0,87 ± 0,04	1,11 ± 0,05	1,34 ± 0,07	1,50 ± 0,10	1,38 ± 0,12
5	1,09 ± 0,12	1,36 ± 0,10	1,75 ± 0,16	1,95 ± 0,20	2,12 ± 0,24 #
20	0,97 ± 0,07	1,37 ± 0,08	1,70 ± 0,14	1,79 ± 0,13	1,58 ± 0,16

– підозра щодо хибнопозитивного результату; n = 7

Отже, у цих серіях експериментів ми дослідили здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози окиснювати деякі амінокислоти в умовах екстремальної потреби у відновлюваних еквівалентах. Виявлено докази здатності окиснювати глутамат, глутамін, аланін, лізин та аспартат. Слід зазначити, що такі умови експерименту можуть частково відтворювати патологічний стан ацинарних клітин за гострого панкреатиту, що характеризується зниженням мітохондріального мембранного потенціалу та синтезу АТФ. За відсутності впливу амінокислоти на роз'єднане дихання можна вважати, що мітохондрії не здатні її окиснювати. Зворотнє теж справедливе: стимуляція роз'єданого дихання амінокислотами доводить принципову здатність клітин їх окиснювати із залученням мітохондрій. Проте, це не обов'язково означає, що ацинарні клітини підшлункової залози надають перевагу окисненню цих амінокислот за фізіологічних умов. Вони, швидше за все, не будуть значною мірою утилізувати аланін, лізин та аспартат, що доводять наші експерименти у середовищі з глюкозою.

Таблиця 3.17

Дихання панкреатичних ацинусів за наявності аргініну

[аргінін], ммоль/л	[FCCP], мкмоль/л				
	0	0,5	1	1,5	2
<i>без глюкози</i>					
0	0,95 ± 0,04	1,76 ± 0,10	2,04 ± 0,14	1,23 ± 0,13	0,80 ± 0,04
0,1	0,92 ± 0,06	1,71 ± 0,11	1,91 ± 0,20	1,28 ± 0,18	0,75 ± 0,11
1	0,99 ± 0,05	1,82 ± 0,06	2,21 ± 0,13	1,52 ± 0,18	0,95 ± 0,06
5	1,00 ± 0,06	2,08 ± 0,09	2,50 ± 0,17 #	1,46 ± 0,15	0,82 ± 0,07
20	1,03 ± 0,03	2,11 ± 0,10	2,10 ± 0,13	1,14 ± 0,08	0,76 ± 0,07
<i>+ глюкоза (10 ммоль/л)</i>					
0	0,91 ± 0,08	1,81 ± 0,11	2,22 ± 0,07	1,65 ± 0,10	1,13 ± 0,07
0,1	1,01 ± 0,03	1,88 ± 0,07	2,33 ± 0,11	1,41 ± 0,06	1,04 ± 0,07
1	1,07 ± 0,08	1,91 ± 0,11	2,26 ± 0,10	1,60 ± 0,18	0,99 ± 0,21
5	1,10 ± 0,05	1,95 ± 0,11	2,41 ± 0,17	1,79 ± 0,19	1,29 ± 0,12
20	1,01 ± 0,03	1,86 ± 0,14	2,11 ± 0,15	1,32 ± 0,13	0,93 ± 0,10

– підозра щодо хибнопозитивного результату ; n = 7

Іншим важливим критерієм вибору амінокислот для підтримання мітохондріального окиснення у підшлунковій залозі є їх безпечність для цих клітин. Відразу після ізоляції життєздатність ацинарних панкреатитів щурів була у межах 93–97%, а клітини також не мали порушень морфології, зокрема, таких як блебінг. У пілотному експерименті ми дослідили вплив амінокислот у концентрації 20 ммоль/л (2 год), інкубуючи клітини у базовому позаклітинному середовищі, що містило глюкозу як основне джерело енергії. Для дослідження життєздатності клітин їх фарбували барвниками і досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопа (рис. 3.39).

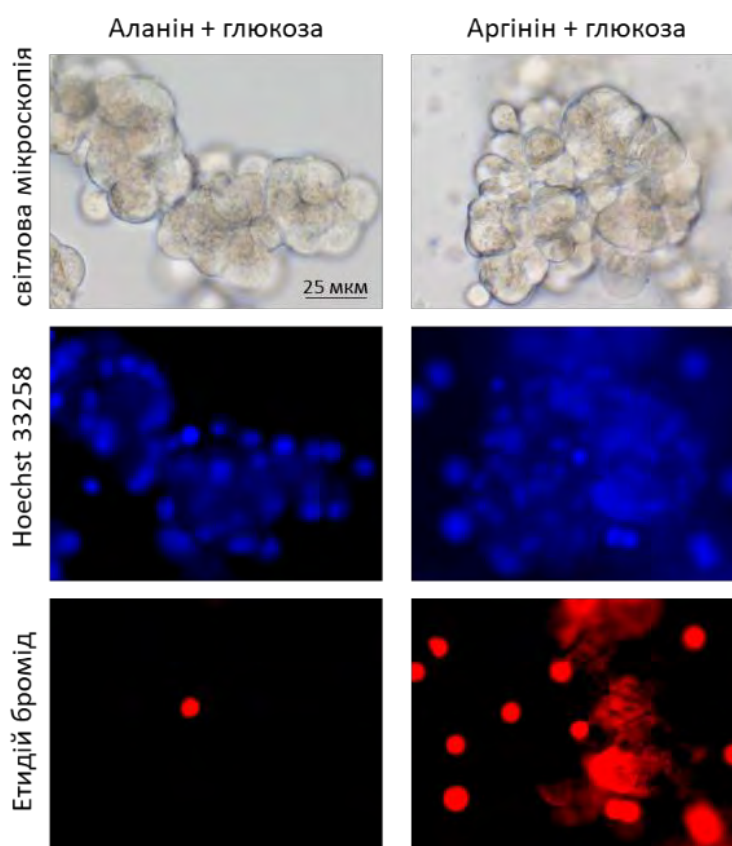


Рис. 3.39. Мікрофотографії ізольованих ацинусів за присутності амінокислот аланіну чи аргініну (20 ммоль/л). Барвник Hoechst 33258 (синій, середній ряд) зафарбовував ядра усіх клітин, а етидій бромід – лише некротичних клітин (червоний, нижній ряд)

У контролі близько 18% клітин були зафарбовані етидій бромідом, що вказує на втрату цілісності плазматичної мембрани (рис. 3.40). У цьому експерименті лізин та аргінін спричиняли статистично вірогідне зниження життєздатності клітин, тоді як присутність глутаміну чи аланіну вірогідно

знижувала кількість мертвих клітин порівняно з контролем (рис. 3. 40). Аспарагін, аспартат та гістидин ніяк не змінювали життєздатності клітин. Ці дані вже підтверджують гіпотезу, що покращення енергетичного забезпечення за додавання амінокислот, які легко окиснюються ацинарними клітинами (глутамін, аланін) може підвищувати їх життєздатність, а також частково співпадають із даними про токсичність амінокислот (зокрема, аргініну та лізину).

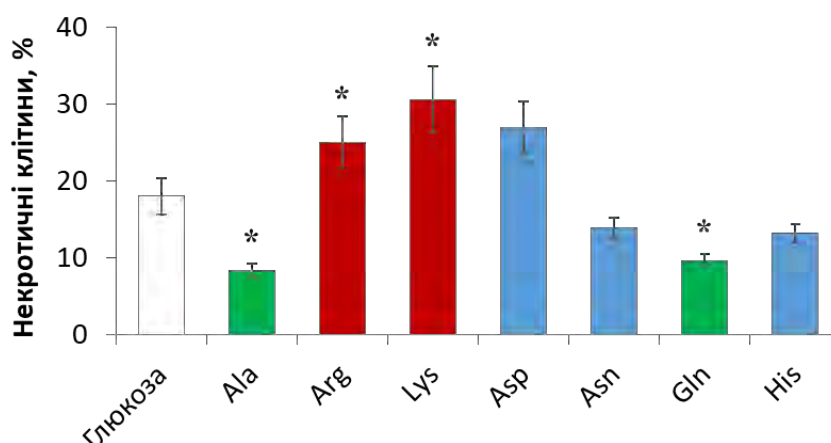


Рис. 3. 40. Аргінін і лізин знижують життєздатність панкреатичних ацинсів у базовому позаклітинному середовищі: * – статистично вірогідна різниця за впливу етанолу згідно із однофакторним дисперсійним аналізом, $P < 0,05$, $n = 6$

Не було виявлено зміни частоти виникнення блебінгу після інкубації з амінокислотами (рис. 3.41).

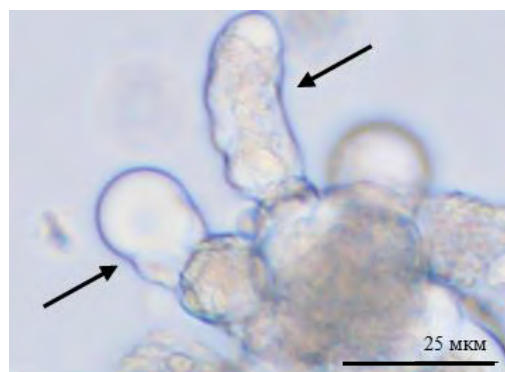
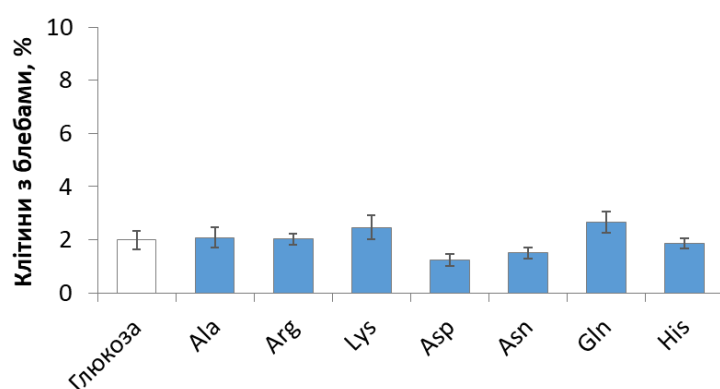


Рис. 3.41. Блебінг ацинарних клітин не зростав за дії амінокислот у концентрації 20 ммоль/л (2 год) у базовому позаклітинному середовищі з глюкозою; на фото справа представлені приклади блебінгу, $n = 6$

Однак глутамін спричиняв зростання середньої площі клітини майже в два рази (рис. 3.42). Це не було пов'язано із зміною осмотичного тиску, оскільки

солоність розчину лише зростала при додаванні 20 ммоль/л глютаміну і такий ефект не спостерігався за додавання інших амінокислот у тій самій концентрації. У майбутніх експериментах слід дослідити вплив глютамату, щоб перевірити специфічність цього ефекту саме для глютаміну.

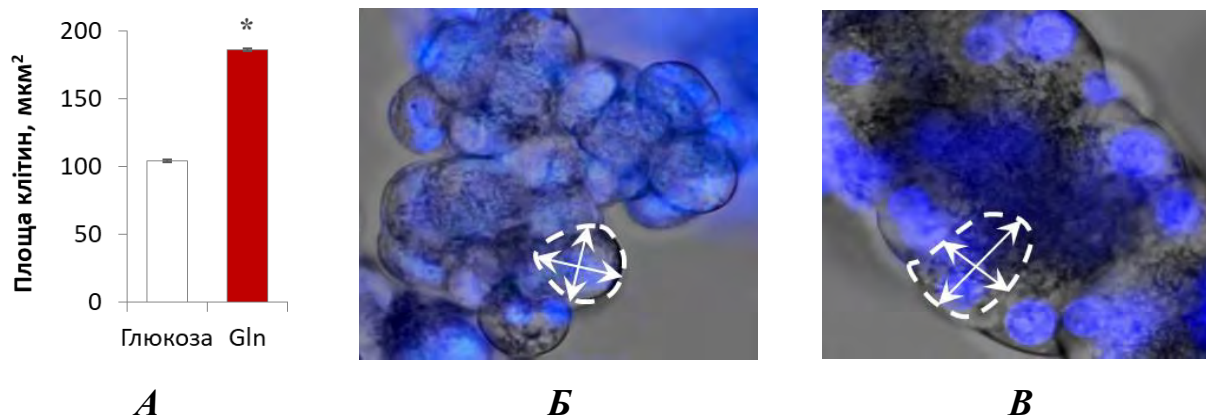


Рис. 3.42. Глутамін збільшує площу ацинарних клітин підшлункової залози за інкубації впродовж 2 год у базовому позаклітинному середовищі (А); Б – контроль, В – глютамін; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, $n = 6$

Оскільки результати цього експерименту вказують на те, що брак амінокислот у середовищі знижує їх життєздатність клітин, у наступному досліді ми використовували середовище DMEM, що містить усі необхідні амінокислоти та вітаміни у концентраціях, близьких до оптимальних для виживання клітин. Для перевірки токсичності досліджуваних амінокислот ми збільшували їх концентрацію до 20 ммоль/л у середовищі DMEM.

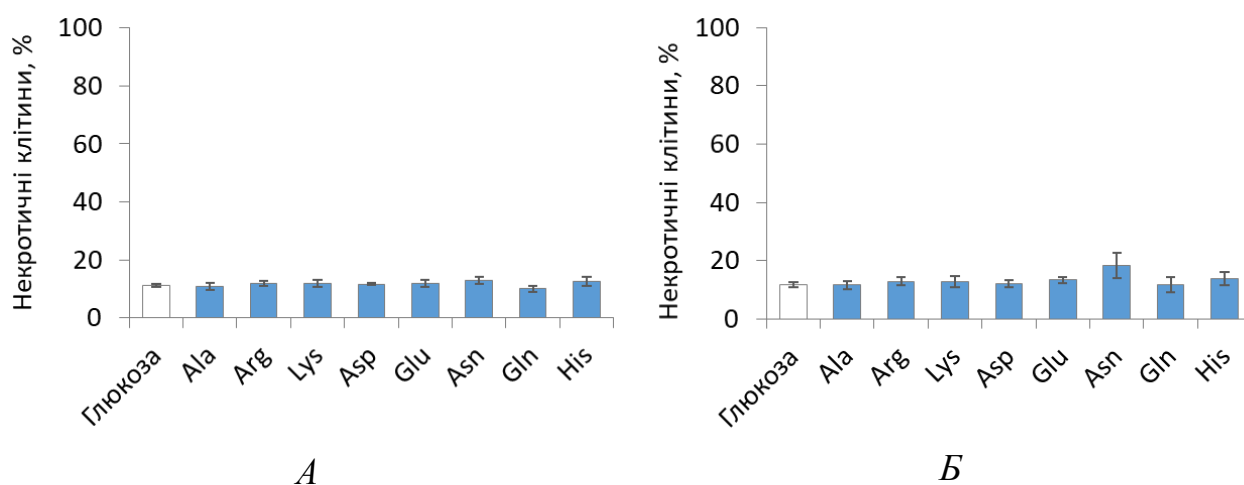


Рис. 3.43. Амінокислоти не впливають на життєздатність панкреатичних ацинусів у середовищі DMEM впродовж 2 (А) та 4 годин (Б), $n = 8$

Такий підхід виправдав себе: після 2 годин інкубації близько 11% клітин були зафарбовані етидій бромідом, що нижче ніж у попередньому експерименті. Більше того, за таких умов жодна із досліджуваних амінокислот не впливала на життєздатність ацинарних панкреатитів (рис. 3.43 А). Через 4 години життєздатність ацинарних клітин у контролі становила 12%, а за дії амінокислот також не змінювалась (рис. 3.43 Б). Ми також оцінили зміни морфології ізольованих ацинусів. Як і у попередньому експерименті, площа клітин зростала вдвічі після інкубування з глутаміном впродовж 2–4 годин у середовищі DMEM (рис. 3.44 Б, Г). Кількість мембранних блебів статистично вірогідно зростала за інкубації з глутаміном (2 і 4 години, рис. 3.44 А, В), а за наявності аспарагіну таке зростання спостерігали лише за 2 год дії. Чому зростання кількості блебів проявилось лише у середовищі DMEM, а не у базовому позаклітинному, залишається невідомим.

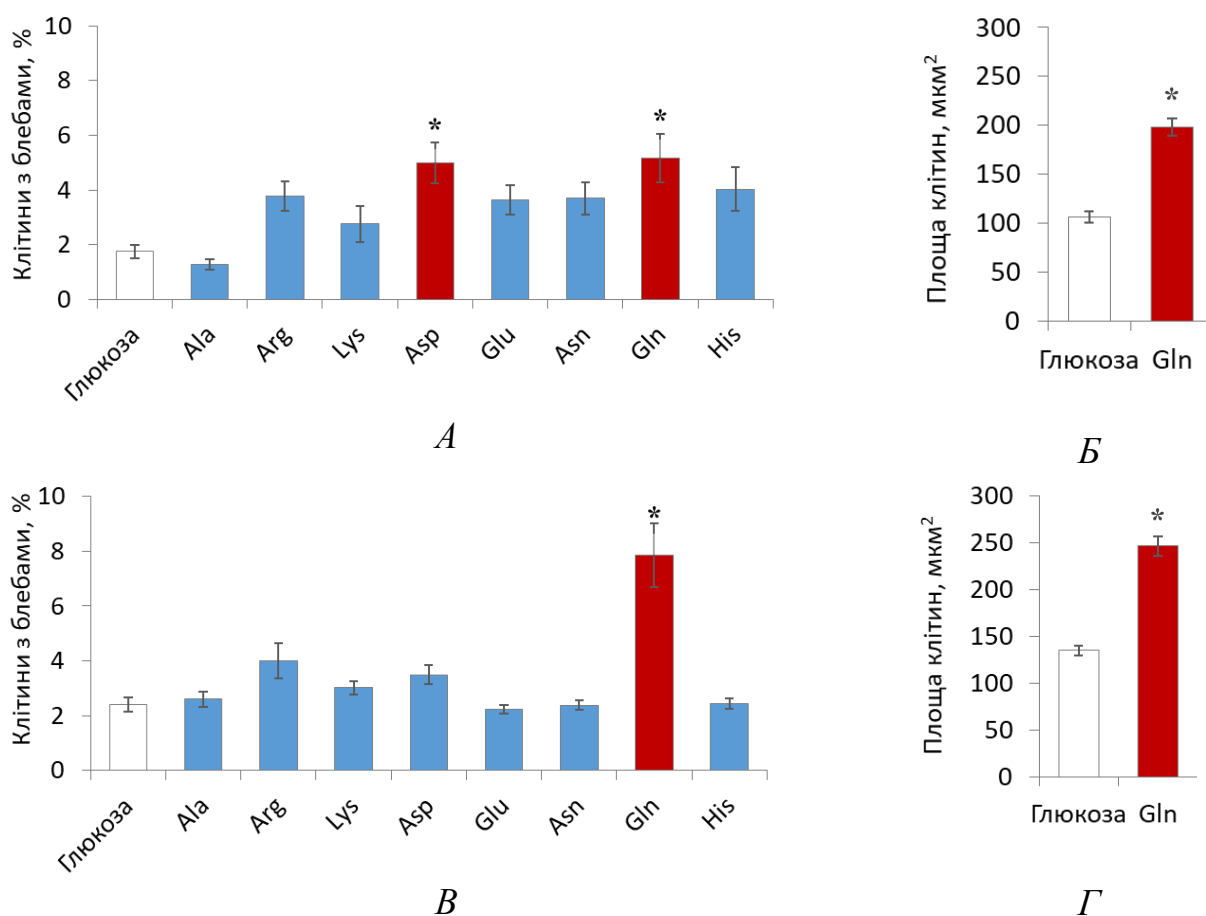


Рис. 3.44. Морфологічні зміни ацинарних клітин підшлункової залози за інкубації з амінокислотами (20 ммоль/л) впродовж 2 (А, Б) або 4 годин (В, Г) у середовищі DMEM: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (глюкоза) з $P < 0,05$, $n = 8$

Також було досліджено характерні для апоптозу процеси конденсації хроматину та фрагментації ядра [280] методом флуоресцентної мікроскопії клітин, зафарбованих барвником Hoechst 33258. Загалом, кількість клітин з такими ознаками була низькою – менше 1 % у всіх експериментах впродовж 2–4 годин інкубації (рис. 3.45). Досліджувані амінокислоти не впливали на кількість апоптичних клітин.

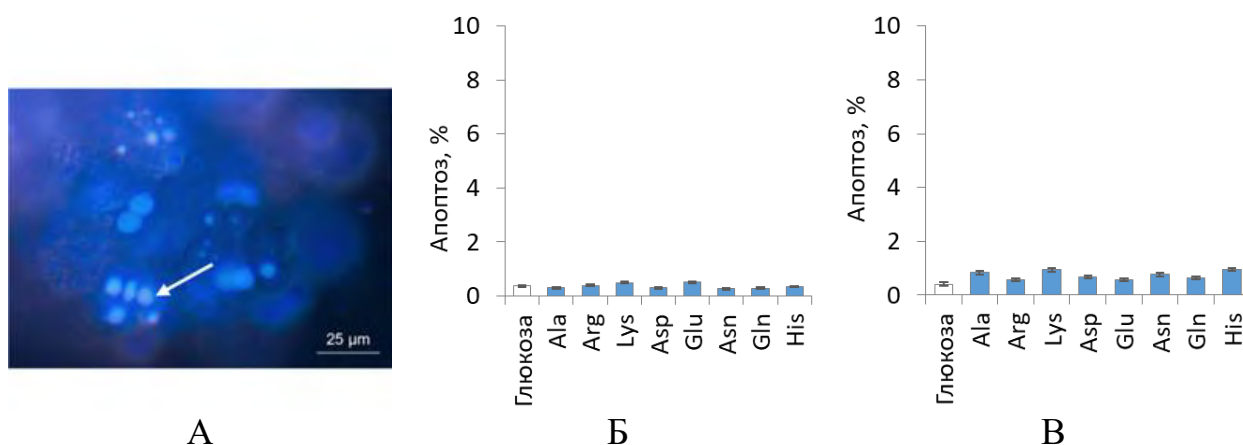


Рис. 3 45. Ацинарні клітини з ознаками апоптозу: конденсованим хроматином та фрагментованими ядрами (А) через 2 (Б) та 4 години (В) дії амінокислот (20 ммоль/л), $n=8$

Відомо, що блебінг також може бути ознакою апоптозу [281]. Однак у наших експериментах не виявлено кореляції між блебінгом і конденсацією хроматину: у клітинах зі змінами хроматину не спостерігали блебінгу. Блебінг також залучений і у інших клітинних процесах, наприклад, клітинній міграції [282]. Проте роль блебінгу в ацинарних клітинах підшлункової залози не з'ясована. Можливо, цей феномен проявляється лише *in vitro*. Тут варто зазначити, що середовище DMEM, яке ми використовували як контроль не містило ні глутаміну, ні пірувату. У розділі 3.7 представлено додаткові дані, що стосуються взаємодії пірувату та глутаміну у процесі виникнення блебів в цих клітинах.

Через 24 години інкубації більшість (75%) контрольних ацинарних клітин були все ще життєздатними (рис. 3.46). Серед усіх перевірених амінокислот лише аланін та гістидин не знижували життєздатності клітин. Глутамат, аспарагін та аспартат лише незначно підвищували некротичні процеси – кількість живих (не

зафарбованих етидій бромідом) клітин була вищою 50% (рис. 3.46). Подібні ефекти аспартату та аспарагіну вказують на те, що підвищення концентрації аспартату за лікування аспарагіназою, найімовірніше, не є причиною гострого панкреатиту. Неочікуваною була загибель усіх клітин після інкубування з глутаміном. Ми також підтвердили високу токсичність *in vitro* аргініну та лізину, але не гістидину (рис. 3.46), що було раніше показано на ізольованих ацинарних клітинах мишей [54]. Варто зазначити, що токсичність гістидину була виявлена коли клітини інкубували за неоптимальних умов у середовищі без інших амінокислот і вітамінів. Крім того, ми досліджували ізольовані ацинуси щурів, а не ацинарні клітини мишей, які можуть мати відмінності у метаболізмі та чутливості до дії амінокислот.

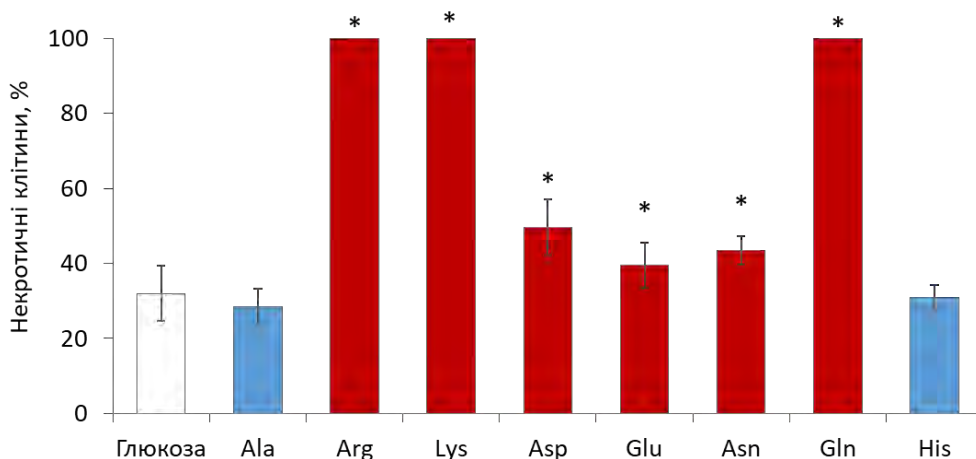


Рис. 3.46. Амінокислоти (20 ммоль/л) знижують життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози після інкубації впродовж 24 год у середовищі DMEM, окрім аланіну й гістидину: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (глюкоза) з $P < 0,05$, $n = 8$

Для перевірки механізму клітинної смерті ми виділили ДНК із ацинусів після інкубації з амінокислотами і провели її електрофорез (рис. 3.47). Як видно із фото результатів електрофорезу, відбувалась суттєва фрагментація ДНК у випадках впливу аргініну, лізину і глутаміну. Це підтвердило висновок, що після інкубації з цими амінокислотами відбувалась загибель клітин. Однак, легкі фрагменти ДНК не розділялись на дискретні групи за масою, що можна б було очікувати за апоптозу.

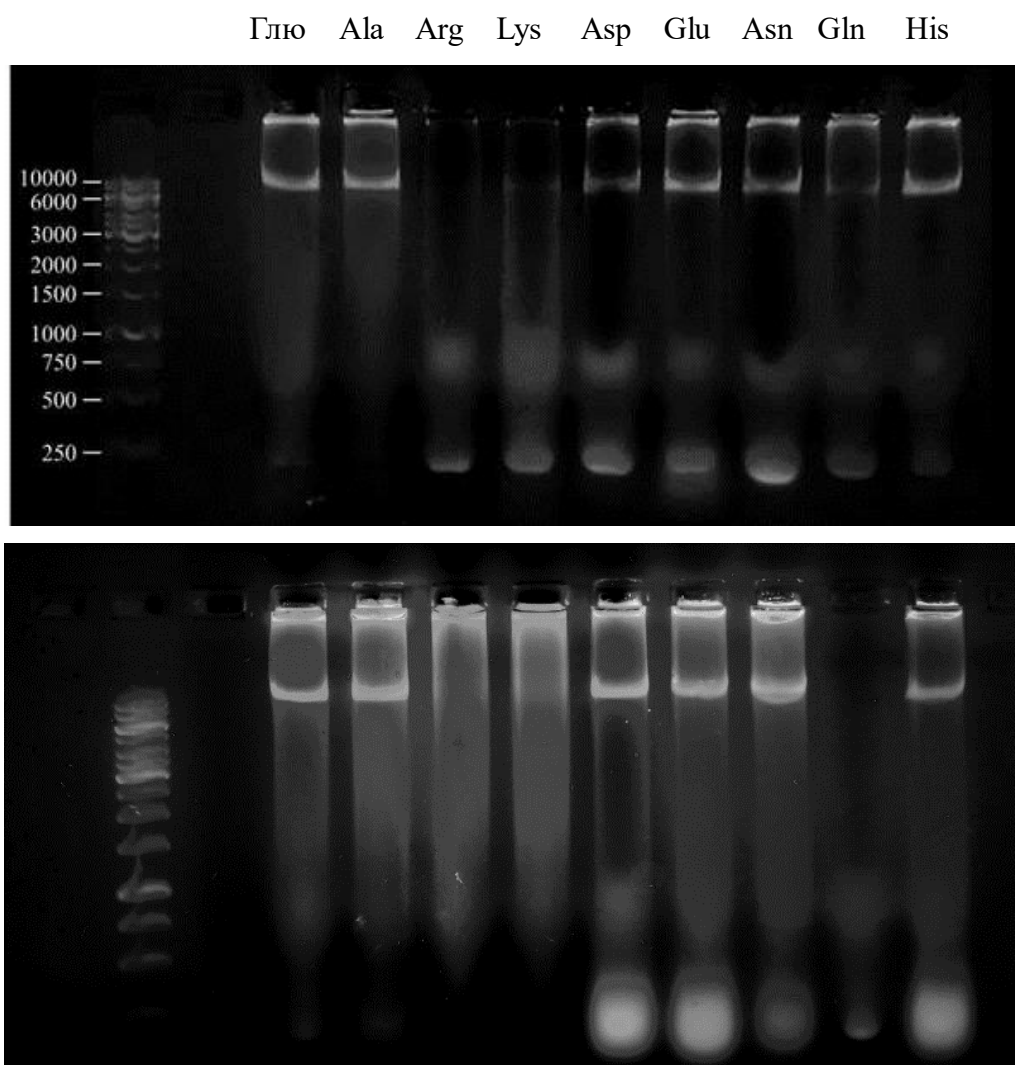


Рис. 3.47. Репрезентативні фото результатів електрофорезу ДНК ізольованих ацинусів у агарозному гелі після інкубації впродовж 24 год з амінокислотами у середовищі DMEM

У цьому дослідженні ми фактично використовували лізин та аргінін як позитивні контролю – адже їхня здатність ушкоджувати ацинарні клітини підшлункової залози добре відома [53], [54], [58], [283]. Серед амінокислот, які окиснюються у ацинарних клітинах підшлункової залози, лізин найгірше підходить як джерело енергії, оскільки його позитивний вплив на роз'єднане дихання спостерігався лише за високих концентрацій (5–20 ммоль/л), а за 20 ммоль/л лізин спричиняв швидку втрату життєздатності клітин. Це може бути пов'язане з негативною дією похідного лізину аміноадипінової кислоти на ацинарні клітини [284]. І хоча інше дослідження наводить докази позитивного впливу низької концентрації лізину на перебіг панкреатиту у мишей [44], ми вважаємо, що неконтрольоване використання лізину як харчового додатку може

спричиняти ушкодження підшлункової залози. Найбільш неочікуваним результатом цього дослідження була токсичність глутаміну за тривалої його дії, незважаючи на його початковий позитивний вплив за умов інкубації у середовищі з єдиним джерелом енергії глюкозою. Раніше було продемонстровано, що глутамін *in vivo* підвищував апоптоз ацинарних клітин у щурів з важким експериментальним гострим панкреатитом [49]. Проте результати нашого дослідження вказують на те, що глутамін безпосередньо не спричиняє апоптоз на моделі ізольованих ацинусів. Очевидно, механізм клітинної смерті є дещо іншим за дії високої концентрації глутаміну у порівнянні з лізином чи аргініном. Важливими ознаками шкідливого впливу глутаміну на панкреатичні ацинуси були значне набрякання та блебінг, що передували втраті цілісності плазматичної мембрани. Важливо, що глутамат, метаболіт глутаміну, не спричиняв ні таких морфологічних змін, ні загибелі всіх клітин через 24 год дії. Відомо, що глутамін може спонтанно розкладатись у розчині з утворенням аміаку [285]. Глутамін також пов'язаний із набряканням астроцитів, спричинених аміаком [258], але механізми є недостатньо зрозумілими. Ми припускаємо, що утворення високих концентрацій аміаку може бути причиною набрякання і, як наслідок, загибелі ацинарних клітин підшлункової залози за дії глутаміну. Незважаючи на те, що така токсична дія *in vitro* спостерігалась за нефізіологічної високої концентрації (20 ммоль/л), нижчі концентрації все ще можуть бути шкідливими для вже ушкоджених ацинарних клітин у пацієнтів з гострим панкреатитом.

Інша амінокислота глутамат має декілька переваг над глутаміном: вона швидше катаболізується мітохондріями ацинарних клітин підшлункової залози, тоді як ацинарні клітини значно краще витримують інкубацію з глутаматом у високій концентрації. Крім того відомо, що глутамат чинить імуносупресорну дію на багато видів імунних клітин [286], що також може бути корисним для покращення стану пацієнтів з гострим панкреатитом. Аланін також є привабливим джерелом енергії для пацієнтів з панкреатитом, так як він нетоксичний для підшлункової залози і може використовуватись як джерело

енергії, що підтверджує дані попередніх досліджень [35]. На моделях тварин [60] і у пацієнтів з гострим панкреатитом [41], [42] концентрація багатьох амінокислот у плазмі крові, знижується, включно і з глутаміном та аланіном. Глутамат є єдиною амінокислотою, концентрація якої зростає внаслідок гострого чи хронічного панкреатиту, що показано у багатьох дослідженнях [41], [42], [43], [60], [287], [288]. Проте невідомо, чи ці зміни пов'язані із катаболізмом амінокислот у підшлунковій залозі.

Повне парентеральне харчування, що містить добавки амінокислот, застосовують для пацієнтів з гострим панкреатитом, для яких ентеральне харчування неможливе. У дослідженні на здорових волонтерах підвищення концентрації амінокислот у крові під час введення парентерального додатку складало близько 50 мкмоль/л для більшості амінокислот і 100–150 ммоль/л для аланіну і гліцину [289], чого замало для суттєвої зміни окисних процесів в мітохондріях підшлункової залози. Окрім стандартного ентерального або парентерального харчування пацієнтів з гострим панкреатитом, було здійснено декілька спроб відновити знижений рівень глутаміну у плазмі крові. У рандомізованому клінічному дослідженні ентеральне введення глутаміну у пацієнтів з гострим панкреатитом не була досягнена первинна кінцева точка [290], можливо через нестабільність глутаміну у розчині. Використання стабільного дипептиду аланілглутаміну мало помірні позитивні ефекти у пацієнтів з гострим панкреатитом [47]. Аланілглутамін був введений пацієнтам внутрішньовенно у дозі 20 г на день, але, на жаль, у цьому клінічному випробуванні фармакокінетику не досліджували. У дослідженні на здорових волонтерах [291] одна доза 30 мк/кг маси тіла (~2 г) аланілглутаміну спричиняла короточасне (впродовж 15 хв) підвищення рівня аланіну і глутаміну у плазмі з піками 0,8 та 1,2 ммоль/л відповідно. У такому випадку, лише підвищення концентрації глутаміну може суттєво вплинути на процеси окисного фосфорилування у підшлунковій залозі, адже згідно наших даних необхідно підвищити концентрацію аланіну до 5 ммоль/л для досягнення впливу на роз'єднане мітохондріальне дихання. Тим не менше, такі високі концентрації

аланіну начебто безпечні для підшлункової залози. Аланін (принаймні у печінці) може перетворюватись аланінамінотрансферазою до пірувату [292], який, як було показано нами у розділі 3.7, а також у дослідженні Peng et al., може захищати ацинарні клітини підшлункової залози від токсичних речовин [167]. У наступному розділі ми детально опишемо позитивний вплив введення пірувату на рівень амінокислот у плазмі щурів за експериментального гострого панкреатиту.

Всі ці факти свідчать на користь продовження досліджень потенціалу застосування амінокислот (зокрема, глутамату, аланіну та, можливо, глутаміну) для підтримуючої терапії пацієнтів з гострим панкреатитом, а також їх можливої ролі у розвитку цього захворювання. Оскільки наші дані були отримані на щурах, для перевірки гіпотез необхідні додаткові дослідження, спочатку на функціональних ацинусах підшлункової залози людини, а потім – клінічні випробування.

Підсумки

Мітохондрії ацинарних клітини підшлункової залози здатні окиснювати глутамін, глутамат, аланін, лізин і аспартат, але не аспарагін, гістидин чи аргінін. Лізин, аргінін і глутамін у високих концентраціях спричиняють некроз ізольованих панкреатичних ацинусів.

Основні публікації:

1. Zub A.M., Manko B.O., Manko V.V. Screening of amino acids as a safe energy source for isolated rat pancreatic acini // *Pancreas*. –Vol 53 (8). – P. e662–e669.

3.5. Введення пірувату за моделі аргінін-індукованого панкреатиту

Відомо, що рівень амінокислот у плазмі змінюється за гострого панкреатиту [41], [42], можливо, внаслідок дефіциту ферментів[293], порушення кишкового всмоктування або виникнення системного запалення [294]. Деякі групи вчених пробують використовувати рівень амінокислот у плазмі як біомаркери панкреатиту або раку підшлункової залози [295], [296]. Проте зараз не зрозуміло, чи рівень амінокислот у плазмі можна використовувати як індикатор тяжкості гострого панкреатиту або ознаку одужання.

З іншої сторони, давно відомо, що введення аргініну спричиняє селективний некроз ацинарних панкрецитів [283], [297]. Останнім часом були також розроблені моделі панкреатиту гризунів за дії інших основних амінокислот [53], [54]. Важливо зазначити, що на сьогодні описано два клінічні випадки гострого панкреатиту, асоційованого з вживанням високих доз аргініну [55], [56].

Високі дози аргініну спричиняють зміни ультраструктури внутрішньоклітинних органел (ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії) [293], [298]. Ca^{2+} -незалежна мітохондріальна дисфункція, пов'язана з циклофіліном D, виникає на ранніх стадіях розвитку гострого аргінін-індукованого панкреатиту і вважається основною причиною інших патологічних проявів, таких як зниження рівня АТФ, порушення автофагії, стрес ендоплазматичного ретикулума, некроз і запалення підшлункової залози [59]. Цікаво, що у моделі гострого панкреатиту на щурах аргінін в основному накопичується в мітохондріях, мабуть, за рахунок метаболізму цієї амінокислоти [59], а можливим медіатором негативних ефектів l-аргініну є орнітин, проміжний метаболіт аргініну в циклі сечовини [54], [299].

Деякі доклінічні дослідження спрямовані на лікування панкреатиту шляхом відновлення окисної функції мітохондрій [82], [164], [246]. Результати нашої роботи, представлені у розділі 3.6, підтверджують здатність пірувату захищати від дії токсичних речовин. У поєднанні зі даними фармакокінетики пірувату, які показують високе і швидке накопичення цього субстрату у підшлунковій залозі у порівнянні з іншими органами [300], застосування пірувату у терапії гострого панкреатиту виглядає перспективним. І дійсно,

внутрішньовенне введення пірувату натрію має позитивний вплив на моделі гострий церулеїн-індукованого панкреатиту у щурів [301].

Отже, наступний експеримент був проведений з двома цілями: по-перше, для перевірки можливості використовувати рівень амінокислот у плазмі як біомаркер пошкодження та відновлення підшлункової залози, а по-друге, для виявлення ефектів внутрішньоочеревинного введення пірувату натрію на морфологічний стан підшлункової залози і концентрації амінокислот у плазмі у щурів з аргінін-індукованим гострим панкреатитом.

* * *

Після введення аргініну та пірувату, як описано у розділі «Матеріали і методи дослідження», ми оцінювали ушкодження підшлункової залози за активністю амілази у плазмі крові та гістологічним методом. Нам не вдалось виявити різниці у активності амілази на 3, 5 і 8 день після введення аргініну. Це можливо тому, що пік зростання амілази наставав раніше. Відомо, що у щурів [302], на відміну від мишей [209], активність амілази після введення аргініну зростає через 1 добу, а на 2 добу вже повертається до норми, що, на жаль, не було враховано під час планування експерименту.

Для підтвердження, що панкреатит таки розвивався, ми провели гістологічне дослідження на 8 день після декапітації тварин. У контрольних щурів морфологія підшлункової залози була типова (Рис. 3.48 А). Натомість у зрізах підшлункових залоз, отриманих із тварин, яким вводили аргінін (незалежно від введення пірувату) було виявлено ознаки фіброзу (Рис. 3.48 Б, В). Не було виявлено ознак інфільтрації лімфоцитів, некрозу, чи набряку, очевидно, через пізні дослідження (7 днів після епізоду панкреатиту). Отже, гістологічні дослідження не свідчать на користь позитивного впливу введення пірувату натрію на підшлункову залозу в нашому експерименті. Поряд із цим, цілком можливо, що якби цю експериментальну терапію було розпочато швидше, одночасно із введенням аргініну або на декілька годин пізніше, її позитивні

ефекти могли б проявитись ще до загибелі значної кількості клітин підшлункової залози.

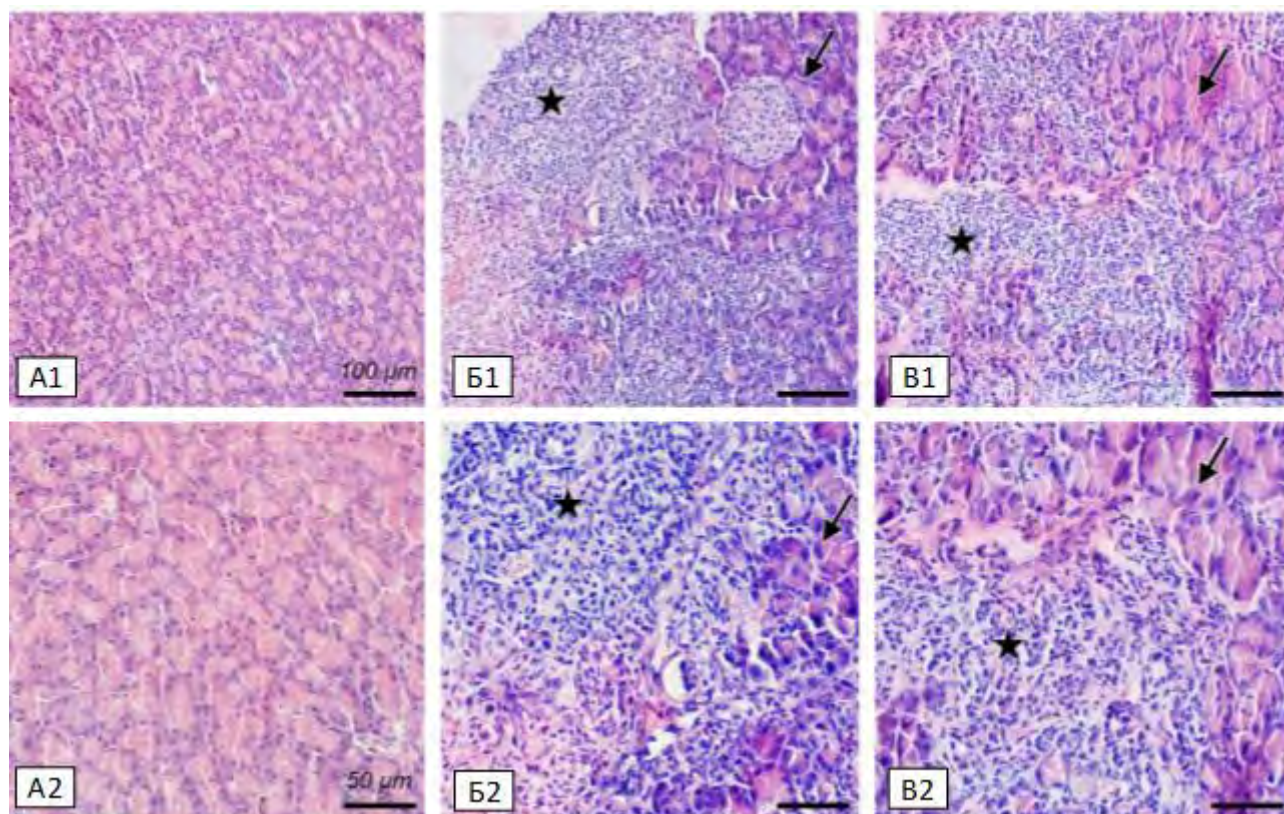


Рис. 3.48. Гістологічне дослідження підшлункової залози щурів: нормальна паренхіма у контрольних тварин (а1, а2) і фіброзне перетворення (зірка), що межує з нормальною тканиною (стрілка) у щурів після введення аргініну (Б1, Б2) або аргініну та пірувату (В1, В2)

Дослідження рівня амінокислот у плазмі щурів провели на 8 день експерименту (табл. 3.18). Рівень більшості незамінних амінокислот у плазмі щурів з панкреатитом статистично вірогідно знижувався: триптофан – на 49%, метіонін – на 27%, фенілаланін – на 40%, лейцин та ізолейцин (піки розділити не вдалось) – на 30 %. У групі тварин з панкреатитом, яким додатково вводили піруват натрію, концентрації метіоніну, фенілаланіну, лейцину та ізолейцину статистично вірогідно не відрізнялись від контролю.

Натомість, у порівнянні з тваринами з панкреатитом, яким не вводили піруват, статистично вірогідно зростали концентрації триптофану та фенілаланіну, наближаючись до нормальних значень. Рівень валіну знижувався в

обох групах після введення аргініну, незалежно від пірувату (табл. 3.18). Концентрація лізину у плазмі крові не відрізнялася між групами тварин.

Таблиця 3.18

Концентрації амінокислот у плазмі щурів за аргінін-індукованого панкреатиту (аргінін) або також за введення пірувату натрію (аргінін+піруват)

Амінокислоти	Контроль	Аргінін	Аргінін+ піруват
Незамінні:			
Метіонін	45,4 ± 3,8	33,2 ± 5,2 *	39,5 ± 4,1 #
Фенілаланін	82,7 ± 5,8	49,6 ± 5,0 *	77,5 ± 8,9 #
Триптофан	192,4 ± 18,2	97,7 ± 13,7 *	150,4 ± 22,2 * #
Лейцин + Ізолейцин	302,2 ± 75,7	211,6 ± 26,7 *	245,4 ± 45,1
Валін	96,6 ± 7,3	85,7 ± 6,8 *	80,8 ± 9,9 *
Лізін	158,0 ± 22,7	143,0 ± 13,8	139,0 ± 11,2
Замінні:			
<i>Беруть участь у реакціях трансамінування чи дезамінування</i>			
Аланін	220,7 ± 32,7	263,5 ± 56,0	276,2 ± 48,0
Глутамін	711,7 ± 32,2	662,1 ± 62,3	942,6 ± 114,9 #
Глутамат	114,5 ± 11,2	158,4 ± 12,2 *	150,0 ± 21,1 *
Аспарагін	92,3 ± 12,2	65,5 ± 14,5 *	73,7 ± 8,4 *
Аспартат	126,0 ± 17,9	187,4 ± 14,8 *	131,4 ± 10,3 #
<i>Інші замінні</i>			
Аргінін	311,7 ± 19,1	342,2 ± 12,2	309,5 ± 49,1
Орнітин	267,5 ± 18,8	148,2 ± 42,8 *	232,1 ± 46,9 #
Серин	173,8 ± 11,2	101,5 ± 5,1 *	207,4 ± 24,1 * #
Цистеїн	373,3 ± 57,9	312,2 ± 48,9	277,5 ± 30,0 #
Цистин	70,9 ± 11,3	47,2 ± 10,1 *	64,5 ± 16,6 *
Таурин	131,8 ± 16,4	111,5 ± 19,2	119,2 ± 16,3

Дані представлено як середнє арифметичне ± стандартне відхилення (у мкмоль/л), статистично вірогідна різниця щодо контролю (*) або щодо L-аргінінового панкреатиту (#) з $P \leq 0,05$; n = 6

У щурів з експериментальним гострим панкреатитом концентрація деяких замінних амінокислот також змінювалась. Спостерігалась закономірність, що знижувались рівні аспарагіну та (незначно) глутаміну, але зростали концентрації продуктів їх дезамінування аспарагінової та глутамінової кислот. Введення пірувату суттєво підвищувало вміст у плазмі глутаміну (на близько 50 %) і

знижувало вміст аспартату до рівня контролю, однак не впливало на рівень глутамату і аспарагіну. Концентрація аргініну у плазмі щурів з аргінін-індукованим панкреатитом не змінювалась, але концентрація його метаболіту орнітину зростала на 45%.

Введення натрій пірувату повертало концентрацію орнітину до контрольних значень. У окремій групі амінокислот, що окиснюються до пірувату, серин (але не цистеїн чи аланін), а також дипептид цистин знижувались у тварин з панкреатитом. Застосування пірувату статистично вірогідно підвищувало концентрацію серину у плазмі крові до вищих, ніж у контролі, значень. Вміст таурину не відрізнявся між групами тварин.

Оскільки в нашому дослідженні рівень амінокислот плазми вимірювали на восьмий день після введення L-аргініну, ми вважаємо, що наслідки його метаболізму на рівень амінокислот у плазмі крові вже припинились. Адже у крові щурів незадовго після введення аргініну рівень амінокислот змінюється інакше, ніж у нашому експерименті [60], [303]. Відомо, що у плазмі крові 30 хв після ін'єкції аргініну зростає його концентрація, як і орнітину й таурину, проте не інших амінокислот [303]. Натомість, через 24 год після введення аргініну, концентрації аргініну й орнітину знижувались до значень нижчих, ніж у контрольні [60]. Концентрації багатьох інших амінокислот (аланін, метіонін, фенілаланін, лізин, глутамін, валін, аспартат, серин) також знижувались через добу після введення аргініну. Ці зміни супроводжувались ушкодженням підшлункової залози [60]. Тому ми вважаємо, й у нашому дослідженні виявлені відхилення у концентрації амінокислот плазми є наслідком ураження підшлункової залози.

Виявлені нами порушення амінокислотного складу плазми крові загалом подібні до виявлених у пацієнтів з гострим панкреатитом [41], [42]. Зокрема, можна описати три типові ефекти: 1) концентрація більшості незамінних амінокислот знижується; 2) підвищується активність процесів трансамінування/дезамінування, що призводить до підвищення концентрації

глутамату і зниження – глутаміну і аспарагіну; 3) рівень інших замінних амінокислот (аланін, серин, аргінін, орнітин) знижується.

Можна висунути гіпотезу, що зниження рівня незамінних амінокислот відбувається внаслідок порушення травлення та їх всмоктування внаслідок недостатності підшлункової залози. Проте, за експериментального голодування рівень цих амінокислот не змінюється або навіть зростає [304], [305], можливо, завдяки зниженню їх окиснення у м'язах [306].

Підвищення концентрації глутамату може бути спричинене зростанням активності аспартатамінотрансферази у плазмі, що виявлено на моделі аргінін-індукованого панкреатиту [307], [308]. Натомість, зниження глутаміну плазми може бути спричинене утилізацією цієї амінокислоти імунними клітинами, що інфільтрують підшлункову залозу. У випадках травм глутамін активно поглинається макрофагами, нейтрофілами та лімфоцитами [309], і залучений у регуляції метаболізму, поділу клітин та синтезу цитокінів [310].

Такі зміни характерні не лише для панкреатиту, вони також спостерігаються у пацієнтів з запальними захворюваннями, наприклад пневмонією [311] чи запальних захворювань кишечника [312]. Натомість, за хронічного панкреатиту (за якого запальні процеси менш інтенсивні) зміни амінокислот плазми не такі виразні [43], [287], [288], [294]. Тому, найбільш очевидною причиною виявлених змін амінокислот у плазмі є запалення і/або вторинне ушкодження інших органів.

У щурів після введення пірувату рівень багатьох замінних та незамінних амінокислот був нормалізованим. Більшість ефектів пірувату після введення аргініну не є добре зрозумілими, за винятком зростання концентрації його метаболіту серину. Недоліком цього експерименту була відсутність групи тварин, яким вводили лише піруват для вивчення його ефекту на рівень амінокислот плазми. Оскільки ми не виявили гістологічних доказів покращення стану підшлункової залози за дії пірувату, неясно, чи нормалізація концентрації амінокислот може бути маркером одужання від гострого панкреатиту. Тим не менше, піруват міг покращити деякі аспекти функціонування підшлункової

залози, запалення та метаболічного стану організму. Отже, введення пірувату може мати позитивний вплив як підтримуюча терапія для пацієнтів з гострим панкреатитом, однак для перевірки цієї гіпотези слід провести додаткові дослідження.

Підсумки

Введення пірувату натрію щурам з експериментальним аргінін-індукованим гострим панкреатитом коригує рівень амінокислот у плазмі крові

Основні публікації:

1. Zub A.M., Ostapiv R.D., Manko B.O., Manko V.V. Sodium pyruvate improves the plasma amino acid profile in rats with l-arginine-induced acute pancreatitis // Amino Acids. – 2023. – Vol. 55. – P. 1447–1454.

3.6. Характеристика адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих гепатоцитів

3.6.1. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих гепатоцитів від субстрату окиснення та способу виділення

У розділі 3.3 ми охарактеризували адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Однак надалі слід було встановити, які з виявлених закономірностей є тканиноспецифічними, а які властиві для мітохондрій незалежно від типу клітини. Для цього було вибрано класичний об'єкт досліджень мітохондріального окисного фосфорилування – печінку щурів. Мітохондріальне окиснення є надзвичайно важливим для нормального функціонування печінки. Відомо, що генетичні мітохондріальні захворювання часто проявляються у порушеннях функціонування печінки, а саме зниженні окиснення ліпідів, фіброзі і стеатозі [313]. Мітохондрії також залучені у патогенезі алкогольної й неалкогольної хворіб печінки [7], [12]. Тому дослідження адаптаційної здатності мітохондрій печінки може мати важливе

діагностичне значення. Окремим питанням є життєздатність ізолюваних гепатоцитів, від якої залежить якість та релевантність отриманих наукових результатів. Для ізоляції гепатоцитів використовують як метод прижиттєвої перфузії печінки *in situ* [314], так і перфузію окремо ізолюваної частки печінки *in vitro* [315]. Однак досі невідомо, як впливає метод ізолювання гепатоцитів на функціонування мітохондрій, дослідження чого й було окреим завданням нашого дослідження.

* * *

У перших експериментах ми отримували ізолювані гепатоцити методом перфузії *in situ*. Клітини інкубували у середовищах з вибраними субстратами окиснення впродовж 15 хв, а потім досліджували їх дихання, додаючи у комірку FCCP для збільшення його концентрації до 0,25, 0,5 та 1 мкмоль/л (рис. 3.49 А). У контролі (без субстратів окиснення) протонофор стимулював дихання, однак за його високої концентрації (1 мкмоль/л) воно в середньому дещо знижувалось.

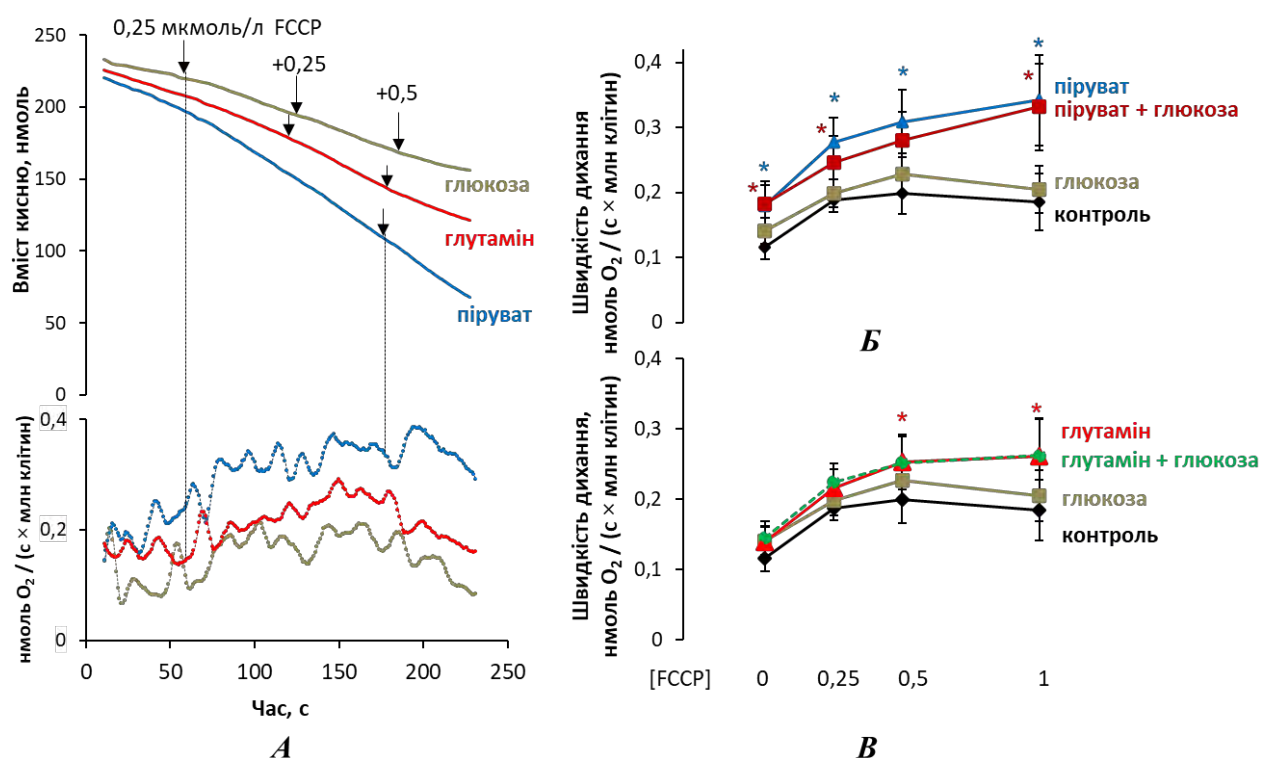


Рис. 3.49. Дихання ізолюваних гепатоцитів зростає за окиснення пірувату і глутаміну: А – оригінальні записи (зверху) та розрахована миттєва швидкість дихання (знизу); * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без субстратів) з $P < 0,05$, $n = 6$

Виявилось, що глюкоза практично не впливала на базальне і роз'єднане дихання гепатоцитів, незалежно від наявності інших субстратів окиснення (рис. 3.49 Б,В). Отже, швидкість гліколізу у гепатоцитах недостатня для створення додаткових субстратів і забезпечення дихання за стимуляції протонофором, або ж цей процес був повністю насиченим за умов інкубації у середовищі без субстратів завдяки глікогенолізу. Натомість піруват (2 ммоль/л) статистично вірогідно стимулював як базальне дихання, так і роз'єднане за всіх концентрацій FCCP. Це доводить незвичайну метаболічну гнучкість мітохондрій гепатоцитів: за наявності додаткового субстрату пірувату вони здатні активувати процеси дихання навіть без додаткової стимуляції. Оскільки швидкість дихання у клітинах зазвичай обмежена швидкістю фосфорилування (а отже, доступністю АДФ), ми вважаємо, що зростання базального дихання за умов присутності пірувату можливе завдяки стимуляції глюконеогенезу піруватом. Це узгоджується з іншими дослідженнями, проведеними на гепатоцитах ізольованих із щурів, що голодували [87]. Глутамін же призводив до інтенсифікації лише роз'єданого дихання за 0,5–1 мкмоль/л FCCP. Його ефекти були нижчими, ніж у піруваті, який також статистично вірогідно підвищував максимальну швидкість роз'єданого дихання (табл. 3.19).

Були проведені також додаткові дослідження впливу на дихання субстратів циклу Кребса сукцинату і α -кетоглутарату, а також їх більш проникних метилових естерів [316]. Парадоксально, але швидкість базального та роз'єданого дихання зростала практично однаково як за наявності сукцинату, так і монометилсукцинату (рис. 3.50 А, табл. 3.19). Це свідчить про досить активний транспорт сукцинату крізь плазматичну мембрану гепатоцитів. Транспортери дикарбоксилатів родини *Slc13*, як відомо, експресуються у гепатоцитах [317]. Деяку різницю у кінетиці роз'єданого дихання було встановлено між дією α -кетоглутарату і диметил- α -кетоглутарату: за вищих концентрацій протонофора (0,5–1 мкмоль/л) вплив на роз'єдане дихання чинив лише естер цього субстрату (рис. 3.50 Б). Також, підтверджено зростання

максимальної швидкості роз'єданого дихання саме за диметил- α -кетоглутарату (табл. 3.19).

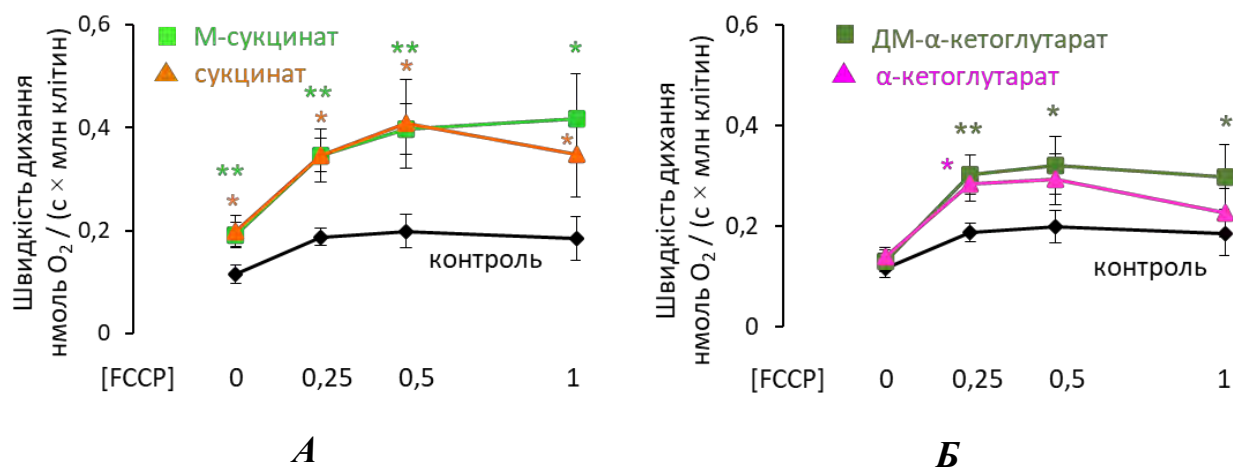


Рис. 3.50. Дихання ізольованих гепатоцитів зростає за окиснення сукцинату, монометилсукцинату (М-сукцинат), α -кетоглутарату і диметил- α -кетоглутарату (ДМ- α -кетоглутарат): * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без субстратів) з $P < 0,05$, $n = 6$

Оптимальна концентрація протонатора залежала від субстрату окиснення і була найвищою за наявності пірувату (табл. 3.19). Максимальна швидкість роз'єданого дихання статистично вірогідно зростала у експериментах з піруватом, сукцином, монометилсукцином і диметил- α -кетоглутаратом (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

Характеристика роз'єданого дихання гепатоцитів

Експериментальні умови	Оптимальна [FCCP], мкмоль/л	Максимальна швидкість дихання
Без субстратів (<i>контроль</i>)	0,57	0,21±0,06
Глюкоза	0,67	0,24±0,05
Піруват	> 1	0,38±0,07 *
Глутамін	0,82	0,29±0,07
Сукцинат	0,50	0,44±0,11 *
Монометилсукцинат	0,71	0,46±0,10 *
α -кетоглутарат	0,42	0,31±0,06
ДМ- α -кетоглутарат	0,54	0,33±0,09 *
Глюкоза + піруват	0,79	0,33±0,10
Глюкоза + глутамін	0,83	0,27±0,07

* – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем з $P < 0,05$, $n = 6$

Як бачимо, ці дані дещо відрізняються від отриманих у підшлунковій залозі: піруват та сукцинат краще підтримували максимальну окисну здатність гепатоцитів, ніж глютамін чи α -кетоглутарат. Однак загальні закономірності зберігаються: наявність додаткових субстратів окиснення підвищує як максимальну швидкість роз'єданого дихання, так і його стабільність (оптимальну концентрацію протонифора).

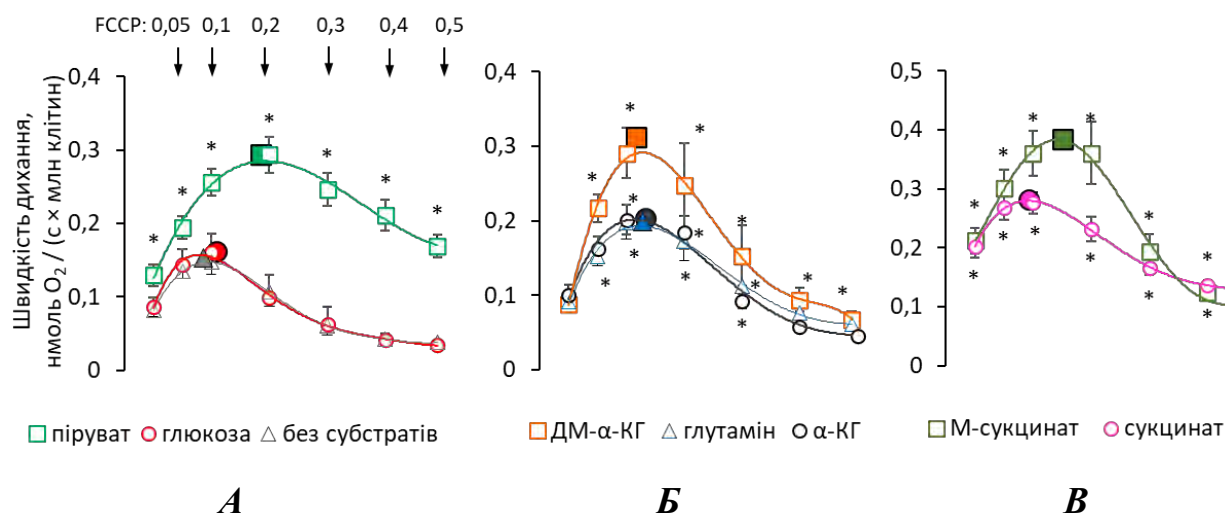


Рис. 3.51. Дихання гепатоцитів, ізольованих з перфузією печінки *in vitro*: замальовані маркери – максимальна швидкість дихання, * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (без субстратів) з $P < 0,05$, $n = 6$

У іншому експерименті, коли клітини печінки ізолювали за умов перфузії печінки *in vitro*, багато особливостей дихання були подібними (рис. 3.51) до попереднього дослід. А саме: 1) глюкоза не впливала на дихання, 2) базальне дихання стимулював піруват, сукцинат і монометилсукцинат, а також 3) суттєве зростання роз'єданого дихання спостерігали за наявності пірувату, монометилсукцинату та диметил- α -кетоглутарату. Проте, на відміну від попереднього експерименту, виявлено суттєву різницю між дією природніх форм сукцинату й α -кетоглутарату і їх естерами (рис. 3.51 Б,В): природні форми стимулювали дихання значно менше, що, очевидно, пов'язано не зі здатністю мітохондрій їх окиснювати, а з швидкістю транспорту через плазматичну мембрану.

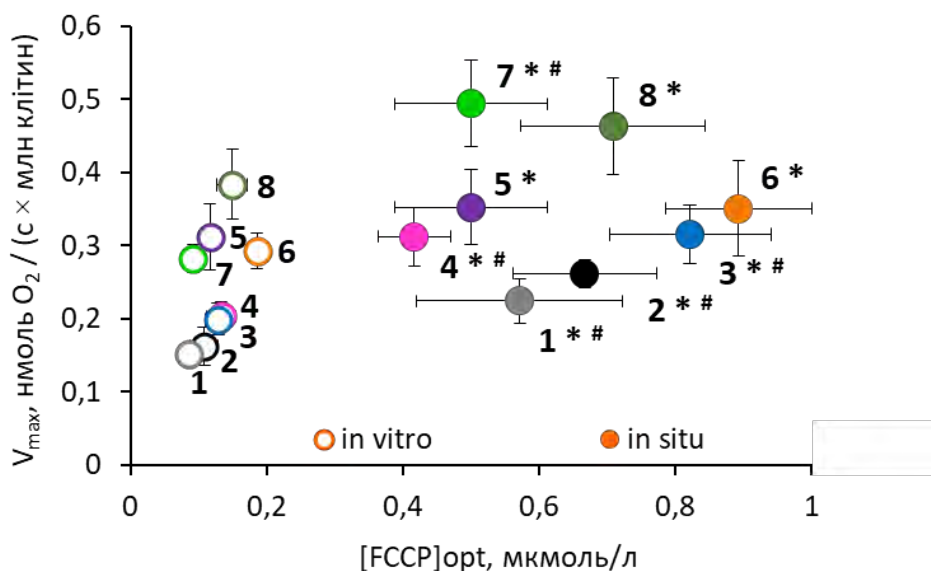


Рис. 3.52. Залежність параметрів роз'єданого дихання гепатоцитів від способу їх ізолювання: 1 – без субстратів, 2 – глюкоза, 3 – глутамін, 4 – α -кетоглутарат, 5 – диметил- α -кетоглутарат, 6 – піруват, 7 – сукцинат, 8 – монометилсукцинат; статистично вірогідна різниця оптимальної концентрації протонофора (*) чи максимальної швидкості роз'єданого дихання (#) з $P < 0,05$, $n = 6$

Однак найбільш суттєвою відмінністю були значно нижчі оптимальні концентрації протонофора (в 5 разів), за яких досягалась максимальна швидкість дихання, а також ці максимальні швидкості (в середньому, на 50%, рис. 3.52). Доведено статистично вірогідну різницю для обох параметрів як у досліді без жодних субстратів, так і за окиснення глюкози, глутаміну, α -кетоглутарату і сукцинату (рис. 3.52). Для пірувату і метилових естерів доведено лише різницю у оптимальній концентрації протонофора.

Слід зазначити, що не було виявлено різниці між кількістю життєздатних клітин (згідно фарбування трипановим синім), отриманих обома методами: $82,3 \pm 1,8\%$ (*in situ*) і $83,4 \pm 0,8\%$ (*in vitro*). Отже, у цьому випадку різниця у диханні не пов'язана із цілісністю плазматичної мембрани гепатоцитів.

Отже, метод виділення гепатоцитів з перфузією *in situ* кращий, ніж *in vitro*, оскільки отримані таким способом клітини мають мітохондрії зі значно вищою адаптаційною здатністю за окиснення всіх досліджуваних екзогенних субстратів чи навіть без них. Також, такі клітини здатні значно швидше транспортувати дикарбоксилати, такі як сукцинат чи α -кетоглутарат. Ми вважаємо, що однією з

причин цього є можлива гіпоксія за менш ефективною, але більш тривалою перфузією *in vitro*, що негативно впливала на мітохондріальні окисні процеси.

Підсумки

Адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів найвища за окиснення пірувату і монометилсукцинату. Спосіб ізолювання гепатоцитів за перфузії *in situ* дає змогу отримувати клітини з вищою адаптаційною здатністю мітохондрій.

Основні публікації:

1. Mazur H.M., Merlavsky V.M., Manko B.O., Manko V.V. Dependence of the mitochondrial adaptive capacity of hepatocytes on the oxidative substrates availability // Ukr. Biochem. J. – 2019. – Vol. 91(6). – P. 5–14.
2. Мазур Г.М., Мерлавський В.М., Манько Б.О., Манько В.В. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій печінки від способу виділення клітин // Вісник Львів. ун-ту. Сер.біол. – 2020. – Вип. 82. – С. 177–185.

3.6.2. Вплив етанолу та циклоспорину А на процеси окиснення в мітохондріях гепатоцитів

Етанол є важливим чинником розвитку захворювань печінки, а одним із механізмів його впливу є зміни у функціонуванні мітохондрій [12]. Споживання кисню печінки щурів різко підвищується у відповідь на додавання етанолу до перфузійного середовища [318]. Важливо, що наявність пірувату, а не лактату, є необхідною умовою для стимуляції дихання ізолюваних гепатоцитів етанолом *in vitro* [87]. З іншої сторони, піруват здатний суттєво прискорити катаболізм етанолу у печінці [96]. Однак окиснення етанолу ізолюваними гепатоцитами не зростає у щурів після його введення, хоча спостерігається інтенсифікація мітохондріального дихання [87]. Тому залишається нез'ясованим зв'язок між

швидкістю окиснення етанолу й мітохондріальним диханням гепатоцитів, зокрема за наявності пірувату у розчині. Цілком можливо, що ці процеси не пов'язані між собою, а піруват інтенсифікує окиснення етанолу шляхом забезпечення глюконеогенезу чи лактогенезу і використання відновлюваних еквівалентів (у формі НАДН), що накопичуються у реакціях окиснення етанолу. Механізми зростання швидкості дихання та деполязації мітохондрій за дії етанолу чи його токсичного метаболіту ацетальдегіду [13] залишаються в значній мірі не з'ясованими [12], як і причини залежності цих процесів від доступності субстратів окиснення.

Відомо, що активація мітохондріальної пори перехідної провідності не є причиною деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій за дії етанолу [13], що підтверджено з використанням інгібітора пори CsA. Крім того, ця речовина також є інгібітором кальциневрину, що обумовлює її широке застосування в медицині для імуносупресії. Важливим питанням фармакології є дослідження взаємодії різних терапевтичних та аліментарних факторів. Про взаємодію CsA з етанолом відомо небагато. Доведено, що червоне вино знижує біодоступність CsA, [319], проте роль етанолу в цьому процесі не з'ясована. Не відомо також, як одночасна дія цих речовин впливає на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, що стало ціллю наступних серій досліджень.

* * *

З метою дослідити вплив етанолу та CsA на дихання ізольованих гепатоцитів щурів їх інкубували у базовому позаклітинному середовищі, яке містило лише глюкозу як джерело енергії впродовж 1 год з етанолом (50 ммоль/л), CsA (0,5 мкмоль/л) або їх сумішшю. У контролі швидкість базального дихання гепатоцитів становила $0,167 \pm 0,009$ нмоль O_2 / (с $\times$ млн клітин) (рис. 3.53). За результатами двофакторного дисперсійного аналізу, етанол статистично вірогідно підвищував це дихання в середньому лише на 8 %. Цей низький ефект вдалось зареєструвати завдяки наявності чотирьох технічних повторів та

автоматичного обчислення швидкості дихання. CsA не змінював швидкості базального дихання гепатоцитів.

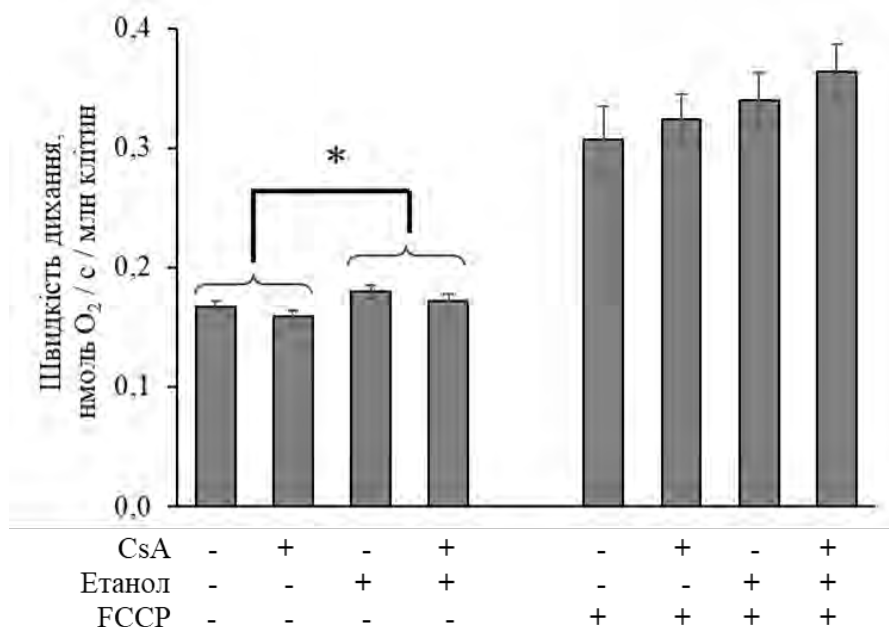


Рис. 3.53. Етанол не взаємодіє з CsA у впливі на базальне та роз'єднане (FCCP +) дихання ізольованих гепатоцитів щурів за окиснення глюкози: [етанол] = 50 ммоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [глюкоза] = 5 ммоль/л, FCCP = 0,25 – 1 мкмоль/л, * – статистично вірогідна різниця за впливу етанолу згідно із двофакторним дисперсійним аналізом, $P < 0,05$, $n = 5$

Внесення у комірку FCCP (0,25 – 1 мкмоль/л) призводило до стимулювання дихання в усіх експериментах (рис. 3.53, справа). Ні етанол, ні CsA не впливали на максимальну швидкість роз'єданого мітохондріального дихання. Оптимальна концентрація також не залежала від умов експерименту (дані не представлено).

Оскільки з даних літератури відомо, що саме наявність пірувату забезпечує стимуляцію етанолом дихання ізольованих гепатоцитів [87], ми вважаємо, що за присутності глюкози у нашому експерименті також утворювалась достатня кількість пірувату для прояву впливу етанолу. У додаткових експериментах ми перевірили цю гіпотезу, додавши до середовища піруват або, альтернативно, монометилсукцинат.

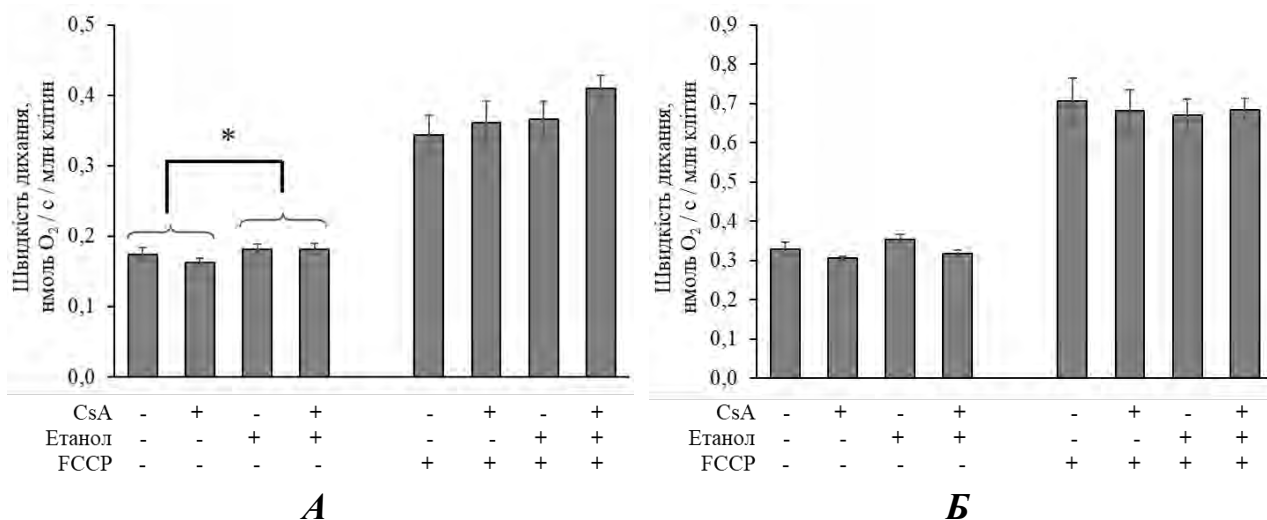


Рис. 3.54. Етанол не взаємодіє з CsA у впливі на базальне та роз'єднане (FCCP +) дихання ізольованих гепатоцитів щурів за окиснення глюкози та пірувату (А) або монометилсукцинату (Б): [етанол] = 50 ммоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [глюкоза] = 5 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [монометилсукцинат] = 2 ммоль/л, FCCP = 0,25 – 1 мкмоль/л, * – статистично вірогідна різниця за впливу етанолу згідно із двофакторним дисперсійним аналізом із повторами, $P < 0,05$, $n = 5$

За наявності пірувату в середовищі отримано подібні до попередніх результати: етанол статистично вірогідно підвищував швидкість базального дихання гепатоцитів (рис. 3.54 А), але не впливав на роз'єднане дихання. CsA не змінював дихання як у контролі, так і за умов інкубації з етанолом, згідно двофакторного дисперсійного аналізу. Якщо ж у середовищі замість пірувату був наявний монометилсукцинат – ні етанол, ні CsA не впливали на дихання гепатоцитів (рис. 3.54 Б). Наявність монометилсукцинату не забезпечувала зростання дихання за інкубації з етанолом мабуть тому, що продукт сукцинат швидко окиснюється мітохондріями і продукує відновлювальні еквіваленти у формі ФАДН₂. Піруват, натомість, може не лише окиснюватись, а й перетворюватись у лактат чи брати участь у гліюконеогенезі з окисненням НАДН, створюючи додаткову кількість акцептора протонів НАД⁺ для реакцій окиснення етанолу.

Результати експериментів підтверджують попередні дані про певні відмінності у дії етанолу на базальне дихання в залежності від субстрату окиснення [87]. Однак у нашому дослідженні у середовищі завжди була глюкоза,

і за цих умов ефекти етанолу на дихання були дуже невисокими, вочевидь, через відсутність активації гліюконеогенезу.

У підсумку, не було виявлено негативної дії CsA у поєднанні з етанолом на адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів. Зрозуміло також, що інгібування мітохондріальної пори перехідної провідності не усуває стимулюючий ефект алкоголю на базальне дихання мітохондрій, а вплив етанолу *in vitro* на дихання не пов'язаний зі зміною їх адаптаційної здатності. Однак для підтвердження безпечності вживання алкоголю разом із CsA у осіб, що потребують імуносупресивної терапії, необхідні додаткові експерименти, зокрема на моделях *in vivo*.

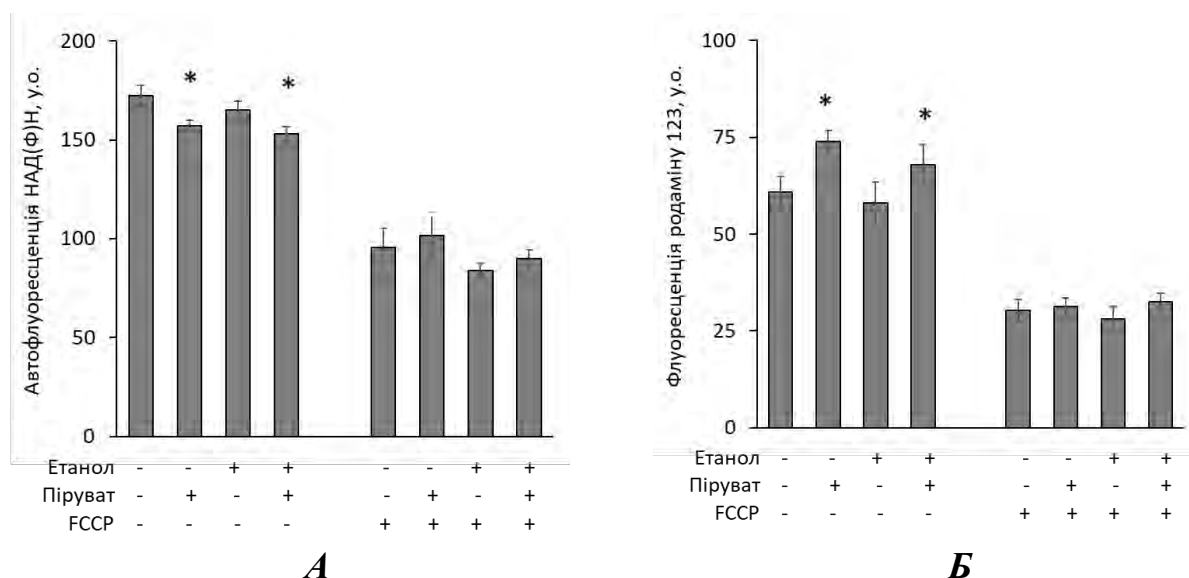


Рис. 3.55. Вплив етанолу та пірувату на флуоресценцію НАД(Ф)Н (А) або родаміну 123 (Б) гепатоцитів щурів: [етанол] = 50 ммоль/л, [глюкоза] = 5 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, FCCP = 2 мкмоль/л, * – статистично вірогідний вплив пірувату згідно із двофакторним дисперсійним аналізом із повторами, $P < 0,05$, $n = 5$

Для кращого розуміння взаємодії між метаболізмом пірувату і етанолу ми також вимірювали автофлуоресценцію НАД(Ф)Н гепатоцитів та рівень їх мітохондріального мембранного потенціалу з барвником родаміном 123 за допомогою електронної мікроскопії. Піруват знижував рівень автофлуоресценції НАД(Ф)Н, ймовірно, їх мітохондріального пулу, оскільки після інкубування з FCCP ефект не відтворювався (рис. 3.55 А). Крім того, піруват підвищував

мітохондріальний мембранний потенціал (рис. 3.55 Б). Етанол не впливав на жоден із досліджених параметрів.

Відсутність зростання рівня флуоресценції НАД(Ф)Н після інкубації з етанолом було неочікуваним результатом. Слід зазначити, що автофлуоресценція НАД(Ф)Н відображає сумарний рівень відновлення цих піридинових нуклеотидів, а саме мітохондріального та цитозольного пулів. Оскільки алкогольдегідрогеназа є цитозольним ензимом, не дивно, що етанол зазвичай підвищує рівень НАДН у цитозолі гепатоцитів, причому у значно нижчих концентраціях, ніж ми використали [61]. Однак у нашому експерименті етанол не спричиняв змін автофлуоресценції НАД(Ф)Н навіть за деполяризації мітохондрій FCCP. Натомість, у іншому дослідженні показано, що етанол може суттєво знижувати мітохондріальний пул НАДН [13]. Щоправда, цей ефект був асоційованим з повною дисипацією мітохондріального мембранного потенціалу і виникав лише за умов дослідження *in vivo*, а не *in vitro*. Також ми не виключаємо можливості невідомої нам методичної помилки в цьому експерименті, зокрема зміна автофлуоресценції інших речовин у гепатоцитах [320] чи швидке вигорання автофлуоресценції НАДН.

Піруват натомість здатний знижувати рівень цитозольного НАДН [61], очевидно, шляхом активації синтезу лактату або/і глюконеогенезу. Мабуть, за умов нашого експерименту неможливо чітко розділити мітохондріальний та цитозольні пули НАД(Ф)Н. Щодо мітохондріального мембранного потенціалу, то відсутність впливу етанолу цілком підтверджує результати іншого дослідження [13] *in vitro*. У прижиттєвому експерименті етанол був зданий деполяризувати мембрани мітохондрії печінки [13]. Підвищення ж флуоресценції родаміну 123 за наявності пірувату не обов'язково свідчить про зростання мембранного потенціалу мітохондрій: акумуляція цього барвника залежить також і від потенціалу плазматичної мембрани, який, як відомо, зростає у гепатоцитах за дії пірувату [321]. Це ще раз свідчить про складність інтерпретації даних флуоресценції родаміну 123. Тим не менше, нам не вдалось підтвердити, що

виявлене нами незначне зростання швидкості дихання за дії етанолу *in vitro* пов'язане з деполяризацією мітохондрій чи зростанням синтезу НАДН.

Підсумки

Етанол *in vitro* здатний незначно стимулювати базальне, та не роз'єднане дихання гепатоцитів, а CsA не впливає на цей процес. Ця стимуляція дихання не пов'язана зі статистично значущими змінами рівня НАД(Ф)Н, чи мітохондріального мембранного потенціалу мітохондрій.

Основні публікації:

1. Мазур Г., Манько Б. О., Манько В. В. Вплив етанолу та циклоспорину А на дихання ізольованих гепатоцитів щурів // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2024. – Вип. 91. – С. 86–91.

3.6.3. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів за активації пори перехідної провідності йонами Ca^{2+}

Добре відомо, що тривале і надмірне підвищення концентрації йонів Ca^{2+} у цитозолі негативно впливає на функціонування мітохондрій та клітин, спричиняючи їх загибель. Активація мітохондріальної пори перехідної провідності є важливим етапом у ланцюзі подій, які ведуть до виходу цитохрому *c* з мітохондрій та апоптозу чи некрозу [25], [322]. Тому у наступному експерименті на моделі пермеабілізованих гепатоцитів ми дослідили вплив активації цієї пори на окисне фосфорилування та роз'єднане дихання пермеабілізованих гепатоцитів.

* * *

Спочатку ми оптимізували метод пермеабілізації плазматичної мембрани гепатоцитів дигітоніном для дослідження дихання. Ми дослідили залежність пермеабілізації від концентрації дигітоніну за різних кількостей клітин у суспензії. Виявилось, що оптимальна (достатня) концентрація дигітоніну, яка

спричиняла повну пермеабілізацію плазматичної мембрани залежала від кількості клітин у суспензії (рис. 3.56 А). Так, для повної пермеабілізації 4,5–5,6 млн/мл клітин було необхідно використовувати 100 мкг/мл дигітоніну, а за умов наявності 1–1,7 млн/мл клітин було достатньо лише 25 мкг/мл. Ми спостерігали лінійну залежність частки пермеабілізованих клітин саме від співвідношення кількості дигітоніну і клітин, а оптимальним було близько 20 мкг дигітоніну / млн клітин (рис. 3.56 Б). За таких умов дихання за окиснення лише ендогенних субстратів знижувалось в 4 рази, а додавання субстратів з АДФ стимулювало дихання (рис. 3.57). Вищі дози дигітоніну не призводили до подальших змін дихання.

Механізм дії дигітоніну полягає у формуванні нерозчинних комплексів з холестеролом мембран, завдяки чому в мембранах утворюються пори [323]. Відповідно, залежність дії цього детергента від кількості тканини не була неочікуваною. Вважають, що дигітонін за низьких концентрації діє селективно на плазматичну мембрану, оскільки вміст у ній холестеролу на порядки вищий, ніж в мембранах внутрішньоклітинних мембран [324]. Саме тому за умов нашого дослідження функціонування мітохондрій зберігалось.

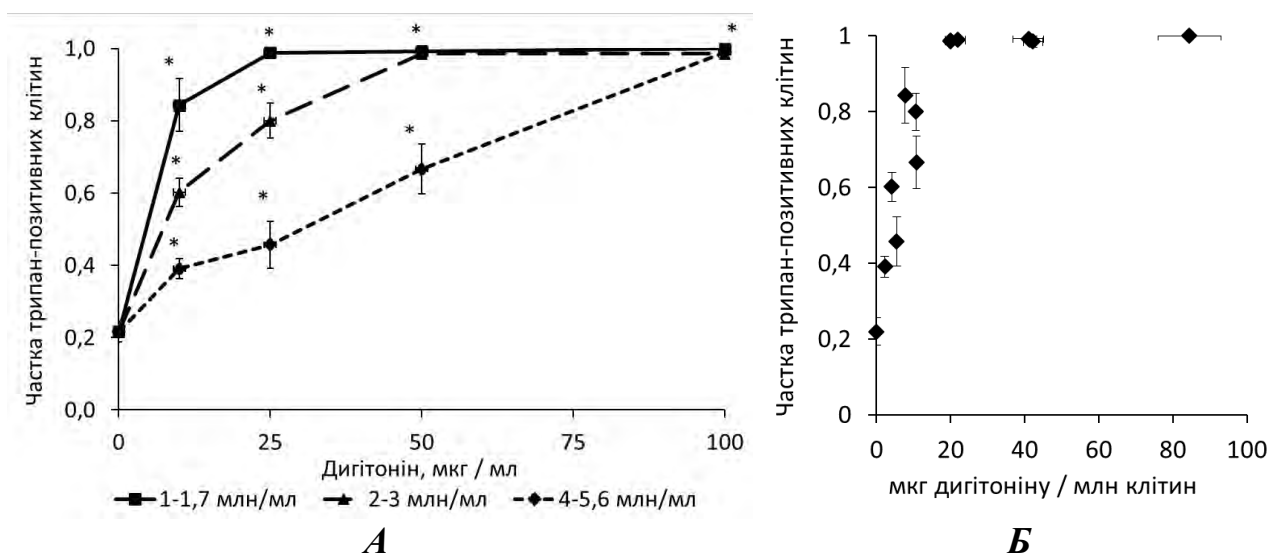


Рис. 3.56. Ступінь пермеабілізації гепатоцитів дигітоніном залежить від кількості клітин у суспензії (А) і їх дихання (Б): [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [α -кетоглутарат] = 1 ммоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л; n = 5

Для дослідження впливу йонів Ca^{2+} на дихання пермеабілізованих дигітоніном гепатоцитів у контролі їх інкубували у ЕГТА-Са буфері з розрахованою $[\text{Ca}^{2+}]$ 10^{-7} моль/л. Після внесення клітин у комірку додавали аліквоти концентрованого розчину CaCl_2 для підвищення концентрації іонізованого Ca^{2+} до 10^{-6} або 10^{-5} моль/л. У пробних експериментах було експериментально встановлено, що оптимальна концентрація протонофора за окиснення суміші пірувату, глутамату і малату (ПГМ) становить 0,25 мкмоль/л. Таку концентрацію і використовували надалі.

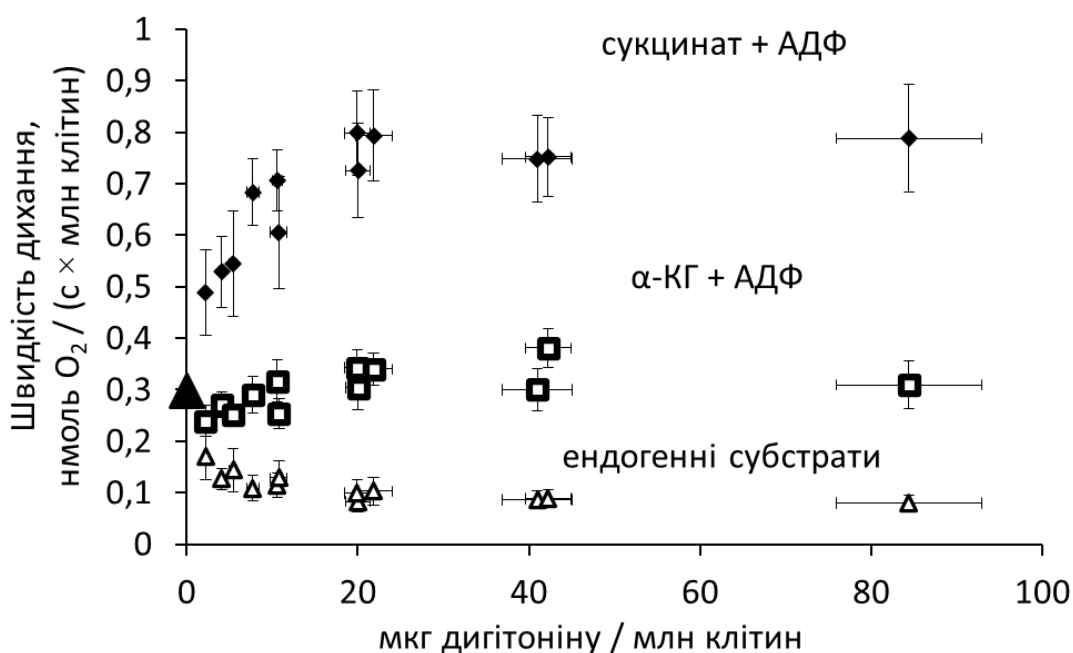


Рис. 3.57. Дихання пермеабілізованих гепатоцитів залежить від співвідношення кількості клітин у суспензії і дигітоніну: [сукцинат] = 0,35 ммоль/л, [α-кетоглутарат] = 1 ммоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л; $n = 5$

У комірку додавали пермеабілізовані гепатоцити, а потім речовини у наступній послідовності: CsA (або нічого у контролі), Ca^{2+} (або нічого у контролі), субстрати окиснення, АДФ, FCCP (рис. 3.58). За окиснення ПГМ зі зростанням $[\text{Ca}^{2+}]$ швидкість АДФ-стимульованого дихання та роз'єданого дихання статистично вірогідно знижувалась (рис. 3.58 Б). За цих умов попереднє внесення CsA запобігало зниженню роз'єданого дихання, але не впливало на пригнічення йонами Ca^{2+} окисного фосфорилування, що відображалось у зниженій швидкості АДФ-стимульованого дихання (рис. 3.58 Г). Ми не виявили

впливу Ca^{2+} на стабільність роз'єданого дихання у цьому експерименті, оскільки не спостерігали його зниження з часом.

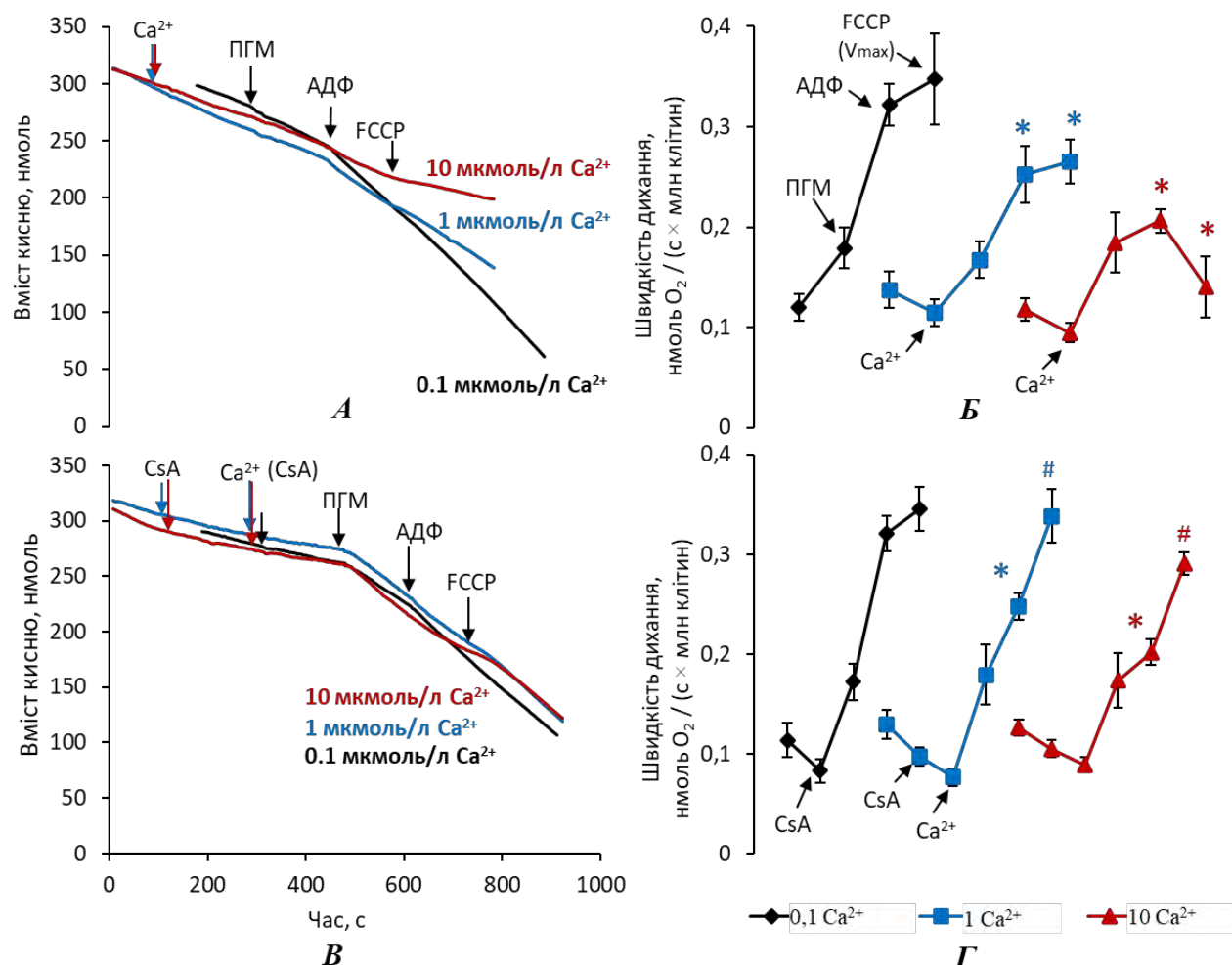


Рис. 3.58. Вплив активації пори перехідної провідності йонами Ca^{2+} на дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення пірувату, глутамату і малату (ПГМ): концентрація Ca^{2+} подана у мкмоль/л, А, В – оригінальні записи, [субстрати] = 5 ммоль/л, [CsA] = 0,5 мкмоль/л, [АДФ] = 750 мкмоль/л, [FCCP] = 0,25 мкмоль/л; статистично вірогідний ефект Ca^{2+} (*) або CsA (#) згідно з ANOVA та post-hoc тестами з $P < 0,05$; $n = 6$

Подібний експеримент було проведено за наявності у середовищі сукцинату (рис. 3.59). Як і раніше, Ca^{2+} пригнічував АДФ-стимульоване та роз'єдане дихання (рис. 3.59 Б). Проте CsA у цьому випадку практично повністю запобігав цьому впливу, навіть на АДФ-стимульоване дихання (рис. 3.59 Г). Іншою відмінністю була двофазна відповідь на FCCP, яка спостерігалась за всіх умов експерименту. Після короткої фази стимуляції ми спостерігали швидке зниження і вихід дихання на плато. Тим не менше, розрахований

коефіцієнт сповільнення не залежав від концентрації Ca^{2+} чи наявності CsA, а отже, активація пори перехідної провідності не впливає на стабільність роз'єданого дихання у пермеабілізованих гепатоцитах, а на його максимальну швидкість.

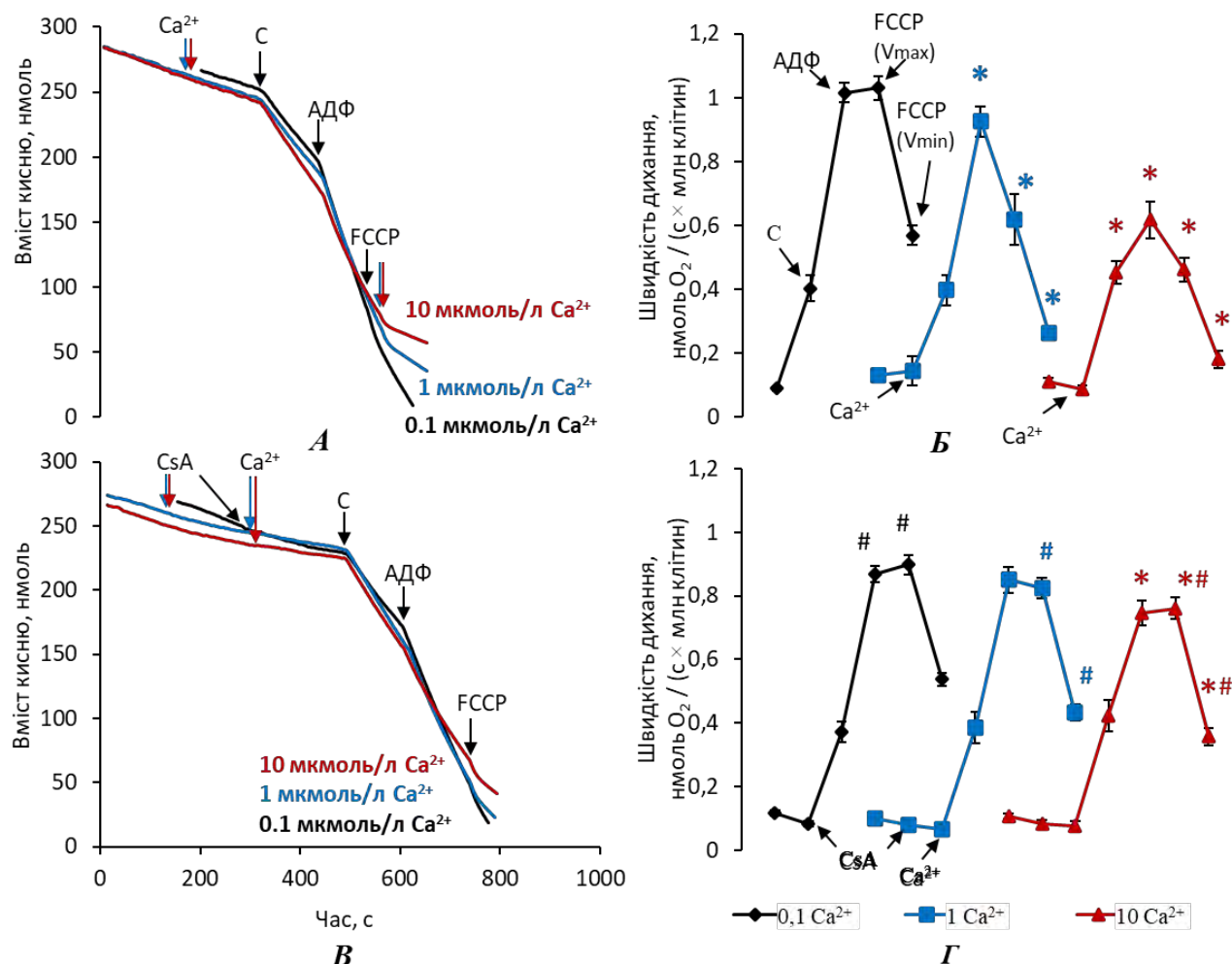


Рис. 3.59. Вплив активації пори перехідної провідності йонами Ca^{2+} на дихання пермеабілізованих гепатоцитів за окиснення сукцинату (C): концентрація Ca^{2+} подана у $\mu\text{моль/л}$, А, В – оригінальні записи, [сукцинат] = 5 ммоль/л , [CsA] = 0,5 $\mu\text{моль/л}$, [АДФ] = 750 $\mu\text{моль/л}$, [FCCP] = 0,25 $\mu\text{моль/л}$; статистично вірогідний ефект Ca^{2+} (*) або CsA (#) згідно з ANOVA та post-hoc тестами з $P < 0,05$; $n = 6$

Відомо, що активація пори перехідної провідності залежить від субстрату окиснення, а наявність у середовищі сукцинату збільшує стійкість мітохондрій до відкривання пори [325] [326]. Крім того, слід очікувати, що CsA за експериментальних умов може лише частково інгібувати пору. Оскільки останні дослідження показують, що пора структурно і функціонально пов'язана із АТФ-

синтазою [249], за її активації слід в першу чергу очікувати пригнічення окисного фосфорилування, а лише потім поступового виходу з мітохондрій НАД та цитохрому с та інгібування роботи дихального ланцюга. На нашу думку, за дії CsA та окиснення комбінації пірувату, глутамату і малату на початковому етапі активація пори пригнічувала окисне фосфорилування, але ще не мала впливу на дихальний ланцюг. З іншої сторони, у розділі 3.6 ми показали, що CsA у вищих концентраціях може інгібувати окисне фосфорилування у ацинарних клітинах підшлункової залози за окиснення НАД-залежних субстратів. Цього, очевидно, не відбувалось за окиснення сукцинату пермеабілізованими гепатоцитами.

Підсумки

Активація мітохондріальної пори перехідної провідності йонами Ca^{2+} призводить до пригнічення окисного фосфорилування та швидкості максимального роз'єданого дихання у пермеабілізованих гепатоцитах.

Основні публікації:

1. Mazur H. M., Merlavsky V. M., Manko B. O., Manko V. V. mPTP opening differently affects electron transport chain and oxidative phosphorylation at succinate and NAD-dependent substrates oxidation in permeabilized rat hepatocytes // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92(4). – P. 14–23.
2. Merlavsky V. M., Manko B. O., Ikkert O. V., Manko V. V. Experimental substantiation of permeabilized hepatocytes model for investigation of mitochondria in situ respiration // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87(6). – P. 113–121.

3.7. Вплив хронічного введення етанолу за високожирової дієти на дихання ізольованих гепатоцитів та панкреатичних ацинусів щурів

Хронічне вживання алкоголю є основною причиною розвитку панкреатиту і алкогольної хвороби у розвинутих країнах [153], [327]. Проте лише незначна частка людей (менше 5 %) з алкоголізмом хворіють на панкреатит [328]. На тваринних моделях, класична дієта Лібер-ДеКарлі (поєднання етанолу з високим

рівнем жирів) спричиняє хворобу печінки [329], але не панкреатит [330], [331], [332]. Саме тому вважають, що для запуску гострого панкреатиту необхідні якісь інші фактори у поєднанні з алкоголем. Хронічне введення етанолу щурам збільшує чутливість робить підшлункову залозу більш чутливою до індукції панкреатиту церулеїном [331] [332]. У розділі 3.6 нами показано, що гострий вплив етанолу у комбінації з ХЦК *in vitro* та *in vivo* може спричиняти порушення морфології та загибель ацинарних клітин підшлункової залози. Незважаючи на значну невідповідність холецистокінінової моделі панкреатиту механізмам патогенезу у людини, ці експерименти доводять, що вплив етанолу спричиняє накопичення дефектів у клітинах підшлункової залози.

Порушення метаболізму жирних кислот може впливати на розвиток гострого панкреатиту. Так, у пацієнтів за автосомною рецесивною недостатністю ліпопротеїніпази часто виникають повторювані епізоди панкреатиту [170]. Продукти неокисного метаболізму етанолу, а саме етилові естери жирних кислот, накопичуються у тканині підшлункової залози у людей, що померли від алкогольної інтоксикації [166]. Дослідження на ізольованих ацинарних клітинах і тваринних моделях підтвердили здатність цих метаболітів індукувати панкреатит [162], [163], [333], [334]. Запропонований механізм дії етилових естерів включає тривале підвищення Ca^{2+} у цитозолі, перевантаження мітохондрій Ca^{2+} їх деполяризацію, зниження рівнів НАДН та АТФ, що призводить до загибелі клітин [163], [334], [335]. Ушкодження мітохондрій також спостерігають у підшлунковій залозі пацієнтів з панкреатитом [59]. Однак досі не зрозуміло, чи етанол саме через природній синтез естерів жирних кислот або будь-яким іншим чином спричиняє ушкодження мітохондрій *in vivo*.

У печінці мітохондріальне дихання відіграє важливу роль у метаболізмі етанолу завдяки регенерації НАД⁺ – кофактору алкогольдегідрогенази та альдегідредгідрогенази. На моделях мишей показано, що гепатоцити адаптуються до хронічної дії етанолу шляхом підвищення експресії білків дихального ланцюга та збільшення кількості мітохондрій [134]. На сьогодні не відомо, чи мітохондрії підшлункової залози адаптуються до хронічного вживання алкоголю.

Тому метою наступних експериментів було дослідити вплив хронічного введення етанолу щурам у комбінації з високожировою дієтою на адаптаційну здатність мітохонрій ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів.

* * *

Для дослідження хронічного впливу етанолу за високожирової дієти 30 статевозрілих щурів було поділено на 2 групи. Всі тварини перебували на високожировій дієті впродовж 14 днів. Дослідній групі («Етанол») вводили розчин етанолу (див. розділ «Матеріали та методи»). Впродовж експерименту три тварини із групи «Етанол» загинули, вочевидь, внаслідок алкогольної інтоксикації: одна на четвертий день та ще дві на сьомий день експерименту. Тому до цієї групи було взято додатково ще три тварини. Стан тварин та їх вагу оцінювали щоденно. Початкова вага тварин не відрізнялась між групами і становила у контролі – 272 ± 5 г, а у групі «Етанол» – 273 ± 4 г (рис. 3.60).

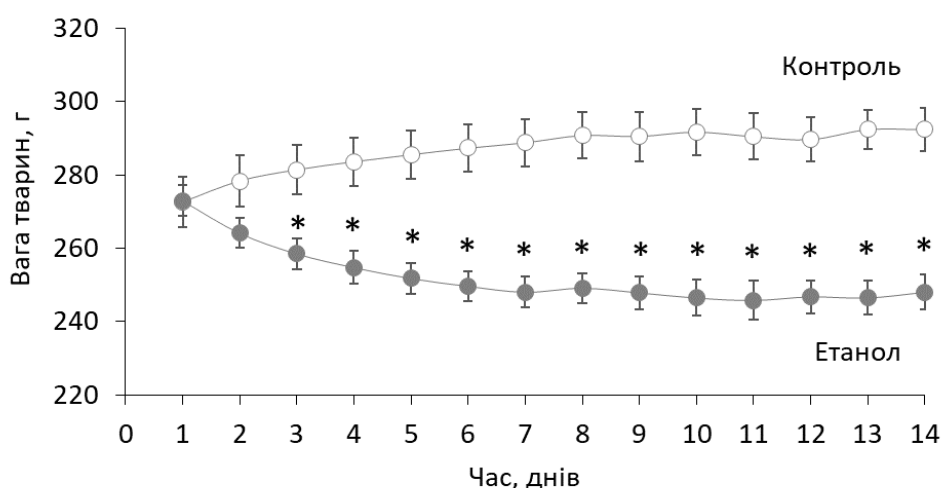


Рис. 3.60. Динаміка змін ваги щурів за хронічного введення етанолу за високожирової дієти; у контролі тварини перебували на дієті з вмістом 35 % свинячого смальцю (за калоріями); * – статистично вірогідна різниця з $P < 0.05$, $n = 15$

Виявилось, що у групі «Етанол» впродовж перших 5 днів тварини швидко втрачали вагу (рис. 3.60). Це відповідало результатам досліджень інших авторів [134]. Натомість контрольні тварини поступово набирали вагу впродовж перших 7 днів, після чого різниця у вазі між групами стабілізувалась (рис. 3.60). Загалом, впродовж експерименту вага контрольних тварин зросла на 7,28%, а у групі «Етанол» знизилась на 9,15%.

На 15 день експерименту тварин умертвляли і отримували препарати ізольованих панкреатичних ацинусів та гепатоцитів. Досліджували лише вдало отримані препарати клітин з достатнім рівнем життєздатності. Було отримано 13 якісних препаратів ацинусів і 10 препаратів гепатоцитів із контрольних тварин, а із тварин групи «Етанол» 14 та 12 відповідно.

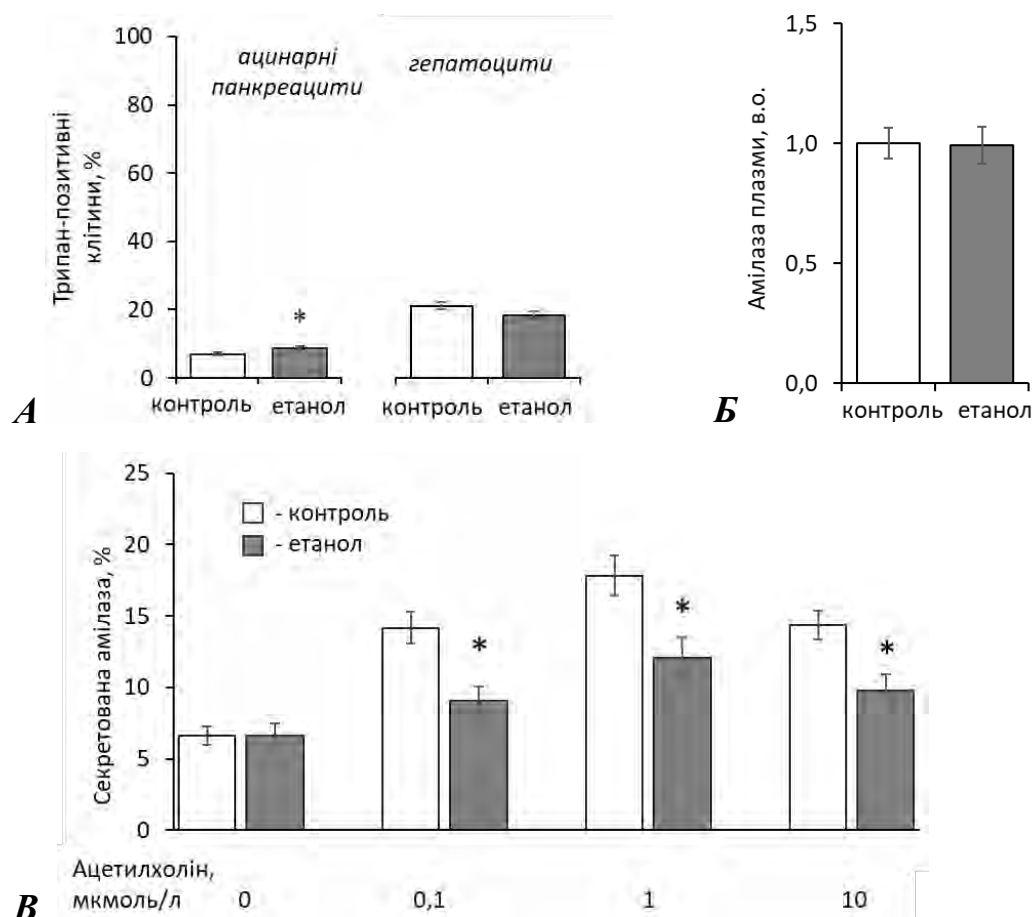
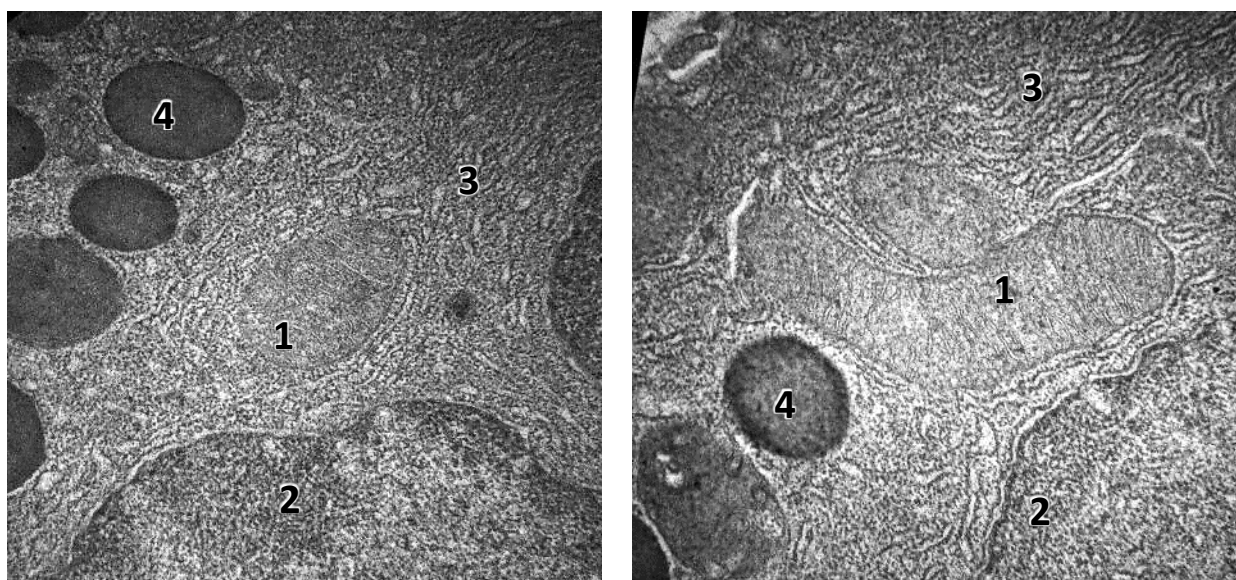


Рис. 3.61. Життєздатність ізольованих клітин (А), активність амілази у плазмі щурів (Б) та у секреті ізольованих панкреатичних ацинусів щурів на високожировій дієті за хронічного введення етанолу: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 15$ (Б), 10–12 (А, гепатоцити) або 13–14 (А, В, панкреатичні ацинуси)

Етанол не впливав на життєздатність ізольованих гепатоцитів (рис. 3.61 А). Встановлено незначне, однак статистично вірогідне зростання частки трипан-позитивних ацинарних клітин у групі «Етанол» ($8,6 \pm 0,6$ %) порівняно із контролем ($7,1 \pm 0,4$ %). Окрім цього, етанол не підвищував активності амілази у плазмі тварин на 15 день експерименту, що вказує на відсутність ушкодження підшлункової залози (рис. 3.61 Б). Очевидно, деяке зниження життєздатності ацинарних клітин відбулось вже під час виділення, а не прижиттєво.

Для оцінки функціональної активності ізольованих панкреатичних ацинусів досліджували вивільнення ними амілази. Секрецію стимулювали ацетилхоліном (0,1, 1 і 10 мкмоль/л) впродовж 30 хв. Базальне нестимульоване вивільнення було низьким (близько 6 % від загального вмісту амілази у клітинах) в препаратах ацинусів із обох груп тварин (рис. 3,61 В). У контрольних тварин у відповідь на стимуляцію ацетилхоліном спостерігалась типова секреторна відповідь з піком активності амілази за 1 мкмоль/л ацетилхоліну ($17,8 \pm 1,38$ % від загального вмісту амілази). У ацинусів ізольованих з тварин, яким вводили етанол, секреторна відповідь на ацетилхолін була статистично вірогідно нижчою за всіх його концентрацій. Піком секреції за 1 мкмоль/л ацетилхоліну становив лише $12,1 \pm 1,45$ % амілази (рис. 3.61 В). Подібні результати отримані Bragado та ін. [336] у більш тривалому 6-місячному дослідженні.



А

Б

Рис. 3.62. Електронні мікрофотографії ацинарних клітин підшлункової залози у контролі (А) та за хронічного введення етанолу (Б): 1 – мітохондрії, 2 – ядро, 3 – ендоплазматичний ретикулум, 4 – секреторні везикули; збільшення 10000 разів

Електронна мікроскопія препаратів підшлункової залози показала нормальну ультраструктуру ендоплазматичного ретикулума, мітохондрій та секреторних гранул в обох групах тварин (рис. 3.62). Також не виявлено зниження кількості секреторних гранул. Очевидно, така короточасна тривалість введення етанолу суттєво не впливає на морфологію ацинарних клітин. Тому

зниження секреторної відповіді ізольованими ацинусами не пов'язане з порушенням функціонування ендоплазматичного ретикулула чи недостатньою кількістю секрету у клітинах. Можливо, це є наслідком порушення сигнальних шляхів, що залучені у регуляції секреції.

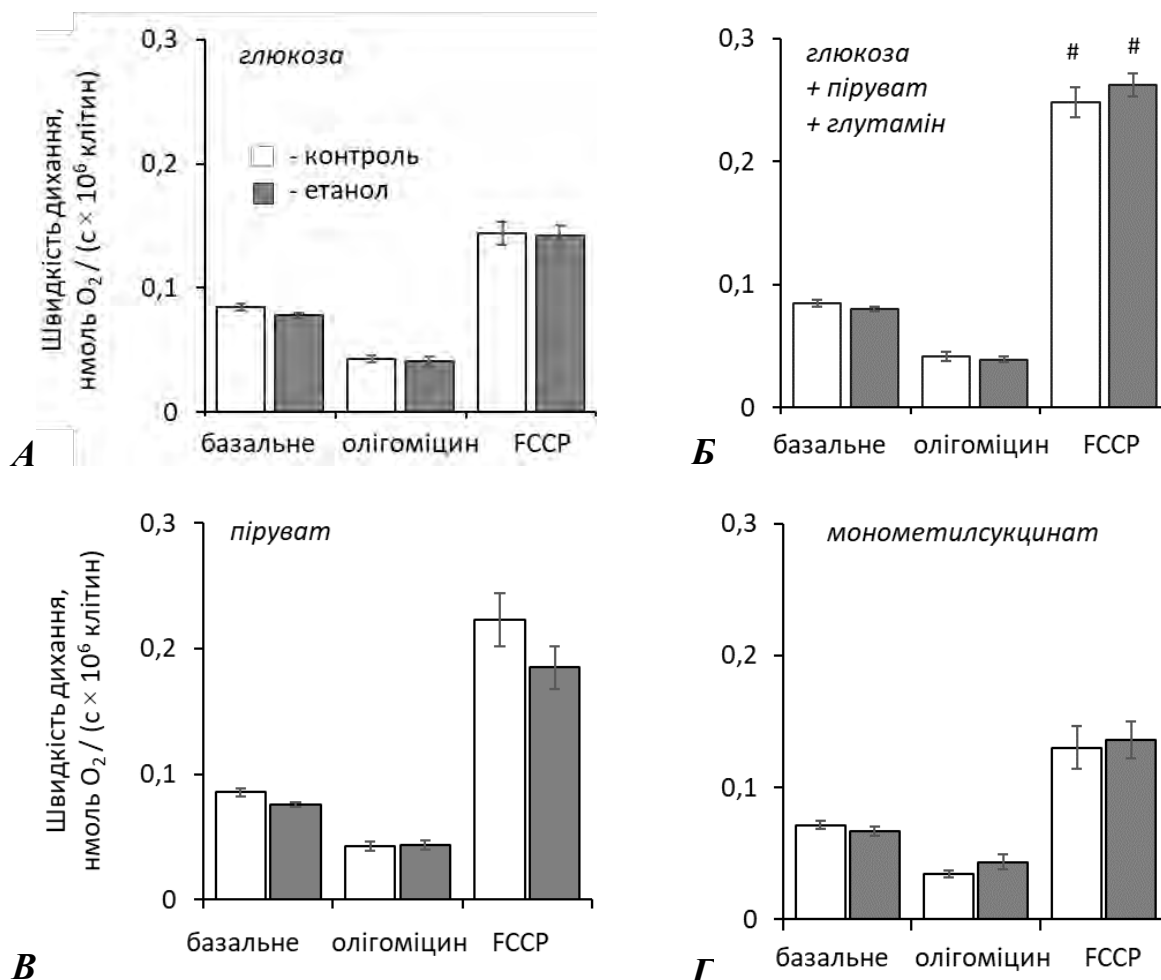


Рис. 3.63. Дихання панкреатичних ацинусів щурів, що перебували на високожировій дієті та щурів, яким додатково вводили розчин етанолу впродовж 14 днів за окиснення: А – глюкози (10 ммоль/л), Б – суміші глюкози, пірувату (2 ммоль/л) та глутаміну (2 ммоль/л), В – пірувату, Г – монометилсукцинату; # – статистично вірогідна різниця щодо відповідної проби за окиснення глюкози з $P < 0,05$, $n = 13$ (контроль) чи 14 (етанол)

Клітинне дихання досліджували за наявності різних субстратів окиснення у середовищі (рис. 3.63). Як і у попередніх експериментах, саме за суміші глюкози, пірувату та глутаміну було виявлено найвищу швидкість роз'єданого дихання (рис. 3.63 Б). Варто зазначити, що обмеження субстратного забезпечення лише піруватом чи монометилсукцинатом не дало змоги мітохондріям підтримувати вищий рівень FCCP-стимульованого дихання, ніж за

окиснення глюкози. У контролі значною була дисперсія даних швидкості роз'єданого дихання за наявності у середовищі лише пірувату. Це ще раз підтверджує важливість наявності глюкози у середовищі для забезпечення мітохондріального дихання ацинарних клітин підшлункової залози щурів.

Олігоміцин пригнічував дихання ацинусів приблизно вдвічі за всіх досліджуваних субстратів (рис. 3.63), що підтверджує нормальний стан окисного фосфорилування. У тварин із групи «Етанол» не виявлено змін базального, олігоміцин-нечутливого чи максимального дихання ацинарних клітин (рис. 3.63).

Результати дослідження гепатоцитів показали, що лише піруват, але не глюкоза чи монометилсукцинат статистично вірогідно збільшував базальне та максимальне дихання (рис. 3.64). У попередніх експериментах монометилсукцинат суттєво збільшував дихання (розділ 3.9). Ми вважаємо, що саме вплив високожирової дієти є причиною зниження утилізації сукцинату мітохондріями печінки, оскільки відомо, що у тварин з експериментальною неалкогольною жировою хворобою печінки відбувається зниження швидкості окиснення сукцинату [337]. Тим не менше, у наступній серії досліджень (розділ 3.13) ми не підтвердили цього припущення.

На відміну від ацинарних панкреацитів, введення етанолу щурам приводило до суттєвого зростання швидкості дихання ізольованих гепатоцитів (рис. 3.64). Примітно, швидкість базального і максимального роз'єданого дихання зростала рівномірно за всіх умов експерименту: без субстратів – на 43 і 58%, за окиснення глюкози – на 37 і 57%, пірувату – на 37 і 35%, монометилсукцинату – на 45 і 48%.

Було також проведено аналіз параметрів адаптаційної здатності мітохондрій, що характеризують стабільність роз'єданого дихання: оптимальна концентрація протонофора та коефіцієнт стабільності (табл. 3.20). Введення етанолу не впливало на ці параметри дихання ацинарних панкреацитів. Натомість, у гепатоцитах коефіцієнти стабільності статистично вірогідно знижувались за всіх експериментальних умов, крім окиснення пірувату (табл.

3.20). Отже, хоча печінка і адаптується до етанолу через підвищення максимальної швидкості роз'єданого дихання, тривале підтримання такого високого рівня окиснення можливе лише за наявності зовнішнього джерела пірувату.

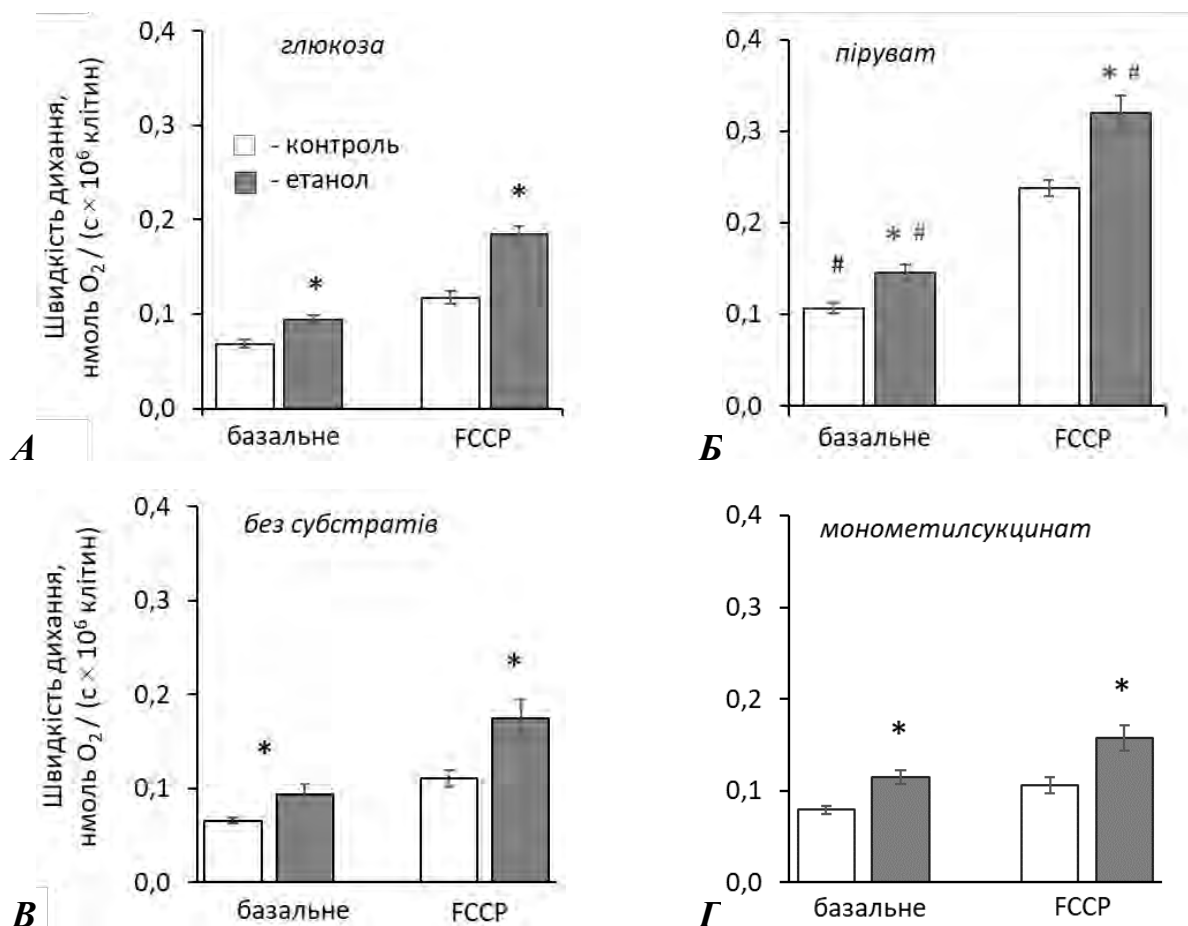


Рис. 3.64. Дихання ізолюваних гепатоцитів щурів, що перебували на високожировій дієті та щурів, яким додатково вводили розчин етанолу впродовж 14 днів за окиснення: А – глюкози (10 ммоль/л), Б – пірувату (2 ммоль/л), В – без субстратів, Г – монометилсукцинату (10 ммоль/л); * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, # – щодо відповідної проби без субстратів з $P < 0,05$, $n = 10$ (контроль) чи 12 (етанол)

Подібну адаптацію мітохондрій печінки до 2–4 тижнів введення етанолу було виявлено у мишей [134]. Проте, у щурів хронічне введення етанолу (впродовж 6 тижнів) призводило до зниження швидкості дихання ізолюваних мітохондрій печінки у Стані 3 за Чансом за відсутності змін рівня білків дихального ланцюга [14]. Цю різницю у впливі етанолу в нашому дослідженні можна пояснити його коротшою тривалістю та/або вищою дозою етанолу. Крім того, кількість мітохондрій на одну клітину, яка зростала у мишей, не було

досліджено у щурів. Тому, зважаючи на те, що дихання гепатоцитів у нашому дослідженні зростало рівномірно незалежно від субстрату окиснення, ми припускаємо, що двотижневе введення етанолу спричиняє підвищенню кількості мітохондрій у печінці. Слід зазначити, що хоча було доведено ушкодження мітохондрій печінки у пацієнтів з історією тривалого зловживання алкоголем [12] наразі немає доказів короткотривалого адаптивного підвищення мітохондріальної окисної здатності у людей.

Таблиця 3.20

Параметри адаптаційної здатності ацинарних панкреатитів та гепатоцитів із контрольних щурів, що перебували на високожировій дієті та щурів, яким додатково вводили розчин етанолу впродовж 14 днів

Клітини	Група тварин	Субстрат	Оптимальна [FCCP]	Коефіцієнт стабільності
Панкреацити	Контроль	Глюкоза	$1,04 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,04$
		Піруват	$1,21 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,07$
		Глю + пір + глут	$1,63 \pm 0,07 *$	$1,38 \pm 0,05 *$
		Монометилсукцинат	$1,43 \pm 0,15 *$	$1,16 \pm 0,08$
	Етанол	Глюкоза	$1,07 \pm 0,10$	$0,91 \pm 0,05$
		Піруват	$1,31 \pm 0,07$	$1,11 \pm 0,08$
		Глю + пір + глут	$1,61 \pm 0,06 *$	$1,41 \pm 0,03 *$
		Монометилсукцинат	$1,50 \pm 0,15 *$	$1,21 \pm 0,03$
Гепатоцити	Контроль	Без субстратів	$\leq 0,25$	$0,51 \pm 0,03$
		Глюкоза	$\leq 0,25$	$0,51 \pm 0,02$
		Піруват	$0,32 \pm 0,03$	$0,71 \pm 0,04 *$
		Монометилсукцинат	$\leq 0,25$	$0,61 \pm 0,04$
	Етанол	Без субстратів	$\leq 0,25$	$0,45 \pm 0,02 \#$
		Глюкоза	$\leq 0,25$	$0,43 \pm 0,02 \#$
		Піруват	$0,36 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,03 *$
		Монометилсукцинат	$\leq 0,25$	$0,49 \pm 0,02 \#$

* – статистично вірогідна різниця порівняно із глюкозою (панкреацити) чи дослідом без субстратів (гепатоцити) з $P < 0,05$, # – $P < 0,05$ порівняно із контрольною групою тварин, коефіцієнт стабільності визначали як співвідношення швидкостей дихання за перших та останніх двох концентрацій FCCP

Наскільки нам відомо, це перше дослідження впливу хронічного введення етанолу щурам на дихання ацинарних клітин підшлункової залози. Ми показали, що етанол не спричиняє ушкодження мітохондрій у підшлунковій залозі.

Важливим аспектом цього дослідження була спроба моделювати природні умови для синтезу етилових естерів жирних кислот, що є токсичними для мітохондрій *in vitro* [334]. Хоча в іншій серії досліджень (розділ 3.13) ми показали, що семитижнева високожирова дієта суттєво не змінює ліпідного складу плазми крові у щурів натще, рівень ліпідів під час абсорбційного стану тварин мав би зростати. Для перевірки, чи за умов нашого експерименту зростає утворення етилових естерів жирних кислот необхідні додаткові дослідження. В будь-якому випадку, доза алкоголю була досить високою, щоб спричинити 20%-ну летальність та суттєве зниження маси тіла тварин. Це суттєво погіршило секреторну функцію підшлункової залози. За таких умов відсутність змін мітохондріальної адаптаційної здатності виглядає як сильний аргумент проти гіпотези, що ушкодження мітохондрій етанолом може бути причиною алкогольно-індукованого панкреатиту.

Підсумки

Хронічне введення алкоголю щурам на тлі високожирової дієти спричиняє інтенсифікацію мітохондріального дихання гепатоцитів, пригнічує секреторну функцію ацинарних клітин підшлункової залози, однак не впливає на їх мітохондріальне дихання.

Основні публікації:

1. Bilonoha O.O., Mazur H.M., Manko B.O., Kulachkovsky O.R., Manko V.V. Effect of long-term ethanol consumption and a high-fat diet on mitochondrial respiration in rat pancreatic acinar cells and hepatocytes // Ukr.Biochem .J. – 2024. – Vol. 96, Is. 4. – P. 25–32.

3.8. Вплив раціонів харчування з високим вмістом жирів та цукру на мітохондріальні функції підшлункової залози, печінки

Захворювання печінки і підшлункової залози у значній мірі пов'язані з порушенням харчування та результиуючим ожирінням. Збільшення кількості жирової тканини у підшлунковій залозі може бути фактором ризику розвитку гострого і хронічного панкреатиту, раку підшлункової залози та діабету 2 типу [8]. Крім того, пацієнти з недостатністю ліпопротеїн ліпази мають високий рівень ліпідів у крові та часту захворюваність на панкреатит [338]. Вільні жирні кислоти *in vitro* чинять негативний вплив на синтез АТФ мітохондріями і життєздатність ацинарних панкреатитів [141], [163]. На моделях щурів довготривала високожирова дієта спричиняє ожиріння, гіперліпідемію, накопичення ліпідних крапель у тканині підшлункової залози та деякі ознаки ушкодження залози [339], [340]. Проте досі не досліджено впливу харчових раціонів з високим вмістом жирів чи цукру на мітохондрії підшлункової залози. З іншої сторони, гіперліпідемія внаслідок порушення харчування та ожиріння є основною причиною розвитку неалкогольної хвороби печінки [7].

Метою цього хронічного експерименту було дослідити вплив короткотривалого згодовування щурам корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або жиру і цукру (ВЖВЦ) на функціонування мітохондрій підшлункової залози і печінки.

* * *

Масу тварин вимірювали впродовж усіх 7 тижнів експерименту. Однак маса тіла тварин не відрізнялась між трьома групами тварин впродовж всіх днів експерименту (рис. 3.65 А). Ці результати відповідають даним дослідження, у якому 7-тижневе годування статевозрілих щурів кормом з високим вмістом жиру (50% калорій) не впливало на їх масу [341]. У більш тривалому дослідженні (20 тижнів) на тваринах, яких переводили на високожирову дієту з молодшого віку (масою до 200 г) спостерігали зростання кінцевої маси тіла [340]. Проте є дослідження, у яких лише 4-тижнева дієта з високим вмістом жиру спричиняє

значне ожиріння у щурів [342]. У нашому експерименті встановлено, що у тварин, що перебували на ВЖВЦ харчуванні зростала маса вісцерального жиру (рис. 3.65 Б), але не печінки (рис. 3.65 В).

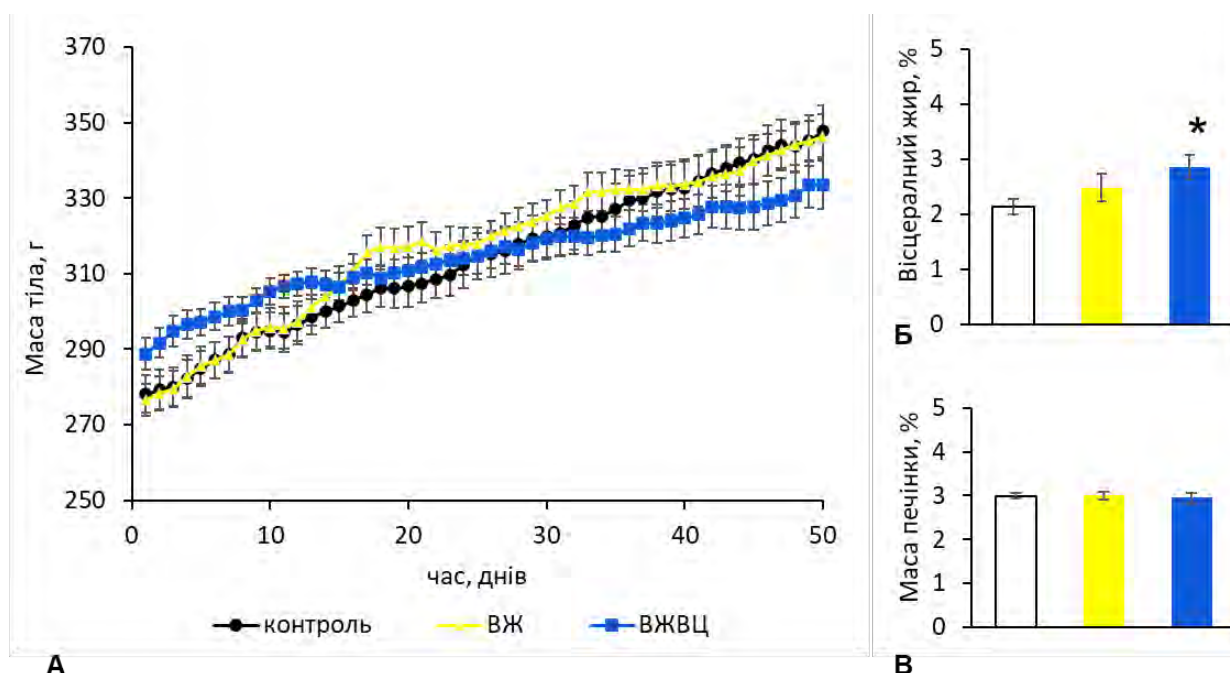


Рис. 3.65. Вплив раціонів з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ) на масу щурів (А), частку маси вісцерального жиру (Б) і печінки (В) від маси тіла тварин: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю, $n = 10$ (у кожній групі)

У щурів з груп ВЖ та ВЖВЦ відбувалось статистично вірогідне зростання рівня загального холестеролу плазми крові (рис. 3.66 А). Однак незважаючи на це незначне зростання (~20%), рівень холестеролу все ще перебував у межах норми. Ці зміни також не супроводжувались зростанням ліпопротеїдів низької чи високої щільності (рис. 3.66 Б,Г). Концентрація глюкози та тригліцеридів плазми були в межах норми у всіх групах тварин (рис. 3.66 В, Д). Ці результати відповідають даним іншого 7-тижневого дослідження[341], на противагу більш тривалим (20 тижнів) експериментам з високожировою [340] чи високоцукровою дієтами [343].

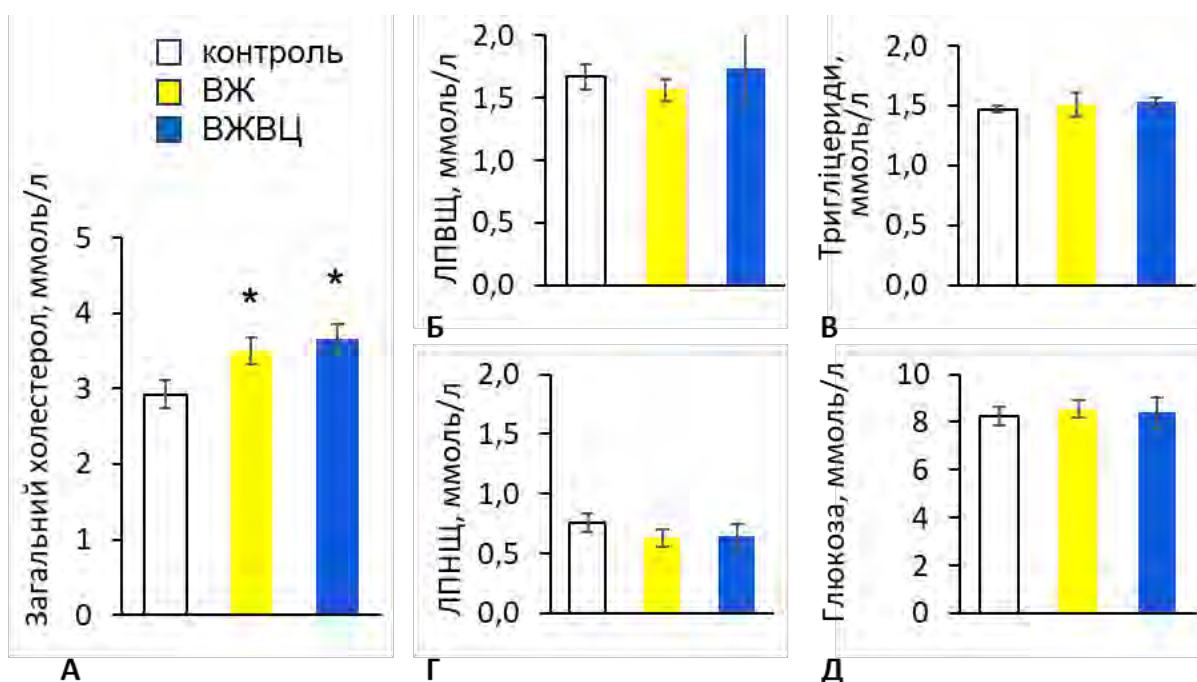


Рис. 3.66. Концентрації загального холестеролу (А), ліпопротеїнів високої (Б) і низької (Г) щільності, тригліцеридів (В) і глюкози (Д) у плазмі крові щурів після згодовування корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ): * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 10$

Ми дослідили дихання ізольованих мітохондрій печінки щурів на 50-й день експерименту. Висока якість отриманих препаратів мітохондрій була підтверджена вищими за 4 коефіцієнтами дихального контролю (рис. 3.67 Г). Як і в попередньому подібному дослідженні [341], ми не виявили жодного впливу високого вмісту жиру у кормі на дихання мітохондрій (рис. 3.67). Більше того, у щурів з групи ВЖВЦ також не спостерігалось змін дихання та окисного фосфорилування.

Цікавим аспектом дихання мітохондрій печінки за окиснення сукцинату була двофазна відповідь на протонофор (спочатку прискорення, а потім сповільнення дихання), подібно до експерименту на пермеабілізованих гепатоцитах (розділ 3.11). Причиною цього може бути пригнічення транспорту сукцинату в мітохондрії за присутності протонофорів [344].

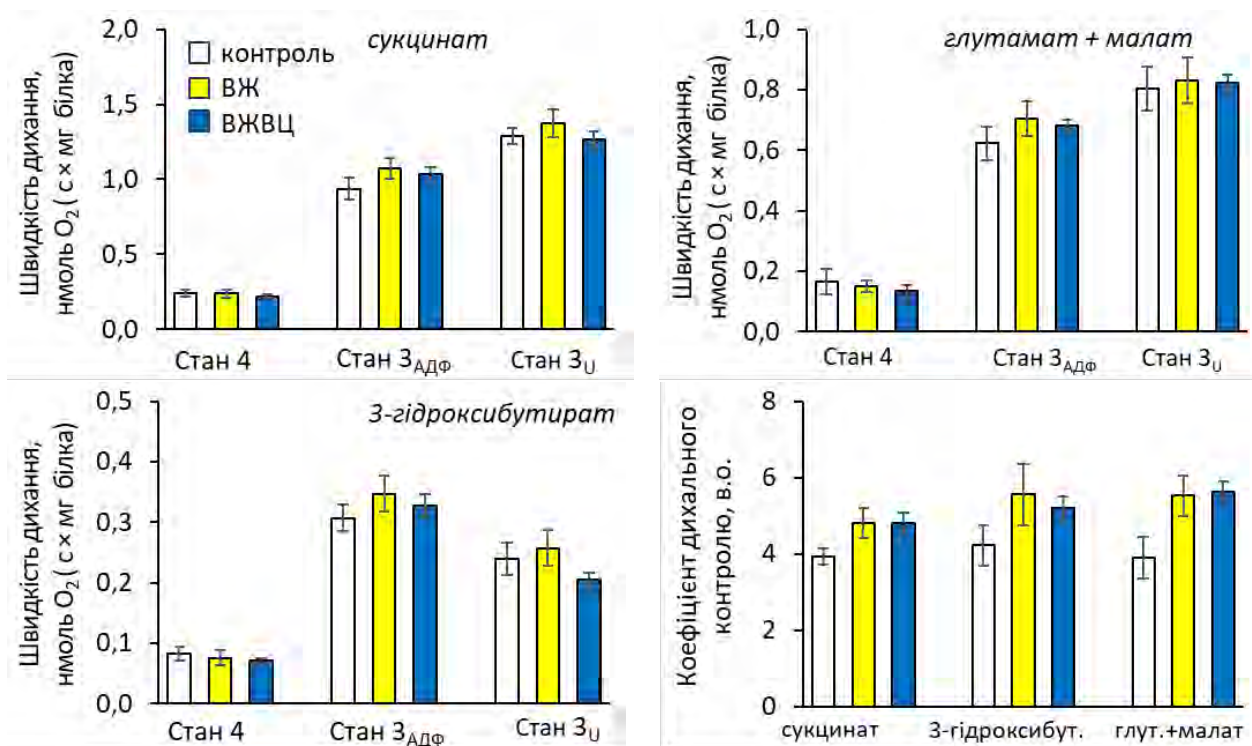


Рис. 3.67. Дихання мітохондрій печінки щурів після згодовування корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ), $n = 10$

У щурів, у яких в раціоні був підвищений вміст жирів, базальне дихання ізольованих панкреатичних ацинусів знижувалось (на близько 15%) незалежно від субстрату окиснення (рис. 3.68). У іншій експериментальній групі (ВЖВЦ) таких змін не спостерігали. Не було також підтверджено статистично вірогідного зниження максимальної швидкості роз'єданого дихання (рис. 3.68 Б). Однак для всіх трьох груп доведено зростання роз'єданого дихання завдяки присутності 3-гідроксибутирату (2 ммоль/л) у середовищі.

У цьому експерименті ми не виявили змін флуоресценції TMRM (100 нмоль/л) – ні за різних субстратів у середовищі, ні внаслідок впливу раціону харчування тварин (рис. 3.69 А). У розділах 3.6 та 3.10 ми виявили, що флуоресценція і накопичення родамину 123 зростала за присутності у середовищі пірувату чи глутаміну, але це не обов'язково означало його більшу концентрацію в мітохондріях. В наших умовах розділити мітохондріальний та цитозольний сигнали було неможливо. Нечутливість флуоресценції барвника TMRM до субстрату окиснення та значне її придушення протонофором свідчить про більшу специфічність його сигналу саме до мембранного потенціалу мітохондрій.

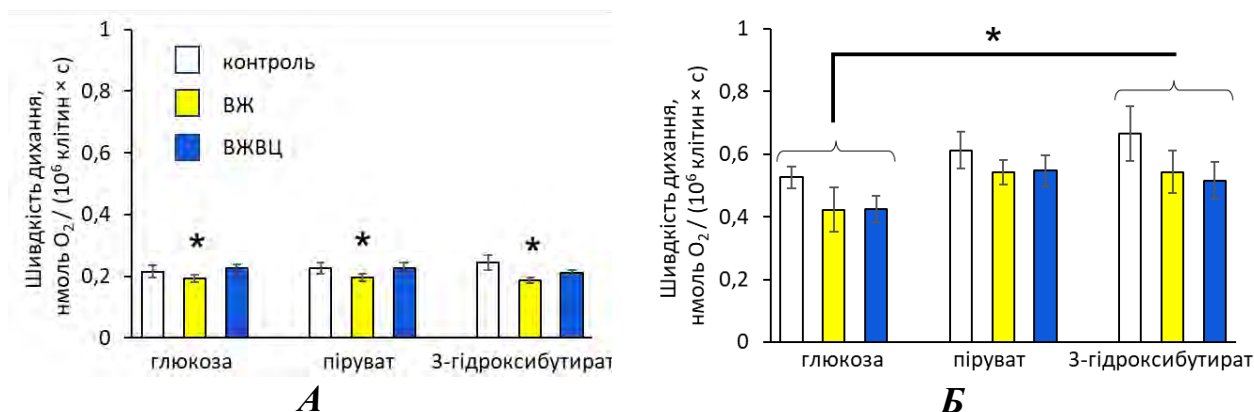


Рис. 3.68. Дихання панкреатичних ацинусів щурів після згодовування корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ): А – базальне дихання, Б – максимальне роз'єднане дихання, * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 5-10$

Як протонатор FCCP, так і інгібітор гліколізу бромопіруват (500 мкмоль/л) суттєво знижували автофлуоресценції НАД(Ф)Н панкреатичних ацинусів (рис. 3.69 Б). 3-гідроксибутират, навпаки, підвищував рівень відновлення НАД(Ф), а присутність пірувату частково запобігала дії FCCP. Всі ці зміни були подібними у трьох групах тварин, а статистично вірогідного впливу жирів чи цукру на автофлуоресценцію НАД(Ф)Н не було виявлено (рис. 3.69 Б).

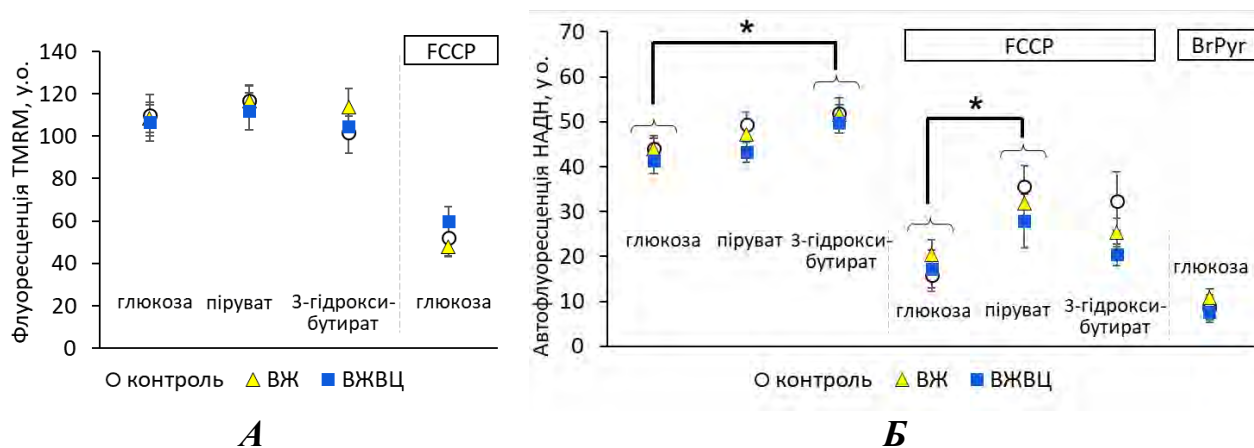


Рис. 3.69. Флуоресценція TMRM і НАД(Ф)Н панкреатичних ацинусів щурів, згодовування корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ): * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, $n = 10$

Отже, в сукупності ці параметри мітохондріальних функцій підшлункової залози не вказують на якісь суттєві зміни у мітохондріях підшлункової залози щурів за досліджених раціонів. Чи пов'язане деяке незначне зниження базального споживання кисню з можливим жировим переродженням залози, яке виявлене у значно тривалішому дослідженні, залишається питанням для

подальших досліджень. Ми, однак, зауважили дещо більший вміст жирової тканини та жирових капель на поверхні розчину на різних етапах виділення панкреатичних ацинусів у групі тварин, що перебували на високожировій дієті.

Підсумки

Короткотривале перебування щурів на раціонах з підвищеним вмістом жирів або жирів і цукру не призводить до ожиріння і не впливає негативно на мітохондрії печінки і підшлункової залози.

Основні публікації:

1. Manko B.V., Kozopas N.M., Mazur H.M., Voityk A.M., **Manko B.O.**, Manko V.V. Bioenergetic functions of mitochondria in liver, pancreatic acinar cells, and sperm cells of rats fed short-term high-fat or high-fat high-sugar diets // Ukr. Biochem. J. – 2023. – Vol. 95, Is. 5. – P. 51–60.

УЗАГАЛЬНЕННЯ І КРИТИЧНИЙ АНАЛІЗ РЕЗУЛЬТАТІВ

Одним із основних результатів цих досліджень було розширення розуміння адаптаційної здатності мітохондрій: окрім стандартного параметру максимальної швидкості роз'єданого дихання було запропоновано також визначати стабільність цього дихання. Але перед тим, як детально розглянути цей новий параметр, необхідно переосмислити значення максимальної швидкості роз'єданого дихання. Зазвичай, цей показник використовують як міру максимальної роботи дихального ланцюга мітохондрій [345], [346]. Проте у світлі наших даних та інших досліджень [26], [347] не можна сказати, що максимальна швидкість споживання кисню за умов деполяризації мітохондрій протонофором обмежується саме роботою дихального ланцюга. Вже на рівні мітохондрій можна виділити окремі три функціональні компоненти, що незалежно впливають на роз'єдане дихання: транспорт субстратів у мітохондрії, їх окиснення у циклі Кребса і власне транспорт відновлюваних еквівалентів дихальним ланцюгом. У ранніх дослідженнях на мітохондріях встановлено, що у цьому стані контроль над диханням здійснюється цими різними ланками залежно від експериментальних умов [347]. На рівні клітин необхідно додати як мінімум процеси транспорту субстратів через плазматичну мембрану та їх окиснення у цитозолі (гліколіз, цитозольні дегірогенази, човниковий механізм транспорту відновлювальних еквівалентів у мітохондрії тощо).

Візьмемо до уваги два факти із наших досліджень: 1) максимальна швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози і гепатоцитів суттєво залежала від субстрату окиснення; 2) перед дослідженням дихання клітини преінкубували з субстратами для забезпечення їх достатнього накопичення у клітинах. З цього можна зробити висновок, що максимальна швидкість роз'єданого дихання відображає максимальну (короткочасну) здатність мітохондрій окиснювати той пул субстратів, які накопичені в клітині. Це, очевидно, певний коктейль із ендогенних субстратів і метаболітів досліджуваного екзогенного субстрату, а не лише останній. Вичерпання цього

пулу готових до швидкого окиснення субстратів і затримка у транспорті та метаболізмі нових субстратів призводять до швидкої втрати стабільності роз'єданого дихання. Слід наголосити, що максимальна потенційна активність дихального ланцюга чи його окремих компонентів може значно перевищувати зареєстровану максимальну швидкість роз'єданого дихання, і є, таким чином, методологічно недоступним параметром за збереження інтактності клітини. Проте фізіологічне значення має функціонування цілої системи мітохондріального окиснення у живій клітині, а не її окремих компонентів за нефізіологічних експериментальних умов.

Стабільність роз'єданого дихання характеризує здатність мітохондрій підтримувати його високу швидкість тривалий час і за високих концентрацій протонофора. Зважаючи на те, що ми вперше запропонували цей параметр, слід дати відповіді на запитання: 1) від чого залежить стабільність роз'єданого дихання і які механізми зниження (нестабільності) роз'єданого дихання? 2) чи покращує цей показник оцінку адаптаційної здатності мітохондрій? 3) чи є він універсальним або характерним для мітохондріального дихання лише в деяких випадках (клітини деяких тканин, групи клітин, ізольовані клітини, пермеабілізовані клітини, ізольовані мітохондрії) або лише за певних експериментальних умов (середовище інкубації, тип приладу, спосіб перемішування суспензії тощо)? 4) як найкраще виміряти і математично виразити стабільність роз'єданого дихання? і 5) які перспективи подальших досліджень стабільності роз'єданого дихання?

Підсумкова схема основних змін максимальної швидкості і стабільності роз'єданого дихання, виявлених у нашій роботі, представлена на рис. 4.1. У відповідь на запитання 1 можна з впевненістю сказати, що поки що єдиним фактором, який підвищує стабільність роз'єданого дихання, є наявність додаткових субстратів окиснення у середовищі. Натомість, зниження стабільності спостерігається в основному за певних неоптимальних умов для клітин: виділення гепатоцитів шляхом перфузії печінки *in vitro* з можливою гіпоксією, отримання менш життєздатних препаратів панкреатичних ацинусів чи

додавання до середовища інкубації малату або ізоцитрату. Більш нетиповими випадками зниження стабільності роз'єданого дихання є дія NH_4Cl *in vitro* та хронічне введення етанолу щурам. Проте в обох випадках зміни хоч і були статистично вірогідними, але досить незначними (~ 20%).

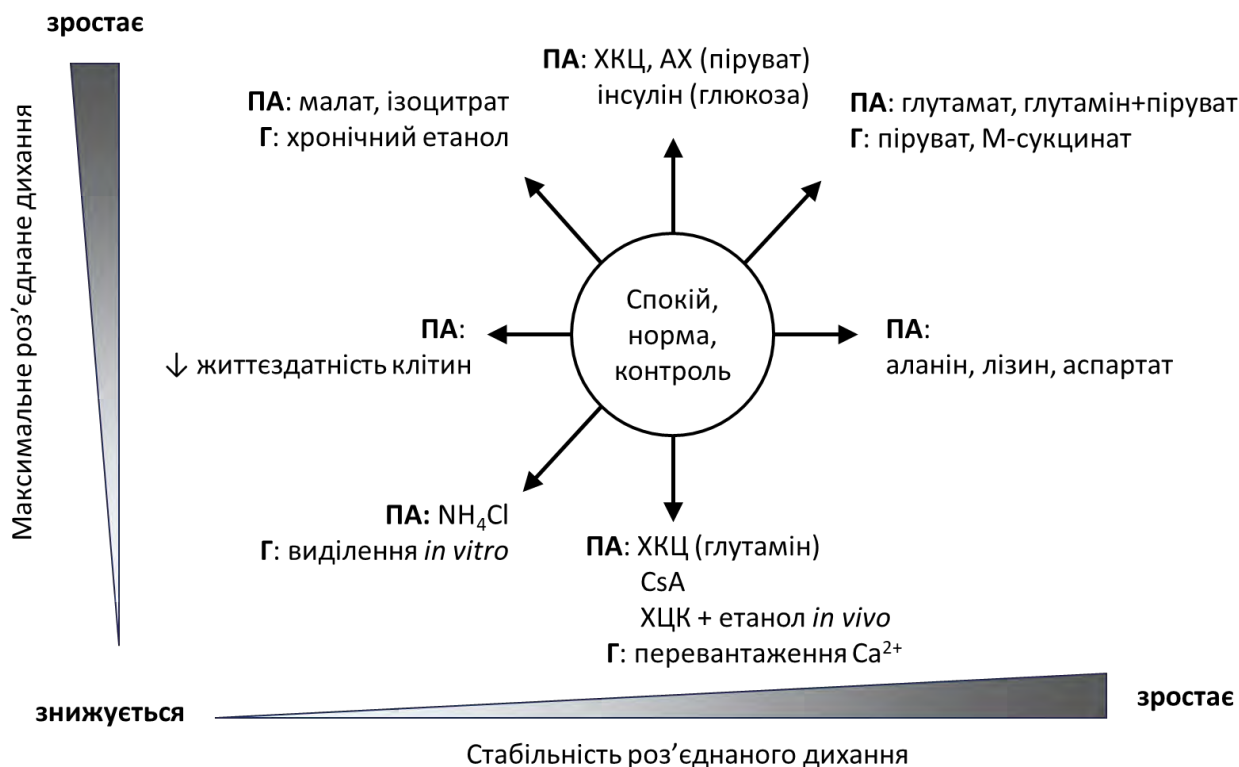


Рис. 4.1. Підсумки виявлених ефектів на максимальну швидкість (вісь Y) і стабільність (вісь X) роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів (ПА) і гепатоцитів (Г)

Механізми зниження роз'єданого дихання вже були частково обговорені у попередніх розділах, однак важливі деталі деяких експериментів проливають нове світло на це питання. Так, у більшості наших дослідів протонофор додавали декілька разів одразу після запису базального дихання. Однак деколи перед застосуванням протонофора також пригнічували активність АТФ-синтази олігоміцином, як у розділі 3.11. Однак значної різниці у стабільності роз'єданого дихання не виявлено: як і в дослідях без олігоміцину, за суміші глюкози, пірувату і глутаміну вона була значно вищою, ніж лише за наявності глюкози. Це важливо, бо якби причиною зниження протонофор-стимульованого дихання було зниження синтезу АТФ мітохондріями (яке могло залежати від субстрату окиснення [18]), олігоміцин не лише б знижував стабільність

роз'єданого дихання, а й усунув його залежність від субстрату. Цього не сталося. Отже, за умов наших експериментів зниження мітохондріального синтезу АТФ (чи його цитозольної концентрації), мабуть, не є основною причиною порушення стабільності роз'єданого дихання. Іншим спостереженням є те, що значне зниження мітохондріального мембранного потенціалу (майже до нуля) в панкреатичних ацинусах за дії FCCP не супроводжується сповільненням роз'єданого дихання. Тобто, повна дисипація мембранного потенціалу мітохондрій не є безпосередньою причиною поступового зниження дихання. І нарешті, у гепатоцитах, виділених способом перфузії *in vitro*, спостерігали як низьку стабільність дихання, так і значно меншу швидкість транспорту й окиснення сукцинату й α -кетоглутарату порівняно з їх естерами. Загалом, найбільш сильний вплив на стабільність роз'єданого дихання мали субстрати окиснення. Тому найбільш імовірним механізмом зниження роз'єданого дихання є обмежена швидкість транспорту і катаболізму субстратів у клітинах. Всі ці гіпотези, однак, слід більш ґрунтовно перевірити експериментально, дослідивши, зокрема, транспорт субстратів у клітини.

У деяких випадках визначення стабільності роз'єданого дихання покращувало оцінку адаптаційної здатності мітохондрій. Наразі найбільш корисним цей параметр виявився у скринінгу оптимального забезпечення клітин субстратами і незамінним за дослідження окиснення деяких амінокислот ацинарними панкреатитами. Це тому, що проявлявся лише вплив амінокислот на стабільність, але не максимальну швидкість роз'єданого дихання. Також потенційно корисною є можливість використовувати стабільність роз'єданого дихання як маркер високої життєздатності клітин. Виглядає, що стабільність є більш чутливим параметром до змін життєздатності клітин, ніж максимальне роз'єдане дихання чи фарбування трипановим синім. Однак цю гіпотезу слід перевірити на інших клітинах.

Значно меншу практичну цінність поки що має визначення стабільності роз'єданого дихання при дослідженні змін функціонування мітохондрій у відповідь на стимуляцію клітинних процесів первинними агоністами або за дії

патологічних факторів. Справа в тому, що у більшості таких випадків змінювалась лише максимальна швидкість дихання; лише незначні зміни стабільності були виявлені за дії NH_4Cl чи хронічного введення етанолу. На нашу думку, потрібно отримати значно більше експериментальних підтверджень змін стабільності роз'єданого дихання, щоб використовувати цей параметр як маркер пристосування чи порушення мітохондріального окиснення до токсичних впливів чи за стимуляції функцій клітин.

Численні експерименти показали, що виявлені закономірності не були артефактами і виникали за багатьох експериментальних умов дослідження гепатоцитів і панкреатичних ацинусів. Ми використовували два різних прилади з різним принципом перемішування суспензії, положенням електродів і герметичністю комірок: результати експериментів були суттєво не залежали від приладу. Оскільки пригнічення роз'єданого дихання високими концентраціями протонофора характерне для багатьох видів клітин [26], показник стабільності також є, мабуть, універсальним. Однак все ж таки варто розрізняти моделі інтактних клітин і пермеабілізованих клітин чи ізольованих мітохондрій. У двох останніх випадках склад середовища є контрольованим експериментально, значна кількість цитозольних процесів втрачені, а транспорт субстратів не обмежений плазматичною мембраною. У цих простіших експериментальних моделях будь-яке зниження стабільності роз'єданого дихання залежить лише від мітохондріальних процесів і, відповідно, не може мати такого ж значення, як у цілісних клітинах.

Залишається до кінця не вирішеним питання, як найкраще виміряти і математично виразити стабільність роз'єданого дихання. Ми застосували три підходи. Базовим є простий статистичний аналіз значень пригніченого дихання за високих концентрацій протонофора. Перевагою є можливість застосування звичайних методів статистики. Однак недоліками є відсутність одного інтегрального параметру та необхідність проводити багаторазові порівняння, що підвищує ймовірність помилки 1 типу. Іншим підходом є визначення оптимальної концентрації протонофора, за якої досягається максимальне

значення швидкості дихання. Однак такі дискретні дані важче аналізувати статистично. Крім того, у деяких експериментах максимальна швидкість досягається вже за першої концентрації протонофора, або за останньої, а отже оптимальна концентрація протонофора насправді лежить за межами досліджуваного діапазону. Загалом, найкраще оптимальна концентрація протонофора підходить для характеристики стабільності роз'єданого дихання у випадку, коли різниця між різними експериментальними групами є такою значною, що у них довелося використовувати різні діапазони концентрацій протонофора. Так це було здійснено у дослідженні впливу способу виділення гепатоцитів на їх дихання. Нарешті, третім підходом був розрахунок «коефіцієнта стабільності» як співвідношення між швидкостями дихання за високих та низьких концентрацій протонофора. Питання, як правильно провести межу між цими концентраціями, залишається відкритим. На жаль, як і у багатьох інших випадках вибору порогів класифікації, визначаючим фактором є суб'єктивне рішення дослідника. Інтуїтивно, межа має пролягати у місці середньої оптимальної концентрації протонофора для всієї серії досліджень. У експерименті з NH_4Cl ми по-іншому визначали «коефіцієнт стабільності», ніж у інших випадках. Це було пов'язано із зсувом оптимальної концентрації протонофора вліво у цій серії досліджень.

У перспективі слід дослідити стабільність роз'єданого дихання на різних стадіях поділу, диференціації та за активації різних механізмів смерті клітин. У подальшому необхідно провести ширше дослідження кореляції адаптаційної здатності мітохондрій клітин з їх життєздатністю, оціненою альтернативними методами, наприклад визначення витоку лактатдегідрогенази з цитоплазми чи МТТ-тестом. Також цікавою є залежність стабільності дихання від експериментально визначеної швидкості транспорту метаболітів у клітину, зміни експресії транспортерів плазматичної мембрани, поділу чи об'єднання мітохондрії, рівня АТФ у клітині та змін йонного складу цитозолу. Важливо дослідити стабільність дихання за інших механізмів його активації, окрім дії протонофорів. Це може бути штучна (фармакологічна активація АТФаз або

експресія штучних АТФаз, які можна активувати довільно) чи природна (скорочення м'язів, секреція тощо) інтенсифікація споживання АТФ клітиною.

* * *

Одним із ключових завдань роботи був порівняльний аналіз адаптаційної здатності мітохондрій підшлункової залози і печінки. Очевидно, що відмінності у функціях цих органів визначають особливості мітохондріального окиснення та їх адаптації до різних факторів.

Важливою відмінністю між двома тканинами є різниця у субстратах, що забезпечують найвищу адаптаційну здатність мітохондрій. Тоді як мітохондрії ізольованих гепатоцитів найкраще окинювали піруват і сукцинат (причому, як його природню форму, так і метиловий естер), найвищий рівень роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози спостерігали за комбінації пірувату й глутаміну. Такі відмінності, в першу чергу, пов'язані із різним рівнем експресії транспортерів у плазматичній мембрані. Серед дикарбоксилатних транспортерів родини SLC13, що можуть здійснювати Na^+ -залежне перенесення сукцинату через плазматичну мембрану, у підшлунковій залозі виявлено лише лише невисоку експресію SLC13A3, тоді як у печінці виявлено високий рівень експресії SLC13A2 і SLC13A5 [<https://www.proteinatlas.org/search/SLC13>] [348]. Щодо транспорту пірувату, то обидва органи мають достатню експресію монокарбоксилатних транспортерів: в печінці переважає SLC16A1, а у підшлунковій залозі – SLC16A7 [<https://www.proteinatlas.org/search/SLC16>] [349]. Високоафінний транспортер глутаміну SLC1A5 добре експресується у всіх тканинах [350], тому, мабуть, різниця у окисненні глутаміну мітохондріями гепатоцитів і ацинарних панкреатитів не залежить від транспорту його через плазматичну мембрану, а від особливостей його метаболізму в клітинах.

Постає питання, яке фізіологічне значення має різниця у окисненні субстратів між печінкою і підшлунковою залозою. Цілком закономірно, що підвищене окиснення глутаміну можливе саме в ацинарних клітинах підшлункової залози, що спеціалізуються на синтезі білків-ферментів і транспортують значну кількість амінокислот з крові. Натомість, печінка є

центром метаболізму і детоксикації організму, тому ефективний транспорт всіх можливих метаболітів через плазматичну мембрану є важливим для забезпечення її функцій. Проте сумнівно, що екзогенний сукцинат відіграє важливу роль у енергетичному забезпеченні печінки, зважаючи на його низьку концентрацію в крові [351].

Іншою особливістю гепатоцитів є їх провідна роль у метаболізмі алкоголю. Саме тому, що більшість алкоголю окиснюється в печінці, існують механізми адаптивного підвищення швидкості його метаболізму через збільшення окисної здатності мітохондрій [134]. Такі адаптації не виникають у ацинарних клітинах підшлункової залози, як і, мабуть, у більшості інших органів.

* * *

У роботі перевіряли гіпотезу, що додаткове забезпечення мітохондрій субстратами окиснення збільшує їхню стійкість до дії негативних чинників, підвищує виживання клітин та може бути корисною стратегією для лікування захворювань, пов'язаних із порушенням мітохондріальних функцій. Для цього необхідно було знайти докази її правдивості на трьох різних рівнях. Ми обмежимося узагальненням даних, відомих для ацинарних клітин підшлункової залози.

На першому рівні слід переконливо показати, що додаткові екзогенні субстрати можуть забезпечувати кращу адаптаційну здатність мітохондрій. У роботі вперше переконливо показано, що наявність у середовищі глютаміну, пірувату чи інших субстратів суттєво підвищує швидкість і стабільність роз'єданого дихання ацинарних панкреатитів. Це узгоджується з даними, що екзогенний піруват здатний підсилювати синтез АТФ шляхом окисного фосфорилування цих клітин [18], [167]. Однак найважливішим аргументом на користь гіпотези є те, що екзогенні піруват і глютамін забезпечують протидію деполяризації за дії протонофора, очевидно, шляхом постачання більшої

кількості відновлювальних еквівалентів у дихальний ланцюг, що відображається у збільшення споживання кисню.

На другому рівні важливо підтвердити, що таке підвищення адаптаційної здатності мітохондрій збільшує життєздатність клітин і їх стійкість до дії токсичних чинників. Результати наших досліджень показали, що не лише існує кореляція між життєздатністю ацинарних клітин та стабільністю їх роз'єданого дихання, а й що присутність у середовищі пірувату, глутаміну чи аланіну підвищує виживання ізольованих клітин за їх тривалої інкубації *in vitro*. У чудовому дослідженні *in vitro* Peng et al. [167] виявили, що наявність у середовищі галактози чи пірувату як додаткових (альтернативних) джерел енергії захищає ізольовані ацинарні клітини підшлункової залози від впливу багатьох токсичних чинників: жирних кислот і їх етилових естерів, жовчевих кислот, аспарагінази. Ми розширили ці дані, показавши що глутамін, як і піруват, захищають ізольовані ацинуси щурів від некрозу за дії комбінації ХЦК й етанолу. Альтернативним шляхом підвищення синтезу АТФ є стимуляція гліколізу. Тому інша група вчених показала, що інтенсифікація метаболізму глюкози за дії інсуліну також підвищує захищає ацинарні клітини від перевантаження Ca^{2+} і дії вільних жирних кислот [141], [142]. Тому забезпечення достатнього синтезу АТФ завдяки постачанню додаткових субстратів окиснення є ефективною стратегією для підтримки життєздатності ацинарних панкреатитів *in vitro*.

Всі ці факти можуть насправді свідчити про неоптимальні для клітин умови *in vitro*, за яких клітини швидко втрачають життєздатність і стають надмірно чутливими до дії негативних факторів. У експерименті це може бути частково компенсовано збільшенням постачання субстратів як джерел енергії та метаболітів. Однак у організмі, за умов нормального функціонування клітин ті ж самі дози токсичних чинників вже не спричиняють значного ушкодження клітин. Ми показали це на прикладі введення щурам суміші ХЦК й етанолу. Тому й відповідь на питання, чи може введення *in vivo* додаткових субстратів захистити ушкодження підшлункової залози за експериментального гострого панкреатиту не може ґрунтуватись лише на даних *in vitro*. У нашому експерименті за введення

пірувату щурам 3 дні після епізоду аргінін-індукованого панкреатиту не було виявлено покращення морфології підшлункової залози. Можливо, піруват вводили запізно, коли вже відбулись незворотні зміни у тканині. Тим не менше, піруват позитивно впливав на амінокислотний склад плазми в крові тварин, що вказує на його терапевтичний потенціал. Інші групи дослідників довели певні позитивні ефекти енергетичних субстратів на моделях гострого панкреатиту гризунів: галактози [167], [352], трегалози [59], [353], глутаміну [46], [49], лізину [44], серину [50], гліцину [45], етилпірувату [354], [355] тощо.

Тому, якщо гіпотеза про центральну роль мітохондрій у розвитку гострого панкреатиту у людини правдива, слід очікувати, що найближчим часом будуть здійснені успішні клінічні дослідження. На сьогодні нема ефективної терапії гострого панкреатиту, а результати клінічних випробувань глутаміну чи аланіл-глутаміну не були переконливо позитивними [47], [48], [51], [290]. На цей момент не можна однозначно сказати, що негативні результати цих випробувань пов'язані з виявленим нами негативним впливом великих концентрацій глутаміну *in vitro* на клітини підшлункової залози. Наші результати підтверджують доцільність проведення додаткових клінічних досліджень терапевтичного впливу інших енергетичних субстратів (пірувату, глутамату й аланіну) у пацієнтів з гострим панкреатитом.

За результатами нашої роботи та інших досліджень можна навести деякі аргументи, що дають додаткові підстави для проведення клінічних досліджень. По-перше, у плазмі крові концентрація енергетичних субстратів, окрім глюкози, досить низька, тому їх штучне підвищення суттєво впливає на адаптаційну здатність мітохондрій у клітинах. По-друге, у ацинарних клітинах підшлункової залози відсутні суттєві запаси енергетичних субстратів, як у інших органах (глікоген у печінці, амінокислоти у м'язах тощо). Тому стале забезпечення окисного фосфорилування залежить від постійного активного трансмембранного транспорту амінокислот, який надзвичайно активний у [162] підшлунковій залозі [32], [33], [34], на відміну від відносно повільного транспорту глюкози [35], [356]. Це ж підтверджується нашими даними, що деякі

амінокислоти суттєво підвищують адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин. Це дає підстави вважати, що за внутрішньовенного введення додаткові субстрати, зокрема амінокислоти, будуть швидко потрапляти у клітини підшлункової залози і бути джерелом АТФ для окисного фосфорилування.

І по-третє, піруват може мати значні переваги порівняно з іншими субстратами. Потенційне його використання для лікування панкреатиту пропонують у літературі [228]. Ми показали, що за стимуляції секреції у ацинарних клітинах підшлункової залози відбувається суттєве і довготривале підвищення мітохондріальної здатності окиснювати саме піруват, що пов'язане, мабуть, з активацією йонами Ca^{2+} піруватдегідрогенази [150]. Оскільки в основі патогенезу на клітинному рівні лежить неконтрольоване вивільнення Ca^{2+} з депо [82], [163], [206], надлишковий Ca^{2+} з цитозолу може транспортуватись у мітохондрії, де активує окиснення пірувату. Тому використання саме пірувату могло б бути ефективним за гострого панкреатиту. Також важливо додати, що фармакокінетичне дослідження показало значне накопичення радіоактивно міченого пірувату у підшлунковій залозі мишей [300]. Проте важливим недоліком пірувату є його низька стабільність у водних розчинах, що значно ускладнює його використання як терапевтичного засобу.

У підсумку, додаткове забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози субстратами окиснення збільшує їхню стійкість до дії негативних чинників, підвищує виживання клітин та може бути стратегією лікування гострого панкреатиту.

ВИСНОВКИ

Мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози та гепатоцитів здатні адаптуватись до фізіологічних та патологічних стимулів, зокрема змінюючи швидкість дихання. Експериментальними параметрами для оцінки адаптаційної здатності окисних систем мітохондрій є максимальна швидкість та стабільність роз'єданого дихання. Підвищення адаптаційної здатності мітохондрій є перспективною стратегією для покращення стану пацієнтів з гострим панкреатитом.

1. Створено та випробувано програмний пакет, який здатний швидко та точно аналізувати записи дихання ізольованих клітин та мітохондрій. Також розроблено декілька простих і ефективних алгоритмів для виокремлення клітин на мікрофотографіях та аналізу їх флуоресценції. Ці підходи корисні для забезпечення точного, швидкого та неупередженого аналізу експериментальних даних.

2. У ацинарних клітинах підшлункової залози найвища адаптаційна здатність мітохондрій проявляється за комбінації глюкози з піруватом і глутаміном. За впливу ацетилхоліну і холецистокініну ключовою є інтенсифікація окиснення пірувату, а інсулін посилює катаболізм глюкози. Стабільність роз'єданого дихання є чутливим параметром для оцінки життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози.

3. Брак достатнього забезпечення субстратами окиснення *in vitro* робить ацинарні клітини вразливими до некротичних процесів за дії помірної концентрації етанолу у комбінації з холецистокініном; цього не відбувалось за наявності пірувату і/або глутаміну. За короткочасного впливу холецистокініну і етанолу *in vivo* відбувається зниження швидкості дихання ацинарних клітин та індукція блебінгу, але не некроз.

4. Мітохондрії ацинарних клітини підшлункової залози здатні окиснювати глутамін, глутамат, аланін, лізин і аспартат, але не аспарагін,

гістидин чи аргінін. Лізин, аргінін і глутамін у високих концентраціях спричиняють некроз ізольованих ацинарних панкреатитів.

5. Введення пірувату натрію щурам з експериментальним аргінін-індукованим гострим панкреатитом коригує рівень амінокислот у плазмі крові.

6. Адаптаційна здатність мітохондрій гепатоцитів найвища за окиснення пірувату і монометилсукцинату. Спосіб ізолювання гепатоцитів за перфузії *in situ* дає змогу отримувати клітини з вищою адаптаційною здатністю мітохондрій. Етанол і CsA *in vitro* не впливають на адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, а активація мітохондріальної пори перехідної провідності йонами Ca^{2+} призводить до пригнічення окисного фосфорилування та швидкості максимального роз'єданого дихання.

7. Хронічне введення алкоголю щурам на тлі високожирової дієти спричиняє інтенсифікацію мітохондріального дихання гепатоцитів, пригнічує секреторну функцію ацинарних клітин підшлункової залози, однак не впливає на їх мітохондріальне дихання.

8. Короткотривале перебування щурів на раціонах з підвищеним вмістом жирів або жирів і цукру не призводить до ожиріння і не впливає негативно на мітохондрії печінки і підшлункової залози.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] J. S. Knudsen, U. Heide-Jørgensen, F. V. Mortensen, H. T. Sørensen, and V. Ehrenstein, ‘Acute pancreatitis: 31-Year trends in incidence and mortality – A Danish population-based cohort study’, *Pancreatology*, vol. 20, no. 7, pp. 1332–1339, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.pan.2020.09.011.
- [2] B. U. Wu, R. S. Johannes, X. Sun, Y. Tabak, D. L. Conwell, and P. A. Banks, ‘The early prediction of mortality in acute pancreatitis: a large population-based study’, *Gut*, vol. 57, no. 12, pp. 1698–1703, Jul. 2008, doi: 10.1136/gut.2008.152702.
- [3] Z. Younossi and L. Henry, ‘Contribution of Alcoholic and Nonalcoholic Fatty Liver Disease to the Burden of Liver-Related Morbidity and Mortality’, *Gastroenterology*, vol. 150, no. 8, pp. 1778–1785, Jun. 2016, doi: 10.1053/j.gastro.2016.03.005.
- [4] S. E. Roberts, S. Morrison-Rees, A. John, J. G. Williams, T. H. Brown, and D. G. Samuel, ‘The incidence and aetiology of acute pancreatitis across Europe’, *Pancreatology*, vol. 17, no. 2, pp. 155–165, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.pan.2017.01.005.
- [5] M. Ramstedt, ‘Population drinking and liver cirrhosis mortality: is there a link in eastern Europe?’, *Addiction*, vol. 102, no. 8, pp. 1212–1223, Aug. 2007, doi: 10.1111/j.1360-0443.2007.01872.x.
- [6] L. Pimpin *et al.*, ‘Burden of liver disease in Europe: Epidemiology and analysis of risk factors to identify prevention policies’, *J Hepatol*, vol. 69, no. 3, pp. 718–735, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2018.05.011.
- [7] P. Vancells Lujan, E. Viñas Esmel, and E. Sacanella Meseguer, ‘Overview of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and the Role of Sugary Food Consumption and Other Dietary Components in Its Development’, *Nutrients*, vol. 13, no. 5, p. 1442, Apr. 2021, doi: 10.3390/nu13051442.

- [8] M. S. Petrov and R. Taylor, 'Intra-pancreatic fat deposition: bringing hidden fat to the fore', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 19, no. 3, pp. 153–168, Mar. 2022, doi: 10.1038/s41575-021-00551-0.
- [9] R. MUKHERJEE, D. CRIDDLE, A. GUKVOSKAYA, S. PANDOL, O. PETERSEN, and R. SUTTON, 'Mitochondrial injury in pancreatitis', *Cell Calcium*, vol. 44, no. 1, pp. 14–23, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.ceca.2007.11.013.
- [10] J. A. Armstrong *et al.*, 'Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, no. 21, pp. 8032–8047, May 2018, doi: 10.1074/jbc.RA118.003200.
- [11] W. Huang *et al.*, 'Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca²⁺-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis', *Gut*, vol. 63, no. 8, pp. 1313–1324, Aug. 2014, doi: 10.1136/gutjnl-2012-304058.
- [12] Z. Zhong and J. J. Lemasters, 'A Unifying Hypothesis Linking Hepatic Adaptations for Ethanol Metabolism to the Proinflammatory and Profibrotic Events of Alcoholic Liver Disease', *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 42, no. 11, pp. 2072–2089, Nov. 2018, doi: 10.1111/acer.13877.
- [13] Z. Zhong *et al.*, 'Acute Ethanol Causes Hepatic Mitochondrial Depolarization in Mice: Role of Ethanol Metabolism', *PLoS One*, vol. 9, no. 3, p. e91308, Mar. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0091308.
- [14] D. Han *et al.*, 'Mitochondrial remodeling in the liver following chronic alcohol feeding to rats', *Free Radic Biol Med*, vol. 102, pp. 100–110, Jan. 2017, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.020.
- [15] Бабський Андрій, Іккерт Оксана, and Манько Володимир, *Основи біоенергетики*. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2019.
- [16] T. Nishikawa *et al.*, 'A switch in the source of ATP production and a loss in capacity to perform glycolysis are hallmarks of hepatocyte failure in advance liver disease', *J Hepatol*, vol. 60, no. 6, pp. 1203–1211, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.jhep.2014.02.014.

- [17] A. L. Nieminen, A. K. Saylor, B. Herman, and J. J. Lemasters, 'ATP depletion rather than mitochondrial depolarization mediates hepatocyte killing after metabolic inhibition', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 267, no. 1, pp. C67–C74, Jul. 1994, doi: 10.1152/ajpcell.1994.267.1.C67.
- [18] S. G. Voronina *et al.*, 'Dynamic Changes in Cytosolic and Mitochondrial ATP Levels in Pancreatic Acinar Cells', *Gastroenterology*, vol. 138, no. 5, pp. 1976–1987.e5, May 2010, doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.037.
- [19] L. D. Robb-Gaspers, 'Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses', *EMBO J*, vol. 17, no. 17, pp. 4987–5000, Sep. 1998, doi: 10.1093/emboj/17.17.4987.
- [20] S. Voronina, T. Sukhomlin, P. R. Johnson, G. Erdemli, O. H. Petersen, and A. Tepikin, 'Correlation of NADH and Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells', *J Physiol*, vol. 539, no. 1, pp. 41–52, Feb. 2002, doi: 10.1113/jphysiol.2001.013134.
- [21] S. G. Voronina, S. L. Barrow, O. V. Gerasimenko, O. H. Petersen, and A. V. Tepikin, 'Effects of Secretagogues and Bile Acids on Mitochondrial Membrane Potential of Pancreatic Acinar Cells', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 26, pp. 27327–27338, Jun. 2004, doi: 10.1074/jbc.M311698200.
- [22] M. Chvanov *et al.*, 'Knockout of the Mitochondrial Calcium Uniporter Strongly Suppresses Stimulus-Metabolism Coupling in Pancreatic Acinar Cells but Does Not Reduce Severity of Experimental Acute Pancreatitis', *Cells*, vol. 9, no. 6, p. 1407, Jun. 2020, doi: 10.3390/cells9061407.
- [23] H. Jaeschke, M. R. McGill, and A. Ramachandran, 'Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity', *Drug Metab Rev*, vol. 44, no. 1, pp. 88–106, Feb. 2012, doi: 10.3109/03602532.2011.602688.
- [24] F. J. Bock and S. W. G. Tait, 'Mitochondria as multifaceted regulators of cell death', *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 21, no. 2, pp. 85–100, Feb. 2020, doi: 10.1038/s41580-019-0173-8.

- [25] A. Rasola and P. Bernardi, 'Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis', *Cell Calcium*, vol. 50, no. 3, pp. 222–233, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.ceca.2011.04.007.
- [26] M. D. Brand and D. G. Nicholls, 'Assessing mitochondrial dysfunction in cells', *Biochemical Journal*, vol. 435, no. 2, pp. 297–312, Apr. 2011, doi: 10.1042/BJ20110162.
- [27] S. Cassim, P.-Y. Martin, and E. Pascolo-Rebouillat, 'ADD10 protects renal cells from cold injuries by improving energy metabolism', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 634, pp. 62–69, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.bbrc.2022.10.009.
- [28] J. Armstrong, N. Cash, J. Morton, A. Tepikin, R. Sutton, and D. Criddle, 'Mitochondrial Targeting of Antioxidants Alters Pancreatic Acinar Cell Bioenergetics and Determines Cell Fate', *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 7, p. 1700, Apr. 2019, doi: 10.3390/ijms20071700.
- [29] J. Pfleger, M. He, and M. Abdellatif, 'Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival', *Cell Death Dis*, vol. 6, no. 7, pp. e1835–e1835, Jul. 2015, doi: 10.1038/cddis.2015.202.
- [30] H. Kosowski, L. Schild, D. Kunz, and W. Halangk, 'Energy metabolism in rat pancreatic acinar cells during anoxia and reoxygenation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1367, no. 1–3, pp. 118–126, Oct. 1998, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00143-1.
- [31] H.-U. Schulz, M. Pross, F. Meyer, R. Matthias, and W. Halangk, 'ACINAR CELL RESPIRATION IN EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS', *SHOCK*, vol. 3, no. 3, pp. 184–188, Mar. 1995, doi: 10.1097/00024382-199503000-00005.
- [32] I. Rooman *et al.*, 'Amino acid transporters expression in acinar cells is changed during acute pancreatitis', *Pancreatology*, vol. 13, no. 5, pp. 475–485, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.pan.2013.06.006.
- [33] H. M. Deloar *et al.*, 'Estimation of internal absorbed dose of l -[methyl- ¹¹C]methionine using whole-body positron emission tomography', *Eur J Nucl Med*

- Mol Imaging*, vol. 25, no. 6, pp. 629–633, Jun. 1998, doi: 10.1007/s002590050265.
- [34] R. Hustinx *et al.*, ‘Whole-body tumor imaging using PET and 2-18F-fluoro-L-tyrosine: preliminary evaluation and comparison with 18F-FDG.’, *J Nucl Med*, vol. 44, no. 4, pp. 533–9, Apr. 2003.
- [35] A. Danielsson and J. Sehlin, ‘Transport and Oxidation of Amino Acids and Glucose in the Isolated Exocrine Mouse Pancreas: Effects of Insulin and Pancreozymin’, *Acta Physiol Scand*, vol. 91, no. 4, pp. 557–565, Aug. 1974, doi: 10.1111/j.1748-1716.1974.tb05710.x.
- [36] W. Mauhin *et al.*, ‘Update on Lysinuric Protein Intolerance, a Multi-faceted Disease Retrospective cohort analysis from birth to adulthood’, *Orphanet J Rare Dis*, vol. 12, no. 1, p. 3, Dec. 2017, doi: 10.1186/s13023-016-0550-8.
- [37] M. Komatsu *et al.*, ‘Citrin deficiency as a cause of chronic liver disorder mimicking non-alcoholic fatty liver disease’, *J Hepatol*, vol. 49, no. 5, pp. 810–820, Nov. 2008, doi: 10.1016/j.jhep.2008.05.016.
- [38] K. Parto, M. Kallajoki, H. Aho, and O. Simell, ‘Pulmonary alveolar proteinosis and glomerulonephritis in lysinuric protein intolerance: Case reports and autopsy findings of four pediatric patients’, *Hum Pathol*, vol. 25, no. 4, pp. 400–407, Apr. 1994, doi: 10.1016/0046-8177(94)90150-3.
- [39] L. Pena and B. K. Burton, ‘Survey of health status and complications among propionic acidemia patients’, *Am J Med Genet A*, vol. 158A, no. 7, pp. 1641–1646, Jul. 2012, doi: 10.1002/ajmg.a.35387.
- [40] J.-A. Oparaji *et al.*, ‘Risk Factors for Asparaginase-associated Pancreatitis’, *J Clin Gastroenterol*, vol. 51, no. 10, pp. 907–913, Nov. 2017, doi: 10.1097/MCG.0000000000000827.
- [41] P. Sandstrom, L. Trulsson, T. Gasslander, T. Sundqvist, U. von Döbeln, and J. Svanvik, ‘Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis’, *Amino Acids*, vol. 35, no. 1, pp. 225–231, Jun. 2008, doi: 10.1007/s00726-007-0557-5.

- [42] E. Roth *et al.*, ‘Amino acid concentrations in plasma and skeletal muscle of patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis.’, *Clin Chem*, vol. 31, no. 8, pp. 1305–1309, Aug. 1985, doi: 10.1093/clinchem/31.8.1305.
- [43] K. Adrych, ‘Decreased serum essential and aromatic amino acids in patients with chronic pancreatitis’, *World J Gastroenterol*, vol. 16, no. 35, p. 4422, 2010, doi: 10.3748/wjg.v16.i35.4422.
- [44] A. L. Al-Malki, ‘Suppression of acute pancreatitis by L-lysine in mice’, *BMC Complement Altern Med*, vol. 15, no. 1, p. 193, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0729-x.
- [45] G. O. Ceyhan *et al.*, ‘Prophylactic Glycine Administration Attenuates Pancreatic Damage and Inflammation in Experimental Acute Pancreatitis’, *Pancreatology*, vol. 11, no. 1, pp. 57–67, Jun. 2011, doi: 10.1159/000325972.
- [46] E. Alhan, A. Usta, S. Türkyılmaz, B. V. Kural, and C. Erçin, ‘Effects of glutamine alone on the acute necrotizing pancreatitis in rats’, *Journal of Surgical Research*, vol. 193, no. 1, pp. 161–167, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.jss.2014.07.029.
- [47] P. Xue *et al.*, ‘Impact of alanyl-glutamine dipeptide on severe acute pancreatitis in early stage’, *World J Gastroenterol*, vol. 14, no. 3, p. 474, 2008, doi: 10.3748/wjg.14.474.
- [48] X. Liu, X. F. Sun, and Q. X. Ge, ‘The role of glutamine supplemented total parenteral nutrition (TPN) in severe acute pancreatitis.’, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 20, no. 19, pp. 4176–4180, Oct. 2016.
- [49] X. F. XU, W. H. LOU, D. S. WANG, D. Y. JIN, X. L. NI, and Z. H. WU, ‘Influence of glutamine on pancreatic blood flow and apoptosis of pancreatic acinar in rats with severe acute pancreatitis’, *Chin J Dig Dis*, vol. 7, no. 2, pp. 121–126, May 2006, doi: 10.1111/j.1443-9573.2006.00250.x.
- [50] R. Chen *et al.*, ‘Serine administration as a novel prophylactic approach to reduce the severity of acute pancreatitis during diabetes in mice’, *Diabetologia*, vol. 63, no. 9, pp. 1885–1899, Sep. 2020, doi: 10.1007/s00125-020-05156-x.

- [51] Y.-M. Zheng, 'Glutamine dipeptide for parenteral nutrition in abdominal surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials', *World J Gastroenterol*, vol. 12, no. 46, p. 7537, 2006, doi: 10.3748/wjg.v12.i46.7537.
- [52] Z. Rakonczay *et al.*, 'A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by l-ornithine in rats', *Crit Care Med*, vol. 36, no. 7, pp. 2117–2127, Jul. 2008, doi: 10.1097/CCM.0b013e31817d7f5c.
- [53] G. Biczó *et al.*, 'Aliphatic, But Not Imidazole, Basic Amino Acids Cause Severe Acute Necrotizing Pancreatitis in Rats', *Pancreas*, vol. 40, no. 3, pp. 486–487, Apr. 2011, doi: 10.1097/MPA.0b013e31820a598a.
- [54] X. Zhang *et al.*, 'Mechanisms of Pancreatic Injury Induced by Basic Amino Acids Differ Between L-Arginine, L-Ornithine, and L-Histidine', *Front Physiol*, vol. 9, Jan. 2019, doi: 10.3389/fphys.2018.01922.
- [55] Q. Binet *et al.*, 'The second case of a young man with l-arginine-induced acute pancreatitis', *Clin J Gastroenterol*, vol. 11, no. 5, pp. 424–427, Oct. 2018, doi: 10.1007/s12328-018-0862-4.
- [56] M. Saka, A. Tüzün, Y. Ateş, S. Bağci, N. Karaeren, and K. Dağalp, 'Acute pancreatitis possibly due to arginine use: a case report.', *Turk J Gastroenterol*, vol. 15, no. 1, pp. 56–8, Mar. 2004.
- [57] B. Kui *et al.*, 'Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents', *Laboratory Investigation*, vol. 94, no. 2, pp. 138–149, Feb. 2014, doi: 10.1038/labinvest.2013.143.
- [58] G. Biczó *et al.*, 'The Crucial Role of Early Mitochondrial Injury in L-Lysine-Induced Acute Pancreatitis', *Antioxid Redox Signal*, vol. 15, no. 10, pp. 2669–2681, Nov. 2011, doi: 10.1089/ars.2011.4065.
- [59] G. Biczó *et al.*, 'Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Deregulated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models', *Gastroenterology*, vol. 154, no. 3, pp. 689–703, Feb. 2018, doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.012.

- [60] L. Trulsson, P. Sandström, T. Sundqvist, S. Smeds, T. Gasslander, and J. Svanvik, 'The Influence of a Load of l-Arginine on Serum Amino Acids and Pancreatic Apoptosis/Proliferation and ATP Levels in the Rat', *Pancreas*, vol. 29, no. 4, pp. e113–e120, Nov. 2004, doi: 10.1097/00006676-200411000-00165.
- [61] R. Masia *et al.*, 'Live cell imaging of cytosolic NADH/NAD⁺ ratio in hepatocytes and liver slices', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 314, no. 1, pp. G97–G108, Jan. 2018, doi: 10.1152/ajpgi.00093.2017.
- [62] J. Liang *et al.*, 'Liver metabolomics reveals potential mechanism of Jieduan-Niwan formula against acute-on-chronic liver failure (ACLF) by improving mitochondrial damage and TCA cycle', *Chin Med*, vol. 18, no. 1, p. 157, Nov. 2023, doi: 10.1186/s13020-023-00858-x.
- [63] R. K. Porter and M. D. Brand, 'Mitochondrial proton conductance and H⁺/O ratio are independent of electron transport rate in isolated hepatocytes', *Biochemical Journal*, vol. 310, no. 2, pp. 379–382, Sep. 1995, doi: 10.1042/bj3100379.
- [64] J. W. Severinghaus and P. B. Astrup, 'History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode', *J Clin Monit*, vol. 2, no. 2, pp. 125–139, Apr. 1986, doi: 10.1007/BF01637680.
- [65] B. CHANCE and G. R. WILLIAMS, 'Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization.', *J Biol Chem*, vol. 217, no. 1, pp. 383–93, Nov. 1955.
- [66] M. A. Walsh, R. V. Musci, R. A. Jacobs, and K. L. Hamilton, 'A practical perspective on how to develop, implement, execute, and reproduce high-resolution respirometry experiments: The physiologist's guide to an Oroboros O2k', *The FASEB Journal*, vol. 37, no. 12, Dec. 2023, doi: 10.1096/fj.202301644RR.
- [67] J. K. Caines, D. A. Barnes, and M. D. Berry, 'The Use of Seahorse XF Assays to Interrogate Real-Time Energy Metabolism in Cancer Cell Lines.', *Methods Mol Biol*, vol. 2508, pp. 225–234, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-2376-3_17.

- [68] A. A. Gerencser *et al.*, 'Quantitative Microplate-Based Respirometry with Correction for Oxygen Diffusion', *Anal Chem*, vol. 81, no. 16, pp. 6868–6878, Aug. 2009, doi: 10.1021/ac900881z.
- [69] P. C. Hinkle, 'P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1706, no. 1–2, pp. 1–11, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.bbabbio.2004.09.004.
- [70] R. K. Porter and M. D. Brand, 'Causes of differences in respiration rate of hepatocytes from mammals of different body mass', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 269, no. 5, pp. R1213–R1224, Nov. 1995, doi: 10.1152/ajpregu.1995.269.5.R1213.
- [71] B. O. Manko, M. Yu. Klevets, and V. V. Manko, 'An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under *in situ* conditions', *Cell Biochem Funct*, vol. 31, no. 2, pp. 115–121, Mar. 2013, doi: 10.1002/cbf.2864.
- [72] G. C. BROWN, P. L. LAKIN-THOMAS, and M. D. BRAND, 'Control of respiration and oxidative phosphorylation in isolated rat liver cells', *Eur J Biochem*, vol. 192, no. 2, pp. 355–362, Sep. 1990, doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb19234.x.
- [73] C. D. Nobes, W. W. Hay, and M. D. Brand, 'The mechanism of stimulation of respiration by fatty acids in isolated hepatocytes.', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 22, pp. 12910–12915, Aug. 1990, doi: 10.1016/S0021-9258(19)38246-8.
- [74] B. Korzeniewski, M.-E. Harper, and M. D. Brand, 'Proportional activation coefficients during stimulation of oxidative phosphorylation by lactate and pyruvate or by vasopressin', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1229, no. 3, pp. 315–322, May 1995, doi: 10.1016/0005-2728(95)00008-7.
- [75] B. O. Manko and V. V. Manko, 'Mechanisms of respiration intensification of rat pancreatic acini upon carbachol-induced Ca^{2+} release', *Acta Physiologica*, vol. 208, no. 4, pp. 387–399, Aug. 2013, doi: 10.1111/apha.12119.

- [76] N. M. DOLIBA *et al.*, '322-OR: Impairment of Alpha-Cell Bioenergetics Contributes to Increased Basal Yet Decreased Glucose Stimulated Oxygen Consumption Rates of Isolated Human Pancreatic Islets in T1DM and T2DM', *Diabetes*, vol. 69, no. Supplement_1, Jun. 2020, doi: 10.2337/db20-322-OR.
- [77] C. Affourtit and M. D. Brand, 'Uncoupling protein-2 contributes significantly to high mitochondrial proton leak in INS-1E insulinoma cells and attenuates glucose-stimulated insulin secretion', *Biochemical Journal*, vol. 409, no. 1, pp. 199–204, Jan. 2008, doi: 10.1042/BJ20070954.
- [78] M. B. Jekabsons and D. G. Nicholls, 'In Situ Respiration and Bioenergetic Status of Mitochondria in Primary Cerebellar Granule Neuronal Cultures Exposed Continuously to Glutamate', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 31, pp. 32989–33000, Jul. 2004, doi: 10.1074/jbc.M401540200.
- [79] M. D. Brand, M. E. Harper, and H. C. Taylor, 'Control of the effective P/O ratio of oxidative phosphorylation in liver mitochondria and hepatocytes', *Biochemical Journal*, vol. 291, no. 3, pp. 739–748, May 1993, doi: 10.1042/bj2910739.
- [80] C. Affourtit and M. D. Brand, 'Chapter 23 Measuring Mitochondrial Bioenergetics in INS-1E Insulinoma Cells', in *Methods Enzymol*, vol. 457, 2009, pp. 405–424. doi: 10.1016/S0076-6879(09)05023-X.
- [81] S. W. Choi, A. A. Gerencser, and D. G. Nicholls, 'Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure', *J Neurochem*, vol. 109, no. 4, pp. 1179–1191, May 2009, doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06055.x.
- [82] R. Mukherjee *et al.*, 'Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP', *Gut*, vol. 65, no. 8, pp. 1333–1346, Aug. 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2014-308553.
- [83] I. Magnusson *et al.*, 'Noninvasive tracing of Krebs cycle metabolism in liver.', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 11, pp. 6975–6984, Apr. 1991, doi: 10.1016/S0021-9258(20)89598-2.

- [84] L. Rui, 'Energy Metabolism in the Liver', in *Comprehensive Physiology*, Wiley, 2014, pp. 177–197. doi: 10.1002/cphy.c130024.
- [85] O. E. Owen, S. C. Kalhan, and R. W. Hanson, 'The Key Role of Anaplerosis and Cataplerosis for Citric Acid Cycle Function', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 34, pp. 30409–30412, Aug. 2002, doi: 10.1074/jbc.R200006200.
- [86] X. Zhang, S. Yang, J. Chen, and Z. Su, 'Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis', *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 9, Jan. 2019, doi: 10.3389/fendo.2018.00802.
- [87] K. M. Stowell and K. E. Crow, 'The effect of acute ethanol treatment on rates of oxygen uptake, ethanol oxidation and gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes', *Biochemical Journal*, vol. 230, no. 3, pp. 595–602, Sep. 1985, doi: 10.1042/bj2300595.
- [88] C. Postic and J. Girard, 'The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis', *Diabetes Metab*, vol. 34, no. 6, pp. 643–648, Dec. 2008, doi: 10.1016/S1262-3636(08)74599-3.
- [89] S. Numa and T. Tanabe, 'Acetyl-coenzyme A carboxylase and its regulation', in *Fatty Acid Metabolism and Its Regulation*, Elsevier Science Publishers B. V., 1984, ch. Chapter 1, pp. 1–27. doi: 10.1016/S0167-7306(08)60119-2.
- [90] F. W. B. Sanders and J. L. Griffin, 'De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose', *Biological Reviews*, vol. 91, no. 2, pp. 452–468, May 2016, doi: 10.1111/brv.12178.
- [91] L. A. Witters, T. D. Watts, D. L. Daniels, and J. L. Evans, 'Insulin stimulates the dephosphorylation and activation of acetyl-CoA carboxylase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85, no. 15, pp. 5473–5477, Aug. 1988, doi: 10.1073/pnas.85.15.5473.
- [92] P. M. M. Ruppert and S. Kersten, 'Mechanisms of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis during fasting', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 35, no. 2, pp. 107–124, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.tem.2023.10.002.
- [93] F. J. Gonzalez, T. Ueno, M. Umeno, B. J. Song, R. L. Veech, and H. V Gelboin, 'Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranscriptional

- regulation of cytochrome P450, CYP2E1.’, *Alcohol Alcohol Suppl*, vol. 1, pp. 97–101, 1991.
- [94] T.-M. Leung and N. Nieto, ‘CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease’, *J Hepatol*, vol. 58, no. 2, pp. 395–398, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.jhep.2012.08.018.
- [95] C. S. Lieber, ‘Metabolism of Alcohol’, *Clin Liver Dis*, vol. 9, no. 1, pp. 1–35, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.cld.2004.10.005.
- [96] N. Grunnet, B. Quistorff, and H. I. D. Thieden, ‘Rate-Limiting Factors in Ethanol Oxidation by Isolated Rat-Liver Parenchymal Cells’, *Eur J Biochem*, vol. 40, no. 1, pp. 275–282, Dec. 1973, doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03195.x.
- [97] R. G. Thurman *et al.*, ‘Swift increase in alcohol metabolism (SIAM) in the mouse: comparison of the effect of short-term ethanol treatment on ethanol elimination in four inbred strains.’, *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 223, no. 1, pp. 45–9, Oct. 1982.
- [98] T. Yuki and R. G. Thurman, ‘Mechanism of the Swift Increase in Alcohol Metabolism (“SIAM”) in the Rat’, in *Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems-IV*, Boston, MA: Springer US, 1980, pp. 689–695. doi: 10.1007/978-1-4757-1419-7_71.
- [99] R. G. Thurman, I. Cheren, D. Forman, J. A. Ewing, and E. Glassman, ‘Swift Increase in Alcohol Metabolism in Humans’, *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 13, no. 4, pp. 572–576, Aug. 1989, doi: 10.1111/j.1530-0277.1989.tb00380.x.
- [100] A. Shimamoto, J. Liu, and T. Fujimiya, ‘SIAM-Like Phenomenon Caused by Low Doses of Alcohol’, *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 34, no. s1, Feb. 2010, doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.00934.x.
- [101] B. U. Bradford and I. Rusyn, ‘Swift increase in alcohol metabolism (SIAM): understanding the phenomenon of hypermetabolism in liver’, *Alcohol*, vol. 35, no. 1, pp. 13–17, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.alcohol.2004.12.001.
- [102] T. Yuki and R. G. Thurman, ‘The swift increase in alcohol metabolism. Time course for the increase in hepatic oxygen uptake and the involvement of

- glycolysis', *Biochemical Journal*, vol. 186, no. 1, pp. 119–126, Jan. 1980, doi: 10.1042/bj1860119.
- [103] O. El-Assal, F. Hong, W.-H. Kim, S. Radaeva, and B. Gao, 'IL-6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis: IL-6 protects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver.', *Cell Mol Immunol*, vol. 1, no. 3, pp. 205–11, Jun. 2004.
- [104] S. M. Bailey, E. C. Pietsch, and C. C. Cunningham, 'Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III', *Free Radic Biol Med*, vol. 27, no. 7–8, pp. 891–900, Oct. 1999, doi: 10.1016/S0891-5849(99)00138-0.
- [105] Nichols DG and Ferguson SJ, *Bioenergetics*. Elsevier, 2013. doi: 10.1016/C2010-0-64902-9.
- [106] F. Bouillaud, M.-C. Alves-Guerra, and D. Ricquier, 'UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1863, no. 10, pp. 2443–2456, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.013.
- [107] Z. P. Evans, J. D. Ellett, M. G. Schmidt, R. G. Schnellmann, and K. D. Chavin, 'Mitochondrial Uncoupling Protein-2 Mediates Steatotic Liver Injury following Ischemia/Reperfusion', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 13, pp. 8573–8579, Mar. 2008, doi: 10.1074/jbc.M706784200.
- [108] K. D. Chavin *et al.*, 'Obesity Induces Expression of Uncoupling Protein-2 in Hepatocytes and Promotes Liver ATP Depletion', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 9, pp. 5692–5700, Feb. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.9.5692.
- [109] I. Demori, B. Burlando, E. Gerdoni, A. Lanni, E. Fugassa, and A. Voci, 'Uncoupling protein-2 induction in rat hepatocytes after acute carbon tetrachloride liver injury', *J Cell Physiol*, vol. 216, no. 2, pp. 413–418, Aug. 2008, doi: 10.1002/jcp.21415.
- [110] N. Enomoto *et al.*, 'Kupffer cell-derived prostaglandin E₂ is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver', *American Journal of Physiology-*

- Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 279, no. 1, pp. G100–G106, Jul. 2000, doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.1.G100.
- [111] F. Magdaleno, C. Blajszczak, and N. Nieto, ‘Key Events Participating in the Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease’, *Biomolecules*, vol. 7, no. 1, p. 9, Jan. 2017, doi: 10.3390/biom7010009.
- [112] Z. Song, Z. Zhou, I. Deaciuc, T. Chen, and C. J. McClain, ‘Inhibition of adiponectin production by homocysteine: A potential mechanism for alcoholic liver disease’, *Hepatology*, vol. 47, no. 3, pp. 867–879, Mar. 2008, doi: 10.1002/hep.22074.
- [113] J. García-Villafranca, A. Guillén, and J. Castro, ‘Ethanol consumption impairs regulation of fatty acid metabolism by decreasing the activity of AMP-activated protein kinase in rat liver’, *Biochimie*, vol. 90, no. 3, pp. 460–466, Mar. 2008, doi: 10.1016/j.biochi.2007.09.019.
- [114] J. M. Correnti, E. Juskeviciute, A. Swarup, and J. B. Hoek, ‘Pharmacological ceramide reduction alleviates alcohol-induced steatosis and hepatomegaly in adiponectin knockout mice’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 306, no. 11, pp. G959–G973, Jun. 2014, doi: 10.1152/ajpgi.00395.2013.
- [115] J. M. Ajmo, X. Liang, C. Q. Rogers, B. Pennock, and M. You, ‘Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 295, no. 4, pp. G833–G842, Oct. 2008, doi: 10.1152/ajpgi.90358.2008.
- [116] H. Yin, M. Hu, R. Zhang, Z. Shen, L. Flatow, and M. You, ‘MicroRNA-217 Promotes Ethanol-induced Fat Accumulation in Hepatocytes by Down-regulating SIRT1’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 13, pp. 9817–9826, Mar. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.333534.
- [117] C. Ji and N. Kaplowitz, ‘ER stress: Can the liver cope?’, *J Hepatol*, vol. 45, no. 2, pp. 321–333, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.jhep.2006.06.004.

- [118] B. Fromenty and D. Pessayre, 'Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity', *Pharmacol Ther*, vol. 67, no. 1, pp. 101–154, Jan. 1995, doi: 10.1016/0163-7258(95)00012-6.
- [119] D. Pessayre *et al.*, 'Central role of mitochondria in drug-induced liver injury', *Drug Metab Rev*, vol. 44, no. 1, pp. 34–87, Feb. 2012, doi: 10.3109/03602532.2011.604086.
- [120] J. J. Lemasters, 'Hepatotoxicity Due to Mitochondrial Injury', in *Drug-Induced Liver Disease*, Elsevier, 2013, pp. 85–100. doi: 10.1016/B978-0-12-387817-5.00005-4.
- [121] W. Zhong *et al.*, 'Chronic alcohol exposure stimulates adipose tissue lipolysis in mice: role of reverse triglyceride transport in the pathogenesis of alcoholic steatosis.', *Am J Pathol*, vol. 180, no. 3, pp. 998–1007, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.017.
- [122] X. Dou *et al.*, 'Rectification of impaired adipose tissue methylation status and lipolytic response contributes to hepatoprotective effect of betaine in a mouse model of alcoholic liver disease', *Br J Pharmacol*, vol. 171, no. 17, pp. 4073–4086, Sep. 2014, doi: 10.1111/bph.12765.
- [123] M. You, M. Fischer, M. A. Deeg, and D. W. Crabb, 'Ethanol Induces Fatty Acid Synthesis Pathways by Activation of Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 32, pp. 29342–29347, Aug. 2002, doi: 10.1074/jbc.M202411200.
- [124] G. E. Arteel, J. A. Raleigh, B. U. Bradford, and R. G. Thurman, 'Acute alcohol produces hypoxia directly in rat liver tissue in vivo: role of Kupffer cells', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 271, no. 3, pp. G494–G500, Sep. 1996, doi: 10.1152/ajpgi.1996.271.3.G494.
- [125] B. Magnusson *et al.*, 'Adipocyte Differentiation-Related Protein Promotes Fatty Acid Storage in Cytosolic Triglycerides and Inhibits Secretion of Very Low-Density Lipoproteins', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 26, no. 7, pp. 1566–1571, Jul. 2006, doi: 10.1161/01.ATV.0000223345.11820.da.

- [126] B. Nath *et al.*, ‘Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 α is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice’, *Hepatology*, vol. 53, no. 5, pp. 1526–1537, May 2011, doi: 10.1002/hep.24256.
- [127] D. Narendra, A. Tanaka, D.-F. Suen, and R. J. Youle, ‘Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy.’, *J Cell Biol*, vol. 183, no. 5, pp. 795–803, Dec. 2008, doi: 10.1083/jcb.200809125.
- [128] N. Hariharan, P. Zhai, and J. Sadoshima, ‘Oxidative Stress Stimulates Autophagic Flux During Ischemia/Reperfusion’, *Antioxid Redox Signal*, vol. 14, no. 11, pp. 2179–2190, Jun. 2011, doi: 10.1089/ars.2010.3488.
- [129] J.-S. Kim *et al.*, ‘Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes.’, *Hepatology*, vol. 47, no. 5, pp. 1725–36, May 2008, doi: 10.1002/hep.22187.
- [130] J. J. Lemasters, ‘Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3).’, *Redox Biol*, vol. 2, pp. 749–54, 2014, doi: 10.1016/j.redox.2014.06.004.
- [131] J. A. Williams, H.-M. Ni, Y. Ding, and W.-X. Ding, ‘Parkin regulates mitophagy and mitochondrial function to protect against alcohol-induced liver injury and steatosis in mice’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 309, no. 5, pp. G324–G340, Sep. 2015, doi: 10.1152/ajpgi.00108.2015.
- [132] A. L. King *et al.*, ‘Involvement of the mitochondrial permeability transition pore in chronic ethanol-mediated liver injury in mice’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 306, no. 4, pp. G265–G277, Feb. 2014, doi: 10.1152/ajpgi.00278.2013.
- [133] S. P. Elmore, T. Qian, S. F. Grissom, and J. J. Lemasters, ‘The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes’, *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 12, pp. 1–17, Oct. 2001, doi: 10.1096/fj.01-0206fje.
- [134] D. Han *et al.*, ‘Dynamic Adaptation of Liver Mitochondria to Chronic Alcohol Feeding in Mice’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 50, pp. 42165–42179, Dec. 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.377374.

- [135] C. S. Lieber, M. A. Leo, X. Wang, and L. M. DeCarli, 'Alcohol alters hepatic FoxO1, p53, and mitochondrial SIRT5 deacetylation function', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 373, no. 2, pp. 246–252, Aug. 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.06.006.
- [136] C. S. Lieber, M. A. Leo, X. Wang, and L. M. DeCarli, 'Effect of chronic alcohol consumption on Hepatic SIRT1 and PGC-1 α in rats', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 370, no. 1, pp. 44–48, May 2008, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.005.
- [137] S. Araya *et al.*, 'Exocrine pancreas glutamate secretion help to sustain enterocyte nutritional needs under protein restriction.', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 314, no. 4, pp. G517–G536, Apr. 2018, doi: 10.1152/ajpgi.00135.2017.
- [138] H. Bauduin, M. Colin, and J. E. Dumont, 'Energy sources for protein synthesis and enzymatic secretion in rat pancreas in vitro.', *Biochim Biophys Acta*, vol. 174, no. 2, pp. 722–33, Feb. 1969, doi: 10.1016/0005-2787(69)90301-3.
- [139] H. Tanton *et al.*, 'F1F0-ATP Synthase Inhibitory Factor 1 in the Normal Pancreas and in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Effects on Bioenergetics, Invasion and Proliferation.', *Front Physiol*, vol. 9, p. 833, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.00833.
- [140] M. Korc, H. Sankaran, K. Y. Wong, J. A. Williams, and I. D. Goldfine, 'Insulin receptors in isolated mouse pancreatic acini', *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 84, no. 2, pp. 293–299, Sep. 1978, doi: 10.1016/0006-291X(78)90169-9.
- [141] A. Samad *et al.*, 'Insulin Protects Pancreatic Acinar Cells from Palmitoleic Acid-induced Cellular Injury', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 34, pp. 23582–23595, Aug. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.589440.
- [142] P. Mankad, A. James, A. K. Siriwardena, A. C. Elliott, and J. I. E. Bruce, 'Insulin Protects Pancreatic Acinar Cells from Cytosolic Calcium Overload and Inhibition of Plasma Membrane Calcium Pump', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 3, pp. 1823–1836, Jan. 2012, doi: 10.1074/jbc.M111.326272.

- [143] P. R. Johnson *et al.*, ‘Non-uniform distribution of mitochondria in pancreatic acinar cells’, *Cell Tissue Res*, vol. 313, no. 1, pp. 37–45, Jul. 2003, doi: 10.1007/s00441-003-0741-1.
- [144] S. V. Straub, D. R. Giovannucci, and D. I. Yule, ‘Calcium Wave Propagation in Pancreatic Acinar Cells’, *J Gen Physiol*, vol. 116, no. 4, pp. 547–560, Oct. 2000, doi: 10.1085/jgp.116.4.547.
- [145] O. H. Petersen, ‘Stimulus-secretion coupling: cytoplasmic calcium signals and the control of ion channels in exocrine acinar cells.’, *J Physiol*, vol. 448, no. 1, pp. 1–51, Mar. 1992, doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019028.
- [146] J. M. Cancela, ‘Transformation of local Ca^{2+} spikes to global Ca^{2+} transients: the combinatorial roles of multiple Ca^{2+} releasing messengers’, *EMBO J*, vol. 21, no. 5, pp. 909–919, Mar. 2002, doi: 10.1093/emboj/21.5.909.
- [147] J. G. McCormack and R. M. Denton, ‘Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the Ca^{2+} -sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat’, *Biochemical Journal*, vol. 190, no. 1, pp. 95–105, Jul. 1980, doi: 10.1042/bj1900095.
- [148] R. M. Denton, D. A. Richards, and J. G. Chin, ‘Calcium ions and the regulation of NAD^{+} -linked isocitrate dehydrogenase from the mitochondria of rat heart and other tissues’, *Biochemical Journal*, vol. 176, no. 3, pp. 899–906, Dec. 1978, doi: 10.1042/bj1760899.
- [149] J. G. McCormack and R. M. Denton, ‘A comparative study of the regulation of Ca^{2+} of the activities of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex and NAD^{+} -isocitrate dehydrogenase from a variety of sources’, *Biochemical Journal*, vol. 196, no. 2, pp. 619–624, May 1981, doi: 10.1042/bj1960619.
- [150] B. O. Man’ko and V. V. Man’ko, ‘[Influence of Ca^{2+} on kinetic parameters of pancreatic acinar mitochondria in situ respiration].’, *Ukr Biokhim Zh (1999)*, vol. 85, no. 4, pp. 48–60, 2013.
- [151] N. Savion and Z. Selinger, ‘Morphological changes in rat pancreatic slices associated with inhibition of enzyme secretion by high concentrations of

- secretagogues.’, *J Cell Biol*, vol. 76, no. 2, pp. 467–482, Feb. 1978, doi: 10.1083/jcb.76.2.467.
- [152] S. Patergnani *et al.*, ‘Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs)’, *Cell Communication and Signaling*, vol. 9, no. 1, p. 19, Dec. 2011, doi: 10.1186/1478-811X-9-19.
- [153] A. V. Samokhvalov, J. Rehm, and M. Roerecke, ‘Alcohol Consumption as a Risk Factor for Acute and Chronic Pancreatitis: A Systematic Review and a Series of Meta-analyses’, *EBioMedicine*, vol. 2, no. 12, pp. 1996–2002, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.ebiom.2015.11.023.
- [154] Q. T. Tran *et al.*, ‘Role of Bile Acids and Bile Salts in Acute Pancreatitis’, *Pancreas*, vol. 50, no. 1, pp. 3–11, Jan. 2021, doi: 10.1097/MPA.0000000000001706.
- [155] P. S. Haber *et al.*, ‘Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells’, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 132, no. 4, pp. 294–302, Oct. 1998, doi: 10.1016/S0022-2143(98)90042-7.
- [156] P. S. Haber *et al.*, ‘Non-Oxidative Metabolism of Ethanol by Rat Pancreatic Acini’, *Pancreatology*, vol. 4, no. 2, pp. 82–89, Jan. 2004, doi: 10.1159/000077608.
- [157] A. S. Gukovskaya *et al.*, ‘Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats’, *Gastroenterology*, vol. 122, no. 1, pp. 106–118, Jan. 2002, doi: 10.1053/gast.2002.30302.
- [158] N. Shalbueva *et al.*, ‘Effects of Oxidative Alcohol Metabolism on the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Necrosis in a Mouse Model of Alcoholic Pancreatitis’, *Gastroenterology*, vol. 144, no. 2, pp. 437–446.e6, Feb. 2013, doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.037.
- [159] A. Geisz, ‘Aldehyde “Adduction” Explains Synergy of Smoking and Alcohol in Promoting Pancreatitis’, *Gastroenterology*, vol. 163, no. 4, pp. 817–819, Oct. 2022, doi: 10.1053/j.gastro.2022.07.067.
- [160] I. H. NORDBACK, S. MACGOWAN, J. J. POTTER, and J. L. CAMERON, ‘The Role of Acetaldehyde in the Pathogenesis of Acute Alcoholic Pancreatitis’, *Ann*

- Surg*, vol. 214, no. 6, pp. 671–678, Dec. 1991, doi: 10.1097/00000658-199112000-00006.
- [161] R. Bhatia *et al.*, ‘Malondialdehyde-Acetaldehyde Extracellular Matrix Protein Adducts Attenuate Unfolded Protein Response During Alcohol and Smoking–Induced Pancreatitis’, *Gastroenterology*, vol. 163, no. 4, pp. 1064–1078.e10, Oct. 2022, doi: 10.1053/j.gastro.2022.06.071.
- [162] J. Werner *et al.*, ‘Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 283, no. 1, pp. G65–G73, Jul. 2002, doi: 10.1152/ajpgi.00419.2001.
- [163] D. N. Criddle *et al.*, ‘Fatty Acid Ethyl Esters Cause Pancreatic Calcium Toxicity via Inositol Trisphosphate Receptors and Loss of ATP Synthesis’, *Gastroenterology*, vol. 130, no. 3, pp. 781–793, Mar. 2006, doi: 10.1053/j.gastro.2005.12.031.
- [164] M. A. Javed *et al.*, ‘TRO40303 Ameliorates Alcohol-Induced Pancreatitis Through Reduction of Fatty Acid Ethyl Ester–Induced Mitochondrial Injury and Necrotic Cell Death’, *Pancreas*, vol. 47, no. 1, pp. 18–24, Jan. 2018, doi: 10.1097/MPA.0000000000000953.
- [165] A. Jakkampudi *et al.*, ‘Fatty acid ethyl ester (FAEE) associated acute pancreatitis: An ex-vivo study using human pancreatic acini’, *Pancreatology*, vol. 20, no. 8, pp. 1620–1630, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.pan.2020.10.027.
- [166] E. A. Laposata and L. G. Lange, ‘Presence of Nonoxidative Ethanol Metabolism in Human Organs Commonly Damaged by Ethanol Abuse’, *Science (1979)*, vol. 231, no. 4737, pp. 497–499, Jan. 1986, doi: 10.1126/science.3941913.
- [167] S. Peng *et al.*, ‘Galactose protects against cell damage in mouse models of acute pancreatitis’, *Journal of Clinical Investigation*, vol. 128, no. 9, pp. 3769–3778, Aug. 2018, doi: 10.1172/JCI94714.
- [168] O. H. Petersen, A. V. Tepikin, J. V. Gerasimenko, O. V. Gerasimenko, R. Sutton, and D. N. Criddle, ‘Fatty acids, alcohol and fatty acid ethyl esters: Toxic Ca²⁺

- signal generation and pancreatitis', *Cell Calcium*, vol. 45, no. 6, pp. 634–642, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.ceca.2009.02.005.
- [169] K. Patel, C. Durgampudi, P. Noel, R. N. Trivedi, C. de Oliveira, and V. P. Singh, 'Fatty Acid Ethyl Esters Are Less Toxic Than Their Parent Fatty Acids Generated during Acute Pancreatitis', *Am J Pathol*, vol. 186, no. 4, pp. 874–884, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.ajpath.2015.11.022.
- [170] S. Neelamekam, S. Kwok, R. Malone, A. S. Wierzbicki, and H. Soran, 'The impact of lipoprotein lipase deficiency on health-related quality of life: a detailed, structured, qualitative study', *Orphanet J Rare Dis*, vol. 12, no. 1, p. 156, Dec. 2017, doi: 10.1186/s13023-017-0706-1.
- [171] J. Maléth *et al.*, 'Alcohol Disrupts Levels and Function of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator to Promote Development of Pancreatitis', *Gastroenterology*, vol. 148, no. 2, pp. 427-439.e16, Feb. 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2014.11.002.
- [172] E. L. OPIE, 'THE RELATION OP CHOLELITHIASIS TO DISEASE OF THE PANCREAS AND TO FAT NECROSIS', *Am J Med Sci*, vol. 121, no. 1, pp. 27–42, Jan. 1901, doi: 10.1097/00000441-190101000-00002.
- [173] Vermont Adhin, 'THE ETIOLOGY OF ACUTE HEMORRHAGIC PANCREATITIS.', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, vol. XXXVI, no. 25, p. 1786, Jun. 1901, doi: 10.1001/jama.1901.02470250040005.
- [174] A. Csendes, A. Kruse, P. Funch-Jensen, M. J. Øster, J. Ørnsholt, and E. Amdrup, 'Pressure measurements in the biliary and pancreatic duct systems in controls and in patients with gallstones, previous cholecystectomy, or common bile duct stones', *Gastroenterology*, vol. 77, no. 6, pp. 1203–1210, Dec. 1979, doi: 10.1016/0016-5085(79)90158-6.
- [175] J. A. STERLING, 'The common channel for bile and pancreatic ducts.', *Surg Gynecol Obstet*, vol. 98, no. 4, pp. 420–4, Apr. 1954.

- [176] T. T. WHITE and D. F. MAGEE, 'Perfusion of the Dog Pancreas with Bile Without Production of Pancreatitis', *Ann Surg*, vol. 151, no. 2, pp. 245–250, Feb. 1960, doi: 10.1097/00000658-196002000-00014.
- [177] T. Pohle, J. Konturek, W. Domschke, and M. Lerch, 'Spontaneous Flow of Bile Through the Human Pancreatic Duct in the Absence of Pancreatitis: Nature's Human Experiment', *Endoscopy*, vol. 35, no. 12, pp. 1072–1075, Nov. 2003, doi: 10.1055/s-2003-44586.
- [178] M. M. Lerch, A. K. Saluja, M. Rünzi, R. Dawra, M. Saluja, and M. L. Steer, 'Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum', *Gastroenterology*, vol. 104, no. 3, pp. 853–861, Mar. 1993, doi: 10.1016/0016-5085(93)91022-A.
- [179] F. Ch. Mooren *et al.*, 'Early Changes in Pancreatic Acinar Cell Calcium Signaling after Pancreatic Duct Obstruction', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 11, pp. 9361–9369, Mar. 2003, doi: 10.1074/jbc.M207454200.
- [180] M. M. Lerch, H. Weidenbach, C. A. Hernandez, G. Preclik, and G. Adler, 'Pancreatic outflow obstruction as the critical event for human gall stone induced pancreatitis.', *Gut*, vol. 35, no. 10, pp. 1501–1503, Oct. 1994, doi: 10.1136/gut.35.10.1501.
- [181] N. Senninger, F. G. Moody, J. C. Coelho, and D. H. Van Buren, 'The role of biliary obstruction in the pathogenesis of acute pancreatitis in the opossum.', *Surgery*, vol. 99, no. 6, pp. 688–93, Jun. 1986.
- [182] S. L. Barrow *et al.*, 'ATP depletion inhibits Ca²⁺ release, influx and extrusion in pancreatic acinar cells but not pathological Ca²⁺ responses induced by bile', *Pflugers Arch*, vol. 455, no. 6, pp. 1025–1039, Mar. 2008, doi: 10.1007/s00424-007-0360-x.
- [183] L. Fischer *et al.*, 'Phosphatidylinositol 3-kinase facilitates bile acid-induced Ca²⁺ responses in pancreatic acinar cells', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 292, no. 3, pp. G875–G886, Mar. 2007, doi: 10.1152/ajpgi.00558.2005.

- [184] J. V. Gerasimenko *et al.*, ‘Bile Acids Induce Ca^{2+} Release from Both the Endoplasmic Reticulum and Acidic Intracellular Calcium Stores through Activation of Inositol Trisphosphate Receptors and Ryanodine Receptors’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 52, pp. 40154–40163, Dec. 2006, doi: 10.1074/jbc.M606402200.
- [185] R. P. E. Sarkany and B. H. Moreland, ‘Enhancement of the autocatalytic activation of trypsinogen to trypsin by bile and bile acids’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 839, no. 3, pp. 262–267, May 1985, doi: 10.1016/0304-4165(85)90007-8.
- [186] S. G. Voronina, O. V. Gryshchenko, O. V. Gerasimenko, A. K. Green, O. H. Petersen, and A. V. Tepikin, ‘Bile Acids Induce a Cationic Current, Depolarizing Pancreatic Acinar Cells and Increasing the Intracellular Na^{+} Concentration’, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 3, pp. 1764–1770, Jan. 2005, doi: 10.1074/jbc.M410230200.
- [187] D. M. Booth *et al.*, ‘Reactive Oxygen Species Induced by Bile Acid Induce Apoptosis and Protect Against Necrosis in Pancreatic Acinar Cells’, *Gastroenterology*, vol. 140, no. 7, pp. 2116–2125, Jun. 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.054.
- [188] P. Farruggia, F. Di Marco, and C. Dufour, ‘Pearson syndrome’, *Expert Rev Hematol*, vol. 11, no. 3, pp. 239–246, Mar. 2018, doi: 10.1080/17474086.2018.1426454.
- [189] H. A. Pearson *et al.*, ‘A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction’, *J Pediatr*, vol. 95, no. 6, pp. 976–984, Dec. 1979, doi: 10.1016/S0022-3476(79)80286-3.
- [190] V. Rebours, P. Lévy, and P. Ruzsniowski, ‘An overview of hereditary pancreatitis’, *Digestive and Liver Disease*, vol. 44, no. 1, pp. 8–15, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.dld.2011.08.003.
- [191] V. Keim, N. Bauer, N. Teich, P. Simon, M. M. Lerch, and J. Mössner, ‘Clinical characterization of patients with hereditary pancreatitis and mutations in the

- cationic trypsinogen gene', *Am J Med*, vol. 111, no. 8, pp. 622–626, Dec. 2001, doi: 10.1016/S0002-9343(01)00958-5.
- [192] D. C. Whitcomb *et al.*, 'Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene', *Nat Genet*, vol. 14, no. 2, pp. 141–145, Oct. 1996, doi: 10.1038/ng1096-141.
- [193] N. Howes *et al.*, 'Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 2, no. 3, pp. 252–261, Mar. 2004, doi: 10.1016/S1542-3565(04)00013-8.
- [194] A. Geisz, P. Hegyi, and M. Sahin-Tóth, 'Robust autoactivation, chymotrypsin C independence and diminished secretion define a subset of hereditary pancreatitis-associated cationic trypsinogen mutants', *FEBS J*, vol. 280, no. 12, pp. 2888–2899, Jun. 2013, doi: 10.1111/febs.12292.
- [195] K. Minowa *et al.*, 'L-Asparaginase-Induced Pancreatic Injury is Associated with an Imbalance in Plasma Amino Acid Levels', *Drugs R D*, vol. 12, no. 2, pp. 49–55, Jun. 2012, doi: 10.2165/11632990-000000000-00000.
- [196] S. Peng *et al.*, 'Calcium and adenosine triphosphate control of cellular pathology: asparaginase-induced pancreatitis elicited via protease-activated receptor 2', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 371, no. 1700, p. 20150423, Aug. 2016, doi: 10.1098/rstb.2015.0423.
- [197] J. He *et al.*, 'Insufficient secretion of pancreatic FGF21 is the toxicological mechanism and therapeutic target of asparaginase-associated pancreatitis', *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 485, p. 116920, Apr. 2024, doi: 10.1016/j.taap.2024.116920.
- [198] P. Hegyi, 'L-arginine-induced experimental pancreatitis', *World J Gastroenterol*, vol. 10, no. 14, p. 2003, 2004, doi: 10.3748/wjg.v10.i14.2003.
- [199] S. Kitajima and Y. Kishino, 'Pancreatic damage produced by injecting excess lysine in rats', *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, vol. 49, no. 1, pp. 295–305, Dec. 1985, doi: 10.1007/BF02912107.

- [200] S. Willemer, H.-P. Elssner, and G. Adler, 'Hormone-Induced Pancreatitis', *European Surgical Research*, vol. 24, no. 1, pp. 29–39, 1992, doi: 10.1159/000129237.
- [201] B. Ji, Y. Bi, D. Simeone, R. M. Mortensen, and C. D. Logsdon, 'Human pancreatic acinar cells lack functional responses to cholecystokinin and gastrin', *Gastroenterology*, vol. 121, no. 6, pp. 1380–1390, Dec. 2001, doi: 10.1053/gast.2001.29557.
- [202] J. A. Murphy *et al.*, 'Direct activation of cytosolic Ca²⁺ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells.', *Gastroenterology*, vol. 135, no. 2, pp. 632–41, Aug. 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.026.
- [203] T. Liang *et al.*, 'Ex vivo human pancreatic slice preparations offer a valuable model for studying pancreatic exocrine biology.', *J Biol Chem*, vol. 292, no. 14, pp. 5957–5969, Apr. 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.777433.
- [204] C. Bartholomew, 'Acute Scorpion Pancreatitis in Trinidad', *BMJ*, vol. 1, no. 5697, pp. 666–668, Mar. 1970, doi: 10.1136/bmj.1.5697.666.
- [205] S. Singh, U. Bhardwaj, S. k. Verma, A. Bhalla, and K. Gill, 'Hyperamylasemia and acute pancreatitis following anticholinesterase poisoning', *Hum Exp Toxicol*, vol. 26, no. 6, pp. 467–471, Jun. 2007, doi: 10.1177/0960327107076814.
- [206] D. N. Criddle *et al.*, 'Cholecystokinin-58 and cholecystokinin-8 exhibit similar actions on calcium signaling, zymogen secretion, and cell fate in murine pancreatic acinar cells', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 297, no. 6, pp. G1085–G1092, Dec. 2009, doi: 10.1152/ajpgi.00119.2009.
- [207] R. R. Torgerson and M. A. McNiven, 'The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing', *J Cell Sci*, vol. 111, no. 19, pp. 2911–2922, Jan. 1998, doi: 10.1242/jcs.111.19.2911.
- [208] M. LERCH and F. GORELICK, 'EARLY TRYPSINOGEN ACTIVATION IN ACUTE PANCREATITIS', *Medical Clinics of North America*, vol. 84, no. 3, pp. 549–563, May 2000, doi: 10.1016/S0025-7125(05)70239-X.

- [209] Dawra Rajinder and Saluja Ashok K., ‘L-arginine-induced experimental acute pancreatitis’, *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
- [210] Williams John A., ‘Isolation of rodent pancreatic acinar cells and acini by collagenase digestion’, *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, 2010, doi: 10.3998/panc.2010.18.
- [211] P. O. Seglen, ‘Chapter 4 Preparation of Isolated Rat Liver Cells’, in *Methods in Cell Biology*, vol. 13, 1976, pp. 29–83. doi: 10.1016/S0091-679X(08)61797-5.
- [212] M.-J. Virolle, V. J. Morris, and M. J. Bibb, ‘A simple and reliable turbidimetric and kinetic assay for alpha-amylase that is readily applied to culture supernatants and cell extracts’, *J Ind Microbiol*, vol. 5, no. 5, pp. 295–301, Jul. 1990, doi: 10.1007/BF01578204.
- [213] N. M. Pavlishko, O. V. Ryabinina, T. A. Zhilyakova, I. Yu. Sakharov, V. G. Gerzhikova, and M. V. Gonchar, ‘Oxidase-Peroxidase Method of Ethanol Assay in Fermented Musts and Wine Products’, *Appl Biochem Microbiol*, vol. 41, no. 6, pp. 604–609, Nov. 2005, doi: 10.1007/s10438-005-0110-9.
- [214] P. Chomczynski and N. Sacchi, ‘The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on’, *Nat Protoc*, vol. 1, no. 2, pp. 581–585, Aug. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.83.
- [215] Abdi Herve, ‘Holm’s Sequential Bonferroni Procedure’, in *Encyclopedia of Research Design*, 2455 Teller Road, Thousand Oaks California 91320 United States : SAGE Publications, Inc., 2010. doi: 10.4135/9781412961288.n178.
- [216] T. K. Koo and M. Y. Li, ‘A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research’, *J Chiropr Med*, vol. 15, no. 2, pp. 155–163, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.jcm.2016.02.012.
- [217] W. R. Schucany, ‘Kernel Smoothers: An Overview of Curve Estimators for the First Graduate Course in Nonparametric Statistics’, *Statistical Science*, vol. 19, no. 4, Nov. 2004, doi: 10.1214/088342304000000756.
- [218] K. Gokcesu and H. Gokcesu, ‘Generalized Huber Loss for Robust Learning and its Efficient Minimization for a Robust Statistics’, Aug. 2021.

- [219] C. Ramakers, J. M. Ruijter, R. H. L. Deprez, and A. F. M. Moorman, 'Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data', *Neurosci Lett*, vol. 339, no. 1, pp. 62–66, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4.
- [220] B. P. Dranka *et al.*, 'Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling', *Free Radic Biol Med*, vol. 51, no. 9, pp. 1621–1635, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.08.005.
- [221] N. M. Doliba *et al.*, 'Cholinergic regulation of fuel-induced hormone secretion and respiration of SUR1 ^{-/-} mouse islets', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 291, no. 3, pp. E525–E535, Sep. 2006, doi: 10.1152/ajpendo.00579.2005.
- [222] H. Wang *et al.*, 'Structure, function, and genomic organization of human Na⁺-dependent high-affinity dicarboxylate transporter', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 278, no. 5, pp. C1019–C1030, May 2000, doi: 10.1152/ajpcell.2000.278.5.C1019.
- [223] M. N. Kondrashova and N. M. Doliba, 'Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine', *FEBS Lett*, vol. 243, no. 2, pp. 153–155, Jan. 1989, doi: 10.1016/0014-5793(89)80119-X.
- [224] M. S. Olson and T. T. Allgyer, 'The inhibition of l(—)-palmitylcarnitine oxidation by α -ketoglutarate in rat liver mitochondria', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 267, no. 2, pp. 238–248, May 1972, doi: 10.1016/0005-2728(72)90112-0.
- [225] Q. Jin and C. M. Bethke, 'Kinetics of Electron Transfer through the Respiratory Chain', *Biophys J*, vol. 83, no. 4, pp. 1797–1808, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)73945-3.
- [226] M. D. Brand, R. P. Hafner, and G. C. Brown, 'Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain.', *Biochem J*, vol. 255, no. 2, pp. 535–9, Oct. 1988.

- [227] X. Zhong, C.-P. Liang, and S. Gong, 'Intravenous glutamine for severe acute pancreatitis: A meta-analysis.', *World J Crit Care Med*, vol. 2, no. 1, pp. 4–8, Feb. 2013, doi: 10.5492/wjccm.v2.i1.4.
- [228] W. Huang *et al.*, 'Therapeutic potential of pyruvate in acute pancreatitis: In Vitro findings and a systematic review', *Pancreatology*, vol. 16, no. 1, p. S32, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.pan.2015.12.102.
- [229] M. Raraty *et al.*, 'Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 24, pp. 13126–13131, Nov. 2000, doi: 10.1073/pnas.97.24.13126.
- [230] Williams A. John and Goldfine D. Ira, 'The insulin-acinar relationship', in *The Pancreas: Biology, Pathobiology and Disease*, Second edition., Vay Liang W. Go, Ed., New York: Raven Press, 1993, ch. 41, pp. 789–802. doi: 10.1139/o92-001.
- [231] D. J. Garry, M. G. Garry, J. A. Williams, W. C. Mahoney, and R. L. Sorenson, 'Effects of islet hormones on amylase secretion and localization of somatostatin binding sites', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 256, no. 5, pp. G897–G904, May 1989, doi: 10.1152/ajpgi.1989.256.5.G897.
- [232] A. Saito, J. A. Williams, and T. Kanno, 'Potentiation of cholecystokinin-induced exocrine secretion by both exogenous and endogenous insulin in isolated and perfused rat pancreata.', *Journal of Clinical Investigation*, vol. 65, no. 4, pp. 777–782, Apr. 1980, doi: 10.1172/JCI109727.
- [233] A. SAITO, J. A. WILLIAMS, and T. KANNO, 'Potentiation by insulin of the acetylcholine-induced secretory response of the perfused rat pancreas', *Biomedical Research*, vol. 1, no. 1, pp. 101–103, 1980, doi: 10.2220/biomedres.1.101.
- [234] A. Tsai, M. R. Cowan, D. G. Johnson, and P. M. Brannon, 'Regulation of pancreatic amylase and lipase gene expression by diet and insulin in diabetic

- rats', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 267, no. 4, pp. G575–G583, Oct. 1994, doi: 10.1152/ajpgi.1994.267.4.G575.
- [235] M. Korc, Y. Iwamoto, H. Sankaran, J. A. Williams, and I. D. Goldfine, 'Insulin action in pancreatic acini from streptozotocin-treated rats. I. Stimulation of protein synthesis', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 240, no. 1, pp. G56–G62, Jan. 1981, doi: 10.1152/ajpgi.1981.240.1.G56.
- [236] P. D. Hardt and N. Ewald, 'Exocrine Pancreatic Insufficiency in Diabetes Mellitus: A Complication of Diabetic Neuropathy or a Different Type of Diabetes?', *Exp Diabetes Res*, vol. 2011, pp. 1–7, 2011, doi: 10.1155/2011/761950.
- [237] J. A. Williams, M. Korc, and R. L. Dormer, 'Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 235, no. 5, pp. E517–524, Nov. 1978, doi: 10.1152/ajpendo.1978.235.5.E517.
- [238] J. G. McCormack, A. P. Halestrap, and R. M. Denton, 'Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism', *Physiol Rev*, vol. 70, no. 2, pp. 391–425, Apr. 1990, doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.391.
- [239] B. O. Man'ko and V. V. Man'ko, '[Influence of Ca^{2+} on kinetic parameters of pancreatic acinar mitochondria in situ respiration].', *Ukr Biokhim Zh (1999)*, vol. 85, no. 4, pp. 48–60, 2013.
- [240] M. Otsuki and J. A. Williams, 'Direct Modulation of Pancreatic CCK Receptors and Enzyme Secretion by Insulin in Isolated Pancreatic Acini from Diabetic Rats', *Diabetes*, vol. 32, no. 3, pp. 241–246, Mar. 1983, doi: 10.2337/diab.32.3.241.
- [241] J. C. Parker and L. Jarett, 'Insulin Mediator Stimulates Pyruvate Dehydrogenase of Intact Liver Mitochondria', *Diabetes*, vol. 34, no. 1, pp. 92–97, Jan. 1985, doi: 10.2337/diab.34.1.92.

- [242] R. M. Denton *et al.*, ‘The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex’, *Adv Enzyme Regul*, vol. 36, pp. 183–198, Jan. 1996, doi: 10.1016/0065-2571(95)00020-8.
- [243] Shrestha Nirajan, Cuffe James S M, Holland Olivia J, Perkins Anthony V, McAinch Andrew J, and Hryciw Deanne H, ‘Linoleic Acid Increases Prostaglandin E2 Release and Reduces Mitochondrial Respiration and Cell Viability in Human Trophoblast-Like Cells’, *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 52, no. 1, pp. 94–108, Mar. 2019, doi: 10.33594/0000000007.
- [244] X. Yan *et al.*, ‘Glutamate Impairs Mitochondria Aerobic Respiration Capacity and Enhances Glycolysis in Cultured Rat Astrocytes.’, *Biomed Environ Sci*, vol. 30, no. 1, pp. 44–51, Jan. 2017, doi: 10.3967/bes2017.005.
- [245] A. A. Stepanenko and V. V. Dmitrenko, ‘Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability’, *Gene*, vol. 574, no. 2, pp. 193–203, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.gene.2015.08.009.
- [246] E. R. Shore *et al.*, ‘Small Molecule Inhibitors of Cyclophilin D To Protect Mitochondrial Function as a Potential Treatment for Acute Pancreatitis’, *J Med Chem*, vol. 59, no. 6, pp. 2596–2611, Mar. 2016, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01801.
- [247] E. C. Thrower *et al.*, ‘A novel protein kinase D inhibitor attenuates early events of experimental pancreatitis in isolated rat acini’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 300, no. 1, pp. G120–G129, Jan. 2011, doi: 10.1152/ajpgi.00300.2010.
- [248] S. J. Pandol *et al.*, ‘Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide’, *Gastroenterology*, vol. 117, no. 3, pp. 706–716, Sep. 1999, doi: 10.1016/S0016-5085(99)70465-8.
- [249] N. Mnatsakanyan *et al.*, ‘A mitochondrial megachannel resides in monomeric F1FO ATP synthase’, *Nat Commun*, vol. 10, no. 1, p. 5823, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-13766-2.
- [250] A. González, A. M. Núñez, M. P. Granados, J. A. Pariente, and G. M. Salido, ‘Ethanol impairs CCK-8-evoked amylase secretion through Ca²⁺-mediated ROS

- generation in mouse pancreatic acinar cells', *Alcohol*, vol. 38, no. 1, pp. 51–57, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.alcohol.2006.03.002.
- [251] S. Forster, A. E. Thumser, S. R. Hood, and N. Plant, 'Characterization of Rhodamine-123 as a Tracer Dye for Use In In vitro Drug Transport Assays', *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e33253, Mar. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033253.
- [252] A. S. Gukovskaya, I. Gukovsky, Y. Jung, M. Mouria, and S. J. Pandol, 'Cholecystokinin Induces Caspase Activation and Mitochondrial Dysfunction in Pancreatic Acinar Cells', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 25, pp. 22595–22604, Jun. 2002, doi: 10.1074/jbc.M202929200.
- [253] A. E. Nissinen, L. M. Laitinen, S. Kakko, A. Helander, M. J. Savolainen, and S. Hörkkö, 'Low plasma antibodies specific for phosphatidylethanol in alcohol abusers and patients with alcoholic pancreatitis', *Addiction Biology*, vol. 17, no. 6, pp. 1057–1067, Nov. 2012, doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00279.x.
- [254] P. S. Haber, J. S. Wilson, M. V. Apte, W. Hall, K. Goumas, and R. C. Pirola, 'Lipid intolerance does not account for susceptibility to alcoholic and gallstone pancreatitis', *Gastroenterology*, vol. 106, no. 3, pp. 742–748, Mar. 1994, doi: 10.1016/0016-5085(94)90710-2.
- [255] A. Lugea *et al.*, 'Human Pancreatic Acinar Cells', *Am J Pathol*, vol. 187, no. 12, pp. 2726–2743, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.017.
- [256] S. Dolai *et al.*, 'Pancreas-specific SNAP23 depletion prevents pancreatitis by attenuating pathological basolateral exocytosis and formation of trypsin-activating autolysosomes', *Autophagy*, vol. 17, no. 10, pp. 3068–3081, Oct. 2021, doi: 10.1080/15548627.2020.1852725.
- [257] J. Albrecht and M. D. Norenberg, 'Glutamine: A Trojan horse in ammonia neurotoxicity', *Hepatology*, vol. 44, no. 4, pp. 788–794, Oct. 2006, doi: 10.1002/hep.21357.
- [258] J. Albrecht, M. Zielińska, and M. D. Norenberg, 'Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal', *Biochem Pharmacol*, vol. 80, no. 9, pp. 1303–1308, Nov. 2010, doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.024.

- [259] M. C. C. Machado, G. M. Fonseca, and J. Jukemura, 'Late-Onset Ornithine Carbamoyltransferase Deficiency Accompanying Acute Pancreatitis and Hyperammonemia', *Case Rep Med*, vol. 2013, pp. 1–3, 2013, doi: 10.1155/2013/903546.
- [260] J. Jaworek *et al.*, 'The effects of ammonia on pancreatic enzyme secretion in vivo and in vitro.', *J Physiol Pharmacol*, vol. 51, no. 2, pp. 315–32, Jun. 2000.
- [261] E. Gaude *et al.*, 'NADH Shuttling Couples Cytosolic Reductive Carboxylation of Glutamine with Glycolysis in Cells with Mitochondrial Dysfunction', *Mol Cell*, vol. 69, no. 4, pp. 581-593.e7, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.molcel.2018.01.034.
- [262] S.-M. Fendt *et al.*, 'Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells', *Nat Commun*, vol. 4, no. 1, p. 2236, Jul. 2013, doi: 10.1038/ncomms3236.
- [263] Y. Bi, S. Le Page, and J. A. Williams, 'Rho and Rac promote acinar morphological changes, actin reorganization, and amylase secretion', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 289, no. 3, pp. G561–G570, Sep. 2005, doi: 10.1152/ajpgi.00508.2004.
- [264] M. Sanchez, L. Gastaldi, M. Remedi, A. Cáceres, and C. Landa, 'Rotenone-Induced Toxicity is Mediated by Rho-GTPases in Hippocampal Neurons', *Toxicological Sciences*, vol. 104, no. 2, pp. 352–361, Aug. 2008, doi: 10.1093/toxsci/kfn092.
- [265] K. Noritake *et al.*, 'Critical roles of Rho-associated kinase in membrane blebbing and mitochondrial pathway of apoptosis caused by 1-butanol', *Toxicology in Vitro*, vol. 26, no. 6, pp. 849–855, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.tiv.2012.04.027.
- [266] R. Miñambres, R. M. Guasch, A. Perez-Aragó, and C. Guerri, 'The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes', *J Cell Sci*, vol. 119, no. 2, pp. 271–282, Jan. 2006, doi: 10.1242/jcs.02723.
- [267] P. P. L. Lam, L. I. Cosen Binker, A. Lugea, S. J. Pandol, and H. Y. Gaisano, 'Alcohol Redirects CCK-Mediated Apical Exocytosis to the Acinar Basolateral

- Membrane in Alcoholic Pancreatitis', *Traffic*, vol. 8, no. 5, pp. 605–617, May 2007, doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00557.x.
- [268] D. P. J. van Dijk *et al.*, 'Tumour-specific and organ-specific protein synthesis rates in patients with pancreatic cancer', *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, vol. 10, no. 3, pp. 549–556, Jun. 2019, doi: 10.1002/jcsm.12419.
- [269] C.-Y. Tsai, M. S. Kilberg, and S. Z. Husain, 'The role of asparagine synthetase on nutrient metabolism in pancreatic disease', *Pancreatology*, vol. 20, no. 6, pp. 1029–1034, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.pan.2020.08.002.
- [270] A. L. Yang, 'Nutrition and Acute Pancreatitis', *J Clin Med*, vol. 10, no. 4, p. 836, Feb. 2021, doi: 10.3390/jcm10040836.
- [271] P. Wu, L. Li, and W. Sun, 'Efficacy comparisons of enteral nutrition and parenteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis: a meta-analysis from randomized controlled trials', *Biosci Rep*, vol. 38, no. 6, Dec. 2018, doi: 10.1042/BSR20181515.
- [272] K. Márta *et al.*, 'High versus low energy administration in the early phase of acute pancreatitis (GOULASH trial): protocol of a multicentre randomised double-blind clinical trial', *BMJ Open*, vol. 7, no. 9, p. e015874, Sep. 2017, doi: 10.1136/bmjopen-2017-015874.
- [273] M. F. Juhász *et al.*, 'The EFFect of dietary fat content on the recurrence of pancreaTitis (EFFORT): Protocol of a multicenter randomized controlled trial', *Pancreatology*, vol. 22, no. 1, pp. 51–57, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.pan.2021.10.002.
- [274] '<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000166183-ASPG>'.
- [275] N. Kumar *et al.*, 'Histidine Enhances the Anticancer Effect of Gemcitabine against Pancreatic Cancer via Disruption of Amino Acid Homeostasis and Oxidant—Antioxidant Balance', *Cancers (Basel)*, vol. 15, no. 9, p. 2593, May 2023, doi: 10.3390/cancers15092593.
- [276] '<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000159650-UROC1>'.
- [277] '<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000140287-HDC>'.

- [278] B. S. Emerald *et al.*, ‘Diabetes Mellitus Alters the Immuno-Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Rat Pancreas’, *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 9, p. 4974, Apr. 2022, doi: 10.3390/ijms23094974.
- [279] R. P. da Silva, K. Clow, J. T. Brosnan, and M. E. Brosnan, ‘Synthesis of guanidinoacetate and creatine from amino acids by rat pancreas’, *British Journal of Nutrition*, vol. 111, no. 4, pp. 571–577, Feb. 2014, doi: 10.1017/S0007114513003012.
- [280] S. Toné *et al.*, ‘Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis’, *Exp Cell Res*, vol. 313, no. 16, pp. 3635–3644, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.yexcr.2007.06.018.
- [281] K. Aoki, S. Sato, S. Harada, S. Uchida, Y. Iwasa, and J. Ikenouchi, ‘Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb’, *Mol Biol Cell*, vol. 31, no. 8, pp. 833–844, Apr. 2020, doi: 10.1091/mbc.E19-12-0691.
- [282] J. Ikenouchi and K. Aoki, ‘A Clockwork Bleb: cytoskeleton, calcium, and cytoplasmic fluidity’, *FEBS J*, vol. 289, no. 24, pp. 7907–7917, Dec. 2022, doi: 10.1111/febs.16220.
- [283] T. Mizunuma, S. Kawamura, and Y. Kishino, ‘Effects of Injecting Excess Arginine on Rat Pancreas’, *J Nutr*, vol. 114, no. 3, pp. 467–471, Mar. 1984, doi: 10.1093/jn/114.3.467.
- [284] M. Estaras, F. Z. Ameer, M. Estévez, S. Díaz-Velasco, and A. Gonzalez, ‘The lysine derivative aminoadipic acid, a biomarker of protein oxidation and diabetes-risk, induces production of reactive oxygen species and impairs trypsin secretion in mouse pancreatic acinar cells’, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 145, p. 111594, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.fct.2020.111594.
- [285] S. S. Ozturk and B. O. Palsson, ‘Chemical Decomposition of Glutamine in Cell Culture Media: Effect of Media Type, pH, and Serum Concentration’, *Biotechnol Prog*, vol. 6, no. 2, pp. 121–128, Mar. 1990, doi: 10.1021/bp00002a005.

- [286] H. Xue, 'New role of glutamate as an immunoregulator via glutamate receptors and transporters', *Frontiers in Bioscience*, vol. S3, no. 1, p. 1007, 2011, doi: 10.2741/205.
- [287] B. N. Girish, G. Rajesh, K. Vaidyanathan, and V. Balakrishnan, 'Alterations in plasma amino acid levels in chronic pancreatitis.', *JOP*, vol. 12, no. 1, pp. 11–8, Jan. 2011.
- [288] Y. Kawaguchi, M. Ogawa, H. Ito, and T. Mine, 'Alterations in Plasma Amino Acid Levels in Alcoholic Chronic Pancreatitis in Japanese', *Digestion*, vol. 86, no. 2, pp. 155–160, 2012, doi: 10.1159/000339781.
- [289] M.-P. BERARD, R. HANKARD, and L. CYNOBER, 'Amino acid metabolism during total parenteral nutrition in healthy volunteers: evaluation of a new amino acid solution', *Clinical Nutrition*, vol. 20, no. 5, pp. 407–414, Oct. 2001, doi: 10.1054/clnu.2001.0466.
- [290] M. Arutla *et al.*, 'Efficacy of enteral glutamine supplementation in patients with severe and predicted severe acute pancreatitis— A randomized controlled trial', *Indian Journal of Gastroenterology*, vol. 38, no. 4, pp. 338–347, Aug. 2019, doi: 10.1007/s12664-019-00962-7.
- [291] P. Fürst, S. Albers, and P. Stehle, 'Availability of glutamine supplied intravenously as alanylglutamine', *Metabolism*, vol. 38, no. 8, pp. 67–72, Aug. 1989, doi: 10.1016/0026-0495(89)90145-5.
- [292] K. S. McCommis *et al.*, 'Loss of Mitochondrial Pyruvate Carrier 2 in the Liver Leads to Defects in Gluconeogenesis and Compensation via Pyruvate-Alanine Cycling', *Cell Metab*, vol. 22, no. 4, pp. 682–694, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.028.
- [293] J. E. Domínguez-Muñoz, 'Pancreatic exocrine insufficiency: Diagnosis and treatment', *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 26, no. s2, pp. 12–16, Mar. 2011, doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06600.x.
- [294] H. Schrader, B. A. Menge, O. Belyaev, W. Uhl, W. E. Schmidt, and J. J. Meier, 'Amino Acid Malnutrition in Patients With Chronic Pancreatitis and Pancreatic

- Carcinoma', *Pancreas*, vol. 38, no. 4, pp. 416–421, May 2009, doi: 10.1097/MPA.0b013e318194fc7a.
- [295] N. Fukutake *et al.*, 'A Novel Multivariate Index for Pancreatic Cancer Detection Based On the Plasma Free Amino Acid Profile', *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132223, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0132223.
- [296] L. Zhang *et al.*, 'Distinguishing pancreatic cancer from chronic pancreatitis and healthy individuals by ¹H nuclear magnetic resonance-based metabonomic profiles', *Clin Biochem*, vol. 45, no. 13–14, pp. 1064–1069, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.05.012.
- [297] S. Tani *et al.*, 'New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats', *Dig Dis Sci*, vol. 35, no. 3, pp. 367–374, Mar. 1990, doi: 10.1007/BF01537416.
- [298] Y. Kishino and S. Kawamura, 'Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine', *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, vol. 47, no. 1, pp. 147–155, Dec. 1984, doi: 10.1007/BF02890197.
- [299] G. Biczó *et al.*, 'Inhibition of Arginase Activity Ameliorates L-Arginine-Induced Acute Pancreatitis in Rats', *Pancreas*, vol. 39, no. 6, pp. 868–874, Aug. 2010, doi: 10.1097/MPA.0b013e3181d371f8.
- [300] E. M. Serrao *et al.*, 'Analysis of ¹³ C and ¹⁴ C labeling in pyruvate and lactate in tumor and blood of lymphoma-bearing mice injected with ¹³ C- and ¹⁴ C-labeled pyruvate', *NMR Biomed*, vol. 31, no. 5, May 2018, doi: 10.1002/nbm.3901.
- [301] W. Ziolkowski *et al.*, 'Intravenous Sodium Pyruvate Protects Against Cerulein-Induced Acute Pancreatitis', *Pancreas*, vol. 37, no. 2, pp. 238–239, Aug. 2008, doi: 10.1097/MPA.0b013e31816726e7.
- [302] M. Tashiro, C. Schäfer, H. Yao, S. A. Ernst, and J. A. Williams, 'Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells', *Gut*, vol. 49, no. 2, pp. 241–250, Aug. 2001, doi: 10.1136/gut.49.2.241.
- [303] I. Buchmann, L. Milakofsky, N. Harris, J. M. Hofford, and W. H. Vogel, 'Effect of Arginine Administration on Plasma and Brain Levels of Arginine and Various

- Related Amino Compounds in the Rat', *Pharmacology*, vol. 53, no. 3, pp. 133–142, 1996, doi: 10.1159/000139424.
- [304] S. Adibi, 'Interrelationships between level of amino acids in plasma and tissues during starvation', *American Journal of Physiology-Legacy Content*, vol. 221, no. 3, pp. 829–838, Sep. 1971, doi: 10.1152/ajplegacy.1971.221.3.829.
- [305] M. HOLEČEK and S. MIČUDA, 'Amino Acid Concentrations and Protein Metabolism of Two Types of Rat Skeletal Muscle in Postprandial State and After Brief Starvation', *Physiol Res*, pp. 959–967, Dec. 2017, doi: 10.33549/physiolres.933638.
- [306] M. Holeček, 'Why Are Branched-Chain Amino Acids Increased in Starvation and Diabetes?', *Nutrients*, vol. 12, no. 10, p. 3087, Oct. 2020, doi: 10.3390/nu12103087.
- [307] A. Yenicerioglu *et al.*, 'Effects of trimetazidine in acute pancreatitis induced by L-arginine', *Canadian Journal of Surgery*, vol. 56, no. 3, pp. 175–179, Jun. 2013, doi: 10.1503/cjs.032811.
- [308] B. Gulturk *et al.*, 'Effects of sildenafil citrate on pancreatic and lung complications in an experimental L-arginine-induced acute pancreatitis model', *Gastroenterology Review*, vol. 16, no. 1, pp. 29–35, 2021, doi: 10.5114/pg.2021.104734.
- [309] P. Newsholme, 'Why Is L-Glutamine Metabolism Important to Cells of the Immune System in Health, Postinjury, Surgery or Infection?', *J Nutr*, vol. 131, no. 9, pp. 2515S–2522S, Sep. 2001, doi: 10.1093/jn/131.9.2515S.
- [310] V. Cruzat, M. Macedo Rogero, K. Noel Keane, R. Curi, and P. Newsholme, 'Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation', *Nutrients*, vol. 10, no. 11, p. 1564, Oct. 2018, doi: 10.3390/nu10111564.
- [311] H. Ikeda, 'Plasma amino acid levels in individuals with bacterial pneumonia and healthy controls', *Clin Nutr ESPEN*, vol. 44, pp. 204–210, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.clnesp.2021.06.021.

- [312] T. Hisamatsu *et al.*, ‘Novel, Objective, Multivariate Biomarkers Composed of Plasma Amino Acid Profiles for the Diagnosis and Assessment of Inflammatory Bowel Disease’, *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e31131, Jan. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031131.
- [313] W. Lee and R. Sokol, ‘Liver Disease in Mitochondrial Disorders’, *Semin Liver Dis*, vol. 27, no. 3, pp. 259–273, Aug. 2007, doi: 10.1055/s-2007-985071.
- [314] D.-H. Lee and K.-W. Lee, ‘Hepatocyte Isolation, Culture, and Its Clinical Applications’, *Hanyang Medical Reviews*, vol. 34, no. 4, p. 165, 2014, doi: 10.7599/hmr.2014.34.4.165.
- [315] L. A. Gonçalves, A. M. Vigário, and C. Penha-Gonçalves, ‘Improved isolation of murine hepatocytes for in vitro malaria liver stage studies’, *Malar J*, vol. 6, no. 1, p. 169, Dec. 2007, doi: 10.1186/1475-2875-6-169.
- [316] R. Rognstad, ‘Gluconeogenesis in rat hepatocytes from monomethyl succinate and other esters’, *Arch Biochem Biophys*, vol. 230, no. 2, pp. 605–609, May 1984, doi: 10.1016/0003-9861(84)90441-7.
- [317] A. Marsal-Beltran *et al.*, ‘Protective effects of the succinate/SUCNR1 axis on damaged hepatocytes in NAFLD’, *Metabolism*, vol. 145, p. 155630, Aug. 2023, doi: 10.1016/j.metabol.2023.155630.
- [318] T. Sugano, J. A. Handler, H. Yoshihara, Z. Kizaki, and R. G. Thurman, ‘Acute and chronic ethanol treatment in vivo increases malate-aspartate shuttle capacity in perfused rat liver.’, *J Biol Chem*, vol. 265, no. 35, pp. 21549–53, Dec. 1990.
- [319] S. Tsunoda, ‘Red wine decreases cyclosporine bioavailability’, *Clin Pharmacol Ther*, vol. 70, no. 5, pp. 462–467, Nov. 2001, doi: 10.1067/mcp.2001.119814.
- [320] A. C. Croce, A. Ferrigno, M. Vairetti, R. Bertone, I. Freitas, and G. Bottiroli, ‘Autofluorescence properties of isolated rat hepatocytes under different metabolic conditions’, *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 3, no. 10, pp. 920–926, Oct. 2004, doi: 10.1039/b407358d.
- [321] T. Lutz, S. Wild, S. Boutellier, D. Sutter, M. Volkert, and E. Scharrer, ‘Hyperpolarization of the cell membrane of mouse hepatocytes by lactate, pyruvate, and fructose is due to Ca²⁺-dependent activation of K⁺ channels and

- of the Na⁺/K⁺-ATPase', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1372, no. 2, pp. 359–369, Jul. 1998, doi: 10.1016/S0005-2736(98)00078-9.
- [322] P. Bernardi *et al.*, 'The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target', *FEBS J*, vol. 273, no. 10, pp. 2077–2099, May 2006, doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05213.x.
- [323] M. NISHIKAWA, S. NOJIMA, T. AKIYAMA, U. SANKAWA, and K. INOUE, 'Interaction of Digitonin and Its Analogs with Membrane Cholesterol', *The Journal of Biochemistry*, vol. 96, no. 4, pp. 1231–1239, Oct. 1984, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134941.
- [324] A. Colbeau, J. Nachbaur, and P. M. Vignais, 'Enzymatic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 249, no. 2, pp. 462–492, Dec. 1971, doi: 10.1016/0005-2736(71)90123-4.
- [325] E. Fontaine, O. Eriksson, F. Ichas, and P. Bernardi, 'Regulation of the Permeability Transition Pore in Skeletal Muscle Mitochondria', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 20, pp. 12662–12668, May 1998, doi: 10.1074/jbc.273.20.12662.
- [326] T. Briston *et al.*, 'Mitochondrial permeability transition pore: sensitivity to opening and mechanistic dependence on substrate availability', *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 10492, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10673-8.
- [327] J. REHM *et al.*, 'Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis', *Drug Alcohol Rev*, vol. 29, no. 4, pp. 437–445, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1465-3362.2009.00153.x.
- [328] P. G. Lankisch, M. Apte, and P. A. Banks, 'Acute pancreatitis', *The Lancet*, vol. 386, no. 9988, pp. 85–96, Jul. 2015, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60649-8.
- [329] F. Guo, K. Zheng, R. Benedé-Ubieto, F. J. Cubero, and Y. A. Nevzorova, 'The Lieber-DeCarli Diet—A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease', *Alcohol Clin Exp Res*, vol. 42, no. 10, pp. 1828–1840, Oct. 2018, doi: 10.1111/acer.13840.

- [330] M. Singh, M. M. LaSure, and D. E. Bockman, 'Pancreatic acinar cell function and morphology in rats chronically fed an ethanol diet.', *Gastroenterology*, vol. 82, no. 3, pp. 425–34, Mar. 1982.
- [331] B. C. Ponnappa, R. Marciniak, T. Schneider, J. B. Hoek, and E. Rubin, 'Ethanol Consumption and Susceptibility of the Pancreas to Cerulein-Induced Pancreatitis', *Pancreas*, vol. 14, no. 2, pp. 150–157, Mar. 1997, doi: 10.1097/00006676-199703000-00007.
- [332] X. Deng *et al.*, 'Chronic Alcohol Consumption Accelerates Fibrosis in Response to Cerulein-Induced Pancreatitis in Rats', *Am J Pathol*, vol. 166, no. 1, pp. 93–106, Jan. 2005, doi: 10.1016/S0002-9440(10)62235-3.
- [333] J. Werner *et al.*, 'Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol', *Gastroenterology*, vol. 113, no. 1, pp. 286–294, Jul. 1997, doi: 10.1016/S0016-5085(97)70106-9.
- [334] W. Huang *et al.*, 'Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca^{2+} -dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis', *Gut*, vol. 63, no. 8, pp. 1313–1324, Aug. 2014, doi: 10.1136/gutjnl-2012-304058.
- [335] D. N. Criddle, 'The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison', *Pancreatology*, vol. 15, no. 4, pp. S6–S12, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.pan.2015.02.009.
- [336] M. J. Bragado, L. J. García, M. A. López, and J. J. Calvo, 'Protective effect of long term high fiber diet consumption on rat exocrine pancreatic function after chronic ethanol intake', *J Nutr Biochem*, vol. 12, no. 6, pp. 338–345, Jun. 2001, doi: 10.1016/S0955-2863(01)00147-4.
- [337] P. Staňková *et al.*, 'Western Diet Decreases the Liver Mitochondrial Oxidative Flux of Succinate: Insight from a Murine NAFLD Model', *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 13, p. 6908, Jun. 2021, doi: 10.3390/ijms22136908.
- [338] P. Simon, F. Ulrich Weiss, P. Klaus-Zimmer, H. Georg Koch, and M. M. Lerch, 'Acute and Chronic Pancreatitis in Patients with Inborn Errors of Metabolism', *Pancreatology*, vol. 1, no. 5, pp. 448–456, Jan. 2001, doi: 10.1159/000055846.

- [339] A. Matsuda *et al.*, ‘Pancreatic Fat Accumulation, Fibrosis, and Acinar Cell Injury in the Zucker Diabetic Fatty Rat Fed a Chronic High-Fat Diet’, *Pancreas*, vol. 43, no. 5, pp. 735–743, Jul. 2014, doi: 10.1097/MPA.0000000000000129.
- [340] M.-X. Yan, Y.-Q. Li, M. Meng, H.-B. Ren, and Y. Kou, ‘Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia’, *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 347, no. 1, pp. 192–199, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.063.
- [341] J. Ciapaite *et al.*, ‘Functioning of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of high-fat diet fed rats’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1772, no. 3, pp. 307–316, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.bbadis.2006.10.018.
- [342] A. Ferramosca, A. Conte, N. Moscatelli, and V. Zara, ‘A high-fat diet negatively affects rat sperm mitochondrial respiration’, *Andrology*, vol. 4, no. 3, pp. 520–525, May 2016, doi: 10.1111/andr.12182.
- [343] A. Ruiz-Ramírez, M. Chávez-Salgado, J. A. Peñeda-Flores, E. Zapata, F. Masso, and M. El-Hafidi, ‘High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria’, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 301, no. 6, pp. E1198–E1207, Dec. 2011, doi: 10.1152/ajpendo.00631.2010.
- [344] E. QUAGLIARIELLO and F. PALMIERI, ‘Control of Succinate Oxidation by Succinate-Uptake by Rat-Liver Mitochondria’, *Eur J Biochem*, vol. 4, no. 1, pp. 20–27, Mar. 1968, doi: 10.1111/j.1432-1033.1968.tb00167.x.
- [345] J. S. Ruas, E. S. Siqueira-Santos, I. Amigo, E. Rodrigues-Silva, A. J. Kowaltowski, and R. F. Castilho, ‘Underestimation of the Maximal Capacity of the Mitochondrial Electron Transport System in Oligomycin-Treated Cells’, *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0150967, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0150967.
- [346] Gnaiger Erich, *Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis.*, 5th ed., vol. 2020. Bioenerg Commun, 2020.

- [347] R. Moreno-Sánchez, M. T. Espinosa-García, and J. C. Raya, 'Control of Respiration and ATP Hydrolysis in Uncoupled Mitochondria', in *Integration of Mitochondrial Function*, Boston, MA: Springer US, 1988, pp. 297–304. doi: 10.1007/978-1-4899-2551-0_26.
- [348] M. J. Bergeron, B. Clémenton, M. A. Hediger, and D. Markovich, 'SLC13 family of Na⁺-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters', *Mol Aspects Med*, vol. 34, no. 2–3, pp. 299–312, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.12.001.
- [349] A. P. Halestrap, 'The SLC16 gene family – Structure, role and regulation in health and disease', *Mol Aspects Med*, vol. 34, no. 2–3, pp. 337–349, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.05.003.
- [350] Y. Kanai *et al.*, 'The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family', *Mol Aspects Med*, vol. 34, no. 2–3, pp. 108–120, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.mam.2013.01.001.
- [351] A. D'Alessandro *et al.*, 'Plasma succinate is a predictor of mortality in critically injured patients', *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, vol. 83, no. 3, pp. 491–495, Sep. 2017, doi: 10.1097/TA.0000000000001565.
- [352] S. Lewis *et al.*, 'Combination of the CRAC Channel Inhibitor CM4620 and Galactose as a Potential Therapy for Acute Pancreatitis', *Function*, vol. 5, no. 4, Jul. 2024, doi: 10.1093/function/zqae017.
- [353] D. B. Hamo-Giladi *et al.*, 'Involvement of heparanase in the pathogenesis of acute pancreatitis: Implication of novel therapeutic approaches', *J Cell Mol Med*, vol. 28, no. 17, Sep. 2024, doi: 10.1111/jcmm.18512.
- [354] S. Turkyilmaz *et al.*, 'Ethyl pyruvate treatment ameliorates pancreatic damage: evidence from a rat model of acute necrotizing pancreatitis', *Archives of Medical Science*, vol. 15, no. 1, pp. 232–239, 2019, doi: 10.5114/aoms.2017.65231.
- [355] Z.-G. Luan, X.-C. Ma, H. Zhang, C. Zhang, and R.-X. Guo, 'Protective effect of ethyl pyruvate on pancreas injury in rats with severe acute pancreatitis', *Journal of Surgical Research*, vol. 181, no. 1, pp. 76–84, May 2013, doi: 10.1016/j.jss.2012.05.066.

- [356] T. Higashi *et al.*, 'FDG uptake, GLUT-1 glucose transporter and cellularity in human pancreatic tumors.', *J Nucl Med*, vol. 39, no. 10, pp. 1727–35, Oct. 1998.

ДОДАТОК

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Статті:

1. Merlavsky V. M., **Manko B. O.**, Ikkert O. V., Manko V. V. Experimental substantiation of permeabilized hepatocytes model for investigation of mitochondria in situ respiration // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87(6). – P. 113–121. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування і виконання експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
2. **Manko B.O.**, Bilonoha O.O., Manko V.V. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization // Ukr. Biochem. J.– 2019. – Vol. 91, № 3. – P. 34–45 (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, написання рукопису, участь у виконанні експериментів і підготовці статті до друку*).
3. Mazur H.M., Merlavsky V.M., **Manko B.O.**, Manko V.V. Dependence of the mitochondrial adaptive capacity of hepatocytes on the oxidative substrates availability // Ukr. Biochem. J. – 2019. – Vol. 91(6). – P. 5–14. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
4. Білонога О.О., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Влив ацетилхоліну та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози // Фізіол. журн. – 2019. – Т. 65, № 4. – С. 73–81. (*Фахове видання України, категорія А; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
5. Мазур Г.М., Мерлавський В.М., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Залежність адаптаційної здатності мітохондрій печінки від способу виділення клітин // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2020. – Вип. 82. – С. 177–185. (*Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування*

експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку).

6. Bilonoha O., **Manko B.O.**, Manko V. Effects of insulin on adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2020. – Випуск 83. – С. 24–30. *(Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку).*
7. Mazur H. M., Merlavsky V. M., **Manko B.O.**, Manko V. V. mPTP opening differently affects electron transport chain and oxidative phosphorylation at succinate and NAD-dependent substrates oxidation in permeabilized rat hepatocytes // Ukr. Biochem. J. – 2020. – Vol. 92(4). – P. 14–23. *(Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: участь у плануванні експериментів, аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку).*
8. **Manko B.O.**, Bilonoha O.O., Voloshyn D.M., Zub A.M., Ivasechko I.I., Manko V.V. Pyruvate and glutamine define the effects of cholecystokinin and ethanol on mitochondrial oxidation, necrosis, and morphology of rat pancreatic acini // Pancreas. – 2021. – Vol. 50 (3). – P.972–981. *(Scopus, WoS, IF=2,9, Q2; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, написання рукопису, участь у виконанні експериментів і підготовці статті до друку).*
9. Zub A., Manko O.V., **Manko B.O.** The effects of ammonia and glutamine on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2021. – Випуск 84. – С. 105–112. *(Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису, аналізі даних і підготовці статті до друку).*
10. Zub A, Manko B.V., **Manko B.O.**, Manko V., Babsky A. Uncoupled respiration stability of isolated pancreatic acini as a novel functional test for cell vitality // Biol. Stud. – 2023. – Vol.17(3). – P. 243–252. *(Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку).*

11. Zub A.M., Ostapiv R.D., **Manko B.O.**, Manko V.V. Sodium pyruvate improves the plasma amino acid profile in rats with l-arginine-induced acute pancreatitis // *Amino Acids*. – 2023. – Vol. 55. – P. 1447–1454. (*Scopus, WoS, IF=3,0, Q2; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
12. Manko B.V., Kozopas N.M., Mazur H.M., Voityk A.M., **Manko B.O.**, Manko V.V. Bioenergetic functions of mitochondria in liver, pancreatic acinar cells, and sperm cells of rats fed short-term high-fat or high-fat high-sugar diets // *Ukr. Biochem. J.* – 2023. – Vol. 95, Is. 5. – P. 51–60. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: участь у плануванні експериментів, аналізі даних, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
13. Мазур Г., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Вплив етанолу та циклоспорину А на дихання ізольованих гепатоцитів щурів // *Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол.* – 2024. – Вип. 91. – С. 86–91. (*Фахове видання України, категорія Б; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у написанні рукопису, аналізі даних і підготовці статті до друку*).
14. Bilonoha O.O., Mazur H.M., **Manko B.O.**, Kulachkovsky O.R., Manko V.V. Effect of long-term ethanol consumption and a high-fat diet on mitochondrial respiration in rat pancreatic acinar cells and hepatocytes // *Ukr.Biochem .J.* – 2024. –Vol. 96, Is. 4. – P. 25–32. (*Scopus; Q4; Особистий внесок здобувача: плануванні експериментів, аналіз даних, участь у написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
15. Zub A.M., **Manko B.O.**, Manko V.V. Screening of amino acids as a safe energy source for isolated rat pancreatic acini // *Pancreas*. –2024. – Vol 53 (8). – P. e662–e669. (*Scopus, WoS, IF=2,9, Q2; Особистий внесок здобувача: планування експериментів, участь у аналізі даних, виконанні експериментів, написанні рукопису і підготовці статті до друку*).
16. Bilonoha O., Manko B.O., Mazur H., Manko V. Effects of acute alcohol intoxication on the respiration and dehydrogenase activity of rat pancreatic acini

Патенти:

1. Пат. 60528 Україна, МПК (2011.01), G01N 33/50 (2006.01), A01N 61/00. Спосіб дослідження дихання мітохондрій *in situ* / Манько В.В., **Манько Б.О.**, Мерлавський В.М., Великопольська О.Ю. ; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201013449; заявл. 12.11.2010 ; опубл. 25.06.2011, Бюл. № 11. – 6 с.
2. Пат. 118816 Україна, МПК, G01N 33/483 (2006.01), C12N 5/071 (2010.01). Спосіб оцінки функціонального стану мітохондрій / **Манько Б.О.**, Сідорова О.О., Манько В.В. ; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201702649; заявл. 21.03.2017 ; опубл. 28.08.2017, Бюл. № 16. – 5 с.
3. Пат. 118820 Україна, МПК, G01N 33/00. Спосіб підвищення енергозабезпечення ацинарних клітин підшлункової залози / **Манько Б.О.**, Сідорова О.О., Манько В.В. ; заявник і власник Львівський національний університет імені Івана Франка. – № u201702662; заявл. 21.03.2017 ; опубл. 28.08.2017, Бюл. № 16. – 6 с.

Тези доповідей на конференціях, з'їздах і симпозіумах

1. Сідорова О., **Манько Б.**, Волошин Д., Манько В. Вплив ацетилхоліну і холецистокініну на базальне дихання і максимальну окисну здатність дихання інтактних панкреатичних ацинусів за окиснення пірувату і глутаміну // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 20–23 квітня 2015 р): Збірник тез. – Львів, 2015. – С. 496–497.

2. Сідорова О.О., Манько Б.В., Волошин Д.М., **Манько Б.О.** Мембранопроникні субстрати окиснення змінюють максимальну окисну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози // VI з'їзд Українського біофізичного товариства (28–30 травня 2015 р., Луцьк – Світязь): матеріали з'їзду. – Луцьк, 2015. – С. 27.
3. Сідорова О., Манько Б.О., Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій та стійкість процесів мітохондріального дихання ацинарних панкреатитів // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2016 р.) : Збірник тез. – Львів, 2016. – С.; 311–312.
4. Сідорова О., Манько Б.В., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Мембранний блебінг і дихання інтактних панкреатичних ацинусів за дії алкоголю *in vivo* // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2016 р.) : Збірник тез. – Львів, 2016. – С. 312–313.
5. Мазур Г., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Вплив субстратів окиснення на максимальну окисну здатність мітохондрій інтактних гепатоцитів // XII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2016 р.) : Збірник тез. – Львів, 2016. – С. 300–301.
6. **Manko B.**, Sidorova O., Manko V. Assessing mitochondrial bioenergetics in live cells: when maximum is not enough. Third Kyiv International Symposium “Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: from genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities”. – Kyiv–Lutsk, 2017. –P. 64.
7. Манько В.В., **Манько Б.О.**, Сідорова О., Мазур Г.М., Манько Б.В. Алкоголь за хронічного введення на тлі високожирної дієти порушує мітохондріальні дихання панкреатитів, але не гепатоцитів // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології : Тези доповідей VIII Міжнародної наукової конференції, присвяченої 175-річчю

кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 17–20 жовтня 2017 р.). – Київ, 2017. – С. 69.

8. Котик Б., Сідорова О.О., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Роль глутаміну і пірувату у забезпеченні мітохондріального окиснення ацинарних клітин підшлункової залози щурів за умов панкреатиту *in vitro* // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 259–260.
9. Пазюк О., Сідорова О.О., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Вплив алкоголю *in vivo* на мітохондріальне дихання ацинарних клітин підшлункової залози за розвитку панкреатиту // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 263– 264.
10. Сідорова О.О., Манько Б.В., Мерлавський В.М., **Манько Б.О.** Функціональний стан мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 267–268.
11. Мазур Г., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій інтактних гепатоцитів щурів за тривалого введення алкоголю на тлі високожирової дієти // XIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 25–27 квітня 2017р.) : Збірник тез. – Львів, 2017. – С. 261–262.
12. Манько Б.В., Сідорова О., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Мембранний потенціал мітохондрій як критерій оцінки адаптаційної здатності мітохондрій // XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (Львів, 10–12 квітня 2018 р.) : Збірник тез. – Львів, 2018. – С. 287–288.

13. Якубовська А. Сідорова О., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Вплив глутаміну на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози // XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 185 річниці від дня народження Б. Дибовського (Львів, 10–12 квітня 2018 р.) : Збірник тез. – Львів, 2018. – С. 291–292.
14. Манько В.В. Білонога О.О., **Манько Б.О.** Максимальна адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози // Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 29 – 31 жовтня 2018 р) – Київ, 2018. – С. 9.
15. Мазур Г.М., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій залежить від рівня експресії у клітинах транспортерів та їхньої спорідненості до субстратів окиснення // Матеріали Тематичного VII з'їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 29 – 31 жовтня 2018 р) – Київ, 2018. – С. 20.
16. Якубовська, А., **Манько, Б.О.**, Манько, В.В. Вплив аргініну і лізину на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів // XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 27–30 травня 2019 р.). – Київ, 2019. – С. 32.
17. Мазур Г.М., Мерлавський В.М., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Адаптаційна здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів щурів // XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 27–30 травня 2019 р.). – Київ, 2019. – С. 32–33.
18. **Манько Б.О.**, Манько В.В. Методи оцінки та механізми реалізації адаптаційної здатності мітохондрій різних тканин // XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (Київ, 27–30 травня 2019 р.). – Київ, 2019. – С. 34–35.

19. Галан С., Мазур Г., Мерлавський В., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Адаптаційна здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів залежить від способу виділення клітин // XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 135-річниці від дня народження Я. Парнаса (Львів, 9–11 квітня 2019 р.) : Збірник тез. – Львів, 2019. – С. 148–149.
20. Fedashko, V., Yakubovska, A., Ivasechko, I., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Effects of hyperstimulation by cholecystokinin on viability of rat pancreatic acinar cells // XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 135-річниці від дня народження Я. Парнаса (Львів, 9–11 квітня 2019 р.) : Збірник тез. – Львів, 2019. – С. 141.
21. Nadych, A., Yakubovska, A., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Effects of glutamine and NH_4Cl on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells // XV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 135-річниці від дня народження Я. Парнаса (Львів, 9–11 квітня 2019 р.) : Збірник тез. – Львів, 2019. – С. 141–142.
22. Зуб, А., **Манько, Б.О.**, Манько, В.В. Залучення амінокислот у процеси мітохондріального дихання впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози щурів // Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства (Київ, 12–15 листопада 2019 р) – Київ, 2019. – С. 33.
23. Галан С., Мазур Г., Мерлавський В., **Манько Б.О.**, Манько В.В. Вплив етанолу *in vitro* на дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату або монометилсукцинату // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 75-річниці створення біологічного факультету та 90-річниці від дня народження М. Деркача (Львів, 27–29 квітня 2020 р.) : Збірник тез. – Львів, 2020. – С. 172–173.
24. Chipak S., Zub A., Ostapiv R., **Manko B.O.**, Manko V.V. Influence of sodium pyruvate on pancreatic morphology and amino acid blood levels in rats with arginine-induced acute pancreatitis // XVI Міжнародна наукова конференція

студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 75 річниці створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача (Львів, 27–29 квітня 2020 р.) : Збірник тез. – Львів, 2020. – С.182–183.

25. Shostak, M., Zub, A., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Effect of high concentrations of amino acids on apoptosis and necrosis in rat pancreatic acinar cells // XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології”, присвячена 75 річниці створення біологічного факультету та 90 річниці від дня народження М. Деркача (Львів, 27–29 квітня 2020 р.) : Збірник тез. – Львів, 2020. – С. 200.
26. Марцинюк І., Мазур Г. М., Мерлавський В. М., **Манько Б. О.**, Манько В. В. Вплив етанолу in vitro на окисні процеси у мітохондріях гепатоцитів щурів // XVII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, 19–21 квітня 2021 р.) : Збірник тез. – Львів, 2021. – С. 208–209.
27. Zub, A., **Manko, B.O.**, Manko, V.V. Viability of pancreatic acinar cells under the influence of amino acids in high concentration // XVIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” , присвячена 195 річниці від дня народження Юліуса Планера: (Львів, 6–7 жовтня 2022 р.) : Збірник тез. – Львів, 2022. – С. 164–165.
28. Manko V.V., **Manko B.O.**, Babsky A. Automatic analysis of biological suspensions oxygen consumptions signals // XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 90-річчю від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга-Сосонка Юрія Романовича (Львів, 26–28 квітня 2023 року) : Збірник тез. – Львів, 2023. – С. 188–189.
29. Погоріла К., Дранчук Т., Мазур Г., Манько Б., Манько В. Програмний пайплайн для автоматичної сегментації ізольованих гепатоцитів і вимірювання мітохондріального мембранного потенціалу і флуоресценції НАДН // XX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів

«Молодь і поступ біології», присвячена 90-річчю від дня народження професора Ореста Демківа (Львів, 18–20 квітня 2024 року) : Збірник тез. – Львів, 2024. – С. 330–331.