

НАЦІОНАЛНА АКАДЕМАЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна

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

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня доктора наук

Київ – 2025

Дисертацію є рукопис.

Робота виконана в Львівському національному університеті імені Івана Франка
МОН України

Науковий консультант:

доктор біологічних наук, професор
Бабський Андрій Мирославович,
Завідувач кафедри біофізики та
біоінформатики Львівського національного
університету імені Івана Франка.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий
співробітник

Данилович Юрій Володимирович,
Провідний науковий співробітник інституту
біохімії імені О.В. Палладіна НАН України;

доктор біологічних наук, професор
Лушак Володимир Іванович,
Професор кафедри біохімії та біотехнології
Карпатського національного університету
імені Василя Стефаника;

доктор біологічних наук, професор
Кобилінська Леся Іванівна,
Завідувач кафедри біологічної хімії
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького

Захист відбудеться « ____ » _____ 202__ року о _____ годині на
засіданні спеціалізованої вченої ради Д **26.240.01** Інституту біохімії імені О.В.
Палладіна НАН України (вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01054).

Із дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту біохімії імені
О.В. Палладіна НАН України (вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01054).

Автореферат розісланий « ____ » _____ 2025 року.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук, професор

О.П. Матишевська

Обґрунтування вибору теми дослідження.

Важко переоцінити роль мітохондрій у забезпеченні функціонування ацинарних клітин підшлункової залози і гепатоцитів. В обох типах клітин окисне фосфорилування, поряд із гліколізом, є основним джерелом синтезу АТФ, необхідного для забезпечення клітинних процесів [Nieminen et al., 1994; Nishikawa et al., 2014; Voronina et al., 2010]. Мітохондрії також залучені у процесах Ca^{2+} -сигналювання [Robb-Gaspers, 1998; Voronina et al., 2010], регуляції клітинної смерті [Bock et al., 2020; Rasola, Bernardi, 2011] та у багатьох метаболічних шляхах.

Інтенсивність мітохондріального дихання і окисного фосфорилування у живих клітинах не є постійною: вона залежить від потреб клітин у АТФ і тонко регулюється багатьма механізмами [Bennett et al., 2022]. Рівень базального дихання у стані спокою клітини відображає лише незначну частку здатності мітохондрій до окисного фосфорилування. Таку здатність, яка характеризує адаптаційні можливості мітохондрій, прийнято оцінювати за максимальною швидкістю роз'єданого дихання ізольованих мітохондрій з використанням протонофорів [Brand, Nicholls, 2011]. Однак на моделях клітин цей підхід стикається з труднощами, зокрема, зниженням швидкості дихання за високих доз протонофора, обмеженою швидкістю транспорту субстратів крізь плазматичну мембрану, зниженням рН цитозолу тощо. Для врахування цих факторів необхідне вдосконалення способів оцінки адаптаційної здатності мітохондрій у ізольованих клітинах.

Тяжкі хвороби підшлункової залози та печінки, пов'язані з вживанням алкоголю та ожирінням, призводять до високої смертності серед населення [Knudsen et al., 2020; Wu et al., 2008; Younossi et al., 2016]. Рівень захворюваності на гострий панкреатит та цироз у Європі постійно зростає, особливо у країнах східної Європи, де причиною є зростання вживання алкоголю [Pimpin et al., 2018; Ramstedt et al., 2007; Roberts et al., 2017]. Іншим фактором є вживання високої кількості жирів та легкозасвоюваних вуглеводів, що веде, серед іншого, до розвитку неалкогольної хвороби печінки [Lujan et al., 2021] та жирового переродження підшлункової залози [Petrov, Taylor, 2022]. Вважають, що недостатня адаптація окисних систем мітохондрій до деполяризації та їх ушкодження є одним із механізмів розвитку цих захворювань підшлункової залози [Armstrong et al., 2018; Huang et al., 2014; Mukherjee et al., 2008] і печінки [Zhong, Lemasters, 2018]. Максимальне роз'єдане дихання є важливим експериментальним параметром, який корелює зі станом клітини [Brand, Nicholls, 2011; Pflieger, Abdellatif, 2015; Armstrong et al., 2018]. У ацинарних панкреатитах воно знижується при аноксії [Kosowski et al., 1998] та експериментальному панкреатиті [Schulz et al., 1995]. У печінці мишей відбувається збільшення експресії компонентів дихального ланцюга й зростання максимального роз'єданого дихання як адаптація до хронічного введення етанолу [Han et al., 2017].

Основними аспектами роботи є з'ясування особливостей адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози в нормі й за дії патогенних факторів, порівняльний аналіз із адаптаційною здатністю мітохондрій гепатоцитів і пошук оптимального субстрату окиснення для підтримання життєздатності ацинарних клітин за моделей гострого панкреатиту.

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 « Ca^{2+} -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), проекту у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дієтарних чинників» (2021–2023 рр., № держреєстрації 0121U110302), проекту «Механізми реалізації окисного потенціалу мітохондрій клітин підшлункової залози, печінки та лімфоми NK-Ly» (2015–2016 рр), фінансованого компанією «Material Phases Data System» і проекту «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 (Ст'юдента 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 отриманих 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 панкреатити 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 панкреатитів 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 отриманих 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 родамину 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 симпозіумі “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 симпозіумів. Сумарний імпакт-фактор публікацій за темою дисертації – 8,8.

Дисертацію на здобуття ступеня кандидата наук «Взаємозалежність між процесами дихання і Ca^{2+} -сигналізації екзокринних секреторних клітин підшлункової залози» за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин» було захищено 20 грудня 2013 р. Жодні матеріали і висновки цієї дисертації не були використані у тексті дисертації на здобуття ступеня доктора наук.

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 пунктів). Дисертація викладена на 252 сторінках і проілюстрована 72 рисунками та 22 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень

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-Mікс». 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.

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, 34,4%) або високим вмістом жирів (38%) та цукру (сахароза, 19,4%). Цукор та смалець додавали до сухого корму, до води не додавали нічого.

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів (8-12 клітин) і ацинарних груп (до 100 клітин) отримували з використанням колагенази за модифікованим методом Вільямса (1978); для простоти надалі у тексті використано термін

«ацинарні панкреацити». Гепатоцити отримували з використанням колагенази двома способами: з прижиттєвою та *in vitro* перфузією печінки. Мітохондрії печінки щурів отримували стандартним методом диференційного центрифугування у розчині сахарози.

Споживання кисню реєстрували полярографічним методом за допомогою кисневого електрода Кларка. Флуоресцентну мікроскопію проводили за допомогою інвертованого мікроскопа IX73 та камери DP-74. Зображення обробляли за допомогою програми ImageJ. Концентрацію родаміну 123 у цитоплазмі досліджували спектрофотометрично. Активність амілази визначали йод-крохмальною колориметрією або турбідиметричним кінетичним методом. Високоєфективну рідинну хроматографію амінокислот плазми крові здійснювали на базі Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Концентрацію етанолу у плазмі крові визначали методом газо-рідинної хроматографії на базі Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького з допомогою хроматографа «Chrom-5», оснащеного полум'яно-іонізаційним детектором. Гістологічні препарати підшлункової залози фарбували еозин-гематоксиліном. Трансмісійну електронну мікроскопію здійснювали за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100 з цифровою камерою Sony – H9. Тотальну ДНК екстрагували модифікованим кислотно фенольно-хлороформним методом за Хомчинським. Кількість фрагментованої і високомолекулярної ДНК визначали колориметричним дифеніламіновим методом Бертонна. Електрофорез ДНК проводили у 1 % агарозі з використанням буферного розчину ТБЕ. Концентрацію глюкози, тригліцеридів, загального холестеролу, ліпопротеїнів високої і низької щільності визначали з наборами «Філісіт-діагностика» використовуючи спектрофотометр DeNovix DS-11+.

Для обробки зображень було створено декілька макросів для програмного пакету ImageJ. Макроси здатні автоматично ідентифікувати ацинарні панкреацити, 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. 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. 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. У всіх статистичних тестах рівень α становив 0,05.

Результати досліджень та їхнє обговорення

1. Автоматичні програмні рішення для аналізу результатів досліджень. 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, регресія Губера, пошук лінійної ділянки кривої та інші. Поєднання деяких з цих підходів з новим «човниковим» алгоритмом пошуку лінійної ділянки лягло в основу нашого програмного рішення.

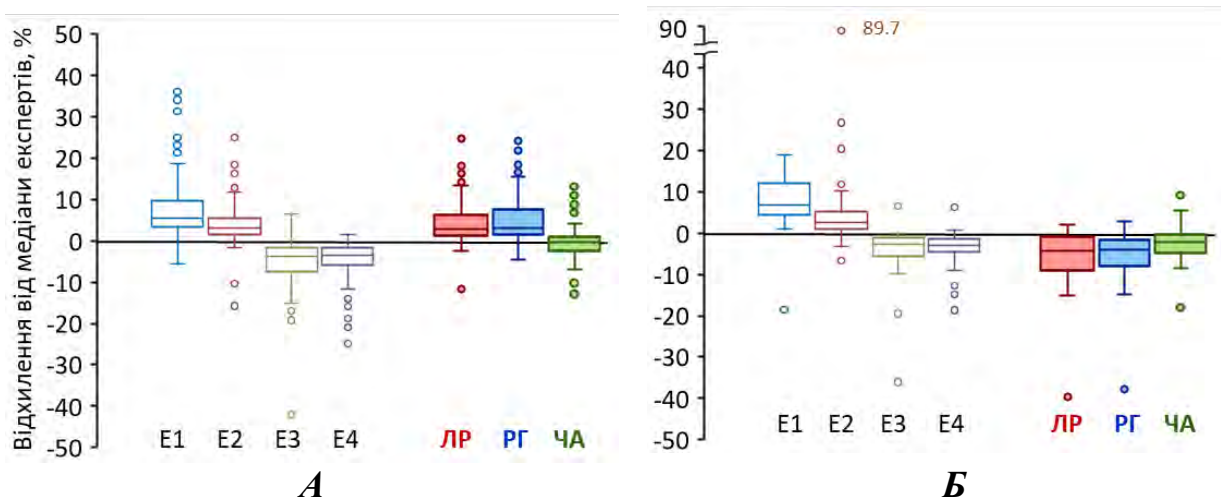


Рис. 1. Алгоритми мають перевагу над експертами у точності оцінки швидкості дихання ацинарних панкреатитів: А – завдання «максимум», Б – завдання «лінійність», E1–E4 – експерти, ЛР – лінійна регресія, РГ – регресія Губера, ЧА – човниковий алгоритм; n = 126 (А) або 32 (Б)

Для тестування алгоритму ми вибрали 348 різних фрагментів записів дихання мітохондрій печінки та ацинарних панкреатитів, для яких було проведено два паралельні вимірювання. Ці дані було опрацьовано чотирма експертами і трьома алгоритмами. Оскільки ми не можемо знати справжніх величин швидкостей дихання у кожному вимірюванні, ми взяли за умовний «золотий стандарт» медіану оцінок всіх експертів. Відхилення від медіани оцінок записів дихання ацинарних панкреатитів представлені на рис. 1. Човниковий алгоритм показав значну перевагу над іншими алгоритмами і більшістю експертів, наближаючись в оцінках до медіани, подібно до експерта 4.

Для сегментації гепатоцитів та автоматичного визначення інтенсивності їх флуоресценції було написано макроси у програмі ImageJ. Запропоновано три алгоритми: базовий, посилене виявлення і усунення розмиття (табл. 1). 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. 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.

Таблиця 1.

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

2. Особливості адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих ацинарних панкреатитів. Для оцінки впливу субстратів окиснення на дихання, стимульоване FCCP, у середовище додавали глюкозу, піруват або глутамін, а ізольовані ацинарні панкреатити інкубувалися впродовж 15 хвилин при 37 °С. Швидкість базального дихання панкреатитів не залежала від субстрату окиснення (рис. 2). Глюкоза і глутамін, на відміну від глюкози і пірувату, адитивно впливають на FCCP-стимульоване дихання цих клітин. Очевидно, це тому, що піруват є продуктом гліколізу, а окиснення глутаміну не включає початкові етапи циклу трикарбонових кислот.

У іншому експерименті дослідили вплив субстратів циклу Кребса (малат, ізоцитрат, сукцинат та α -кетоглутарат) чи їх естерів (монометилсукцинат, диметил- α -кетоглутарат) на дихання ацинарних панкреатитів. Естери найкраще стимулювали роз'єднане дихання панкреатитів, на відміну від малату, ізоцитрату, сукцинату та α -кетоглутарату, вочевидь через повільний їх транспорт через плазматичну мембрану.

Для характеристики адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних панкреатитів при максимальних навантаженнях протонофором ми визначали два параметри (табл. 2): максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію FCCP (концентрацію, при якій досягалось максимальне дихання). 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, глутамін, монометилсукцинат, диметил- α -кетоглутарат чи їх комбінації).

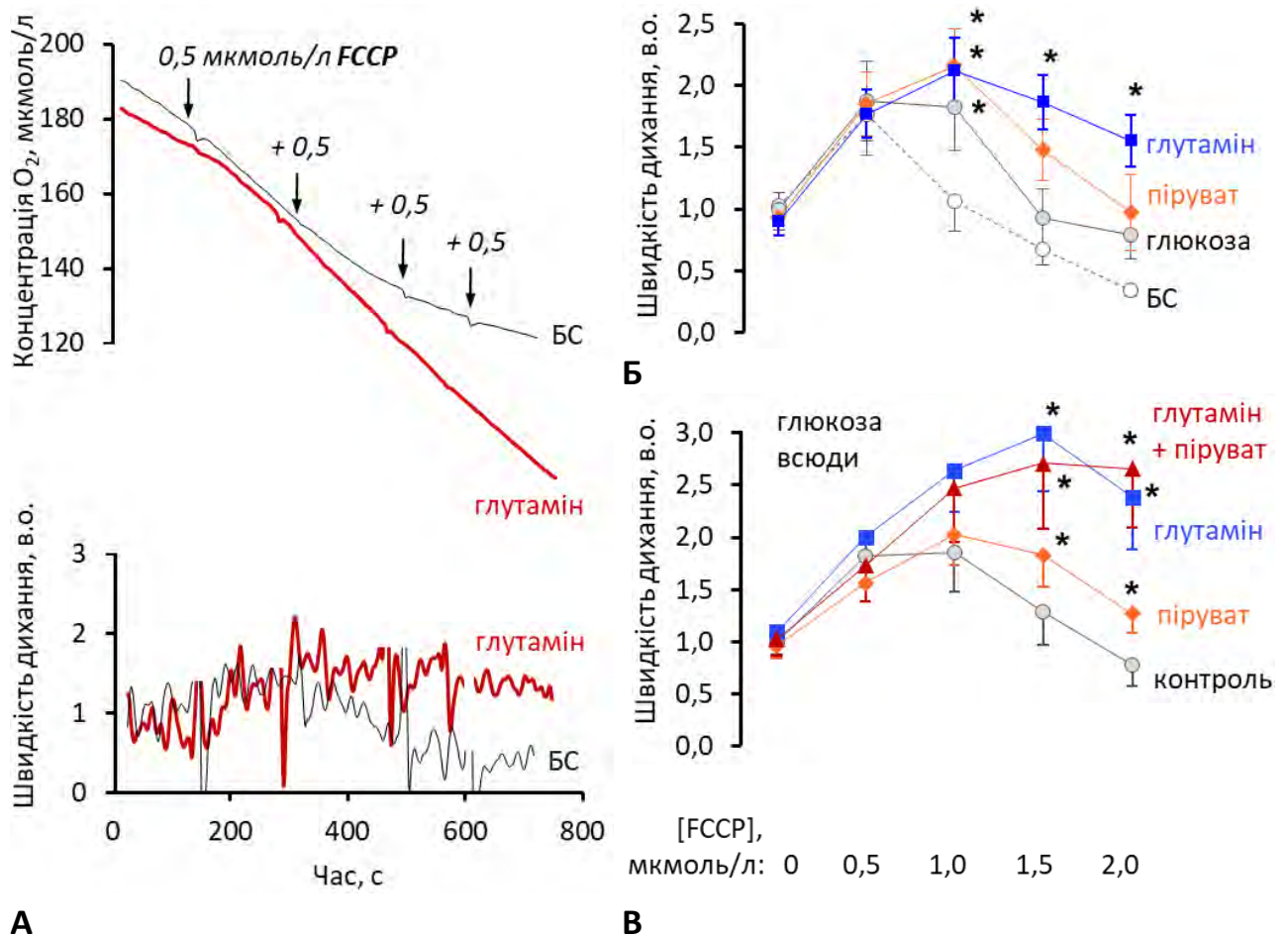


Рис. 2. Піруват і глутамін підтримують високу швидкість протоніформованого дихання ацинарних панкреатитів; А – репрезентативний оригінальний запис дихання (зверху) та розрахована миттєва швидкість дихання (знизу); Б – контролем було середовище без субстратів (БС); В – глюкоза присутня у всіх експериментах;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

Найвища адаптаційна здатність мітохондрій проявилась за наявності у середовищі комбінації глюкози, пірувату та глутаміну. 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. Після внесення протоніформера можна умовно виділити три фази дихання: 1) коротка фаза прискорення дихання; 2) пік максимального дихання; 3) тривала фаза сповільнення (пригнічення) дихання. Встановлено, що прискорення і сповільнення кисню зростають зі збільшенням концентрації FCCP, а також залежать від типу субстрату.

Характеристика роз'єданого дихання
ацинарних панкреатитів 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 $P < 0,05$

Загалом, пригнічення дихання протонофорами в основному залежить від тривалості дії FCCP, а за високих «неоптимальних» концентрацій розвивається швидше. Найменшим для ацинарних панкреатитів воно було за окиснення диметил- α -кетоглутарату і глутаміну, а найвищим – за наявності малату чи ізоцитрату.

Швидкість роз'єданого дихання залежала від мітохондріального мембранного потенціалу, визначеного за флуоресценцією родаміну 123. 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.

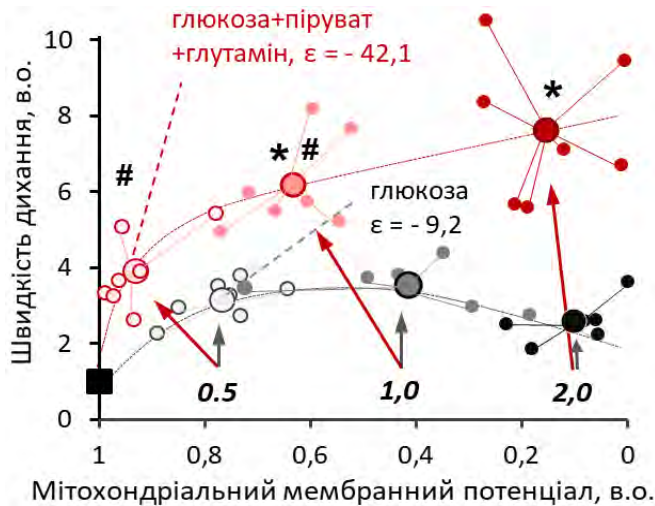


Рис. 3. Залежність дихання від мітохондріального мембранного потенціалу ацинарних панкреатитів щурів: дані всіх експериментів (малі маркери) та середні значення (великі маркери), дані нормалізовано до значень за присутності олігоміцину (5 мкмоль/л, квадрат), ϵ – коефіцієнт еластичності, статистично вірогідна різниця швидкості дихання (*) чи мітохондріального мембранного потенціалу (#) щодо експерименту з глюкозою з $P < 0,05$, $n = 6$

Коефіцієнт еластичності завжди був негативним і залежав від субстрату окиснення: комбінації глюкози, глуматину та пірувату еластичність була найвищою (-42,1), а за окиснення монометилсукцинату – найнижчою (-2,6). Важливим фактом є те, що оптимальна комбінація субстратів (глюкоза, глутамін, піруват) не лише покращувала адаптаційну здатність мітохондрій, а й знижувала протонфор-індуковану деполяризацію (рис. 3).

На наступному етапі ми досліджували вплив 15 хв преінкубації з помірними концентраціями ацетилхоліну (4,5 мкмоль/л) та холецистокініном (ХЦК, 0,5 нмоль/л) на роз'єднане дихання. За окиснення глюкози обидва агоністи спричиняли стимуляцію базального дихання на 16–25%, однак не впливали на роз'єднане дихання. Первинні агоністи ацетилхолін, холецистокінін та інсулін стимулювали окисні шляхи у ацинарних клітинах підшлункової залози, що проявляється у підвищенні швидкості максимального роз'єданого дихання, але не його стабільності (табл. 3). За впливу ацетилхоліну і холецистокініну ключовою є інтенсифікація окиснення пірувату, а інсулін посилює катаболізм глюкози, однак пригнічує ефект холецистокініну.

Таблиця 3

Характеристика роз'єданого дихання
ацинарних панкреатитів за дії ацетилхоліну, ХЦК та інсуліну

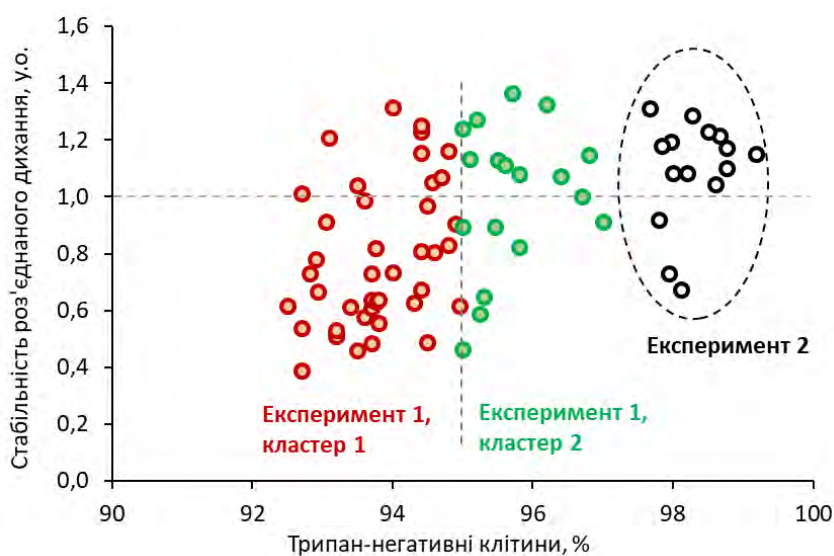
Умови	Оптимальна [FCCP], мкмоль/л	Максимальна швидкість дихання, в.о.
Глюкоза	$0,82 \pm 0,08$	$1,85 \pm 0,35$
+ ацетилхолін	$0,73 \pm 0,08$	$1,95 \pm 0,27$
+ ХЦК	$0,73 \pm 0,08$	$1,96 \pm 0,21$
Глюкоза і піруват	$1,17 \pm 0,10$	$2,32 \pm 0,45$
+ ацетилхолін	$1,10 \pm 0,19$	$3,62 \pm 0,64^*$
+ ХЦК	$1,33 \pm 0,10$	$3,19 \pm 0,53^*$
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, # – порівняно з дією ХЦК, $P < 0,05$

Результати багатьох експериментів показали, що незначна різниця у кількості трипан-позитивних клітин суттєво впливає на стабільність роз'єданого дихання за окиснення глюкози (рис. 4), але не змінює максимальної швидкості роз'єданого дихання.

Рис. 4 Стабільність роз'єданого дихання ізольованих ацинарних панкреатитів залежить від життєздатності клітин: експеримент 1 – прилад YSI 5300, експеримент 2 – Strathkelvin SI929; кластер 1 – життєздатність клітин нижче 95 %, кластер 2 – життєздатність клітин понад 95 %, $n = 74$



3. Роль пірувату і глутаміну в забезпеченні стійкості ацинарних клітин підшлункової залози до токсичної дії етанолу за стимуляції холецистокініном. Панкреацити спочатку преінкубували впродовж 30 хв з комбінацією ХЦК (0,1 нмоль/л) і етанолу (20 ммоль/л) у різних середовищах, що містили лише частину субстратів: глюкозу, піруват, глутамін чи додаток незамінних амінокислот, або всі ці речовини. 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, глутаміну і пірувату. 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.

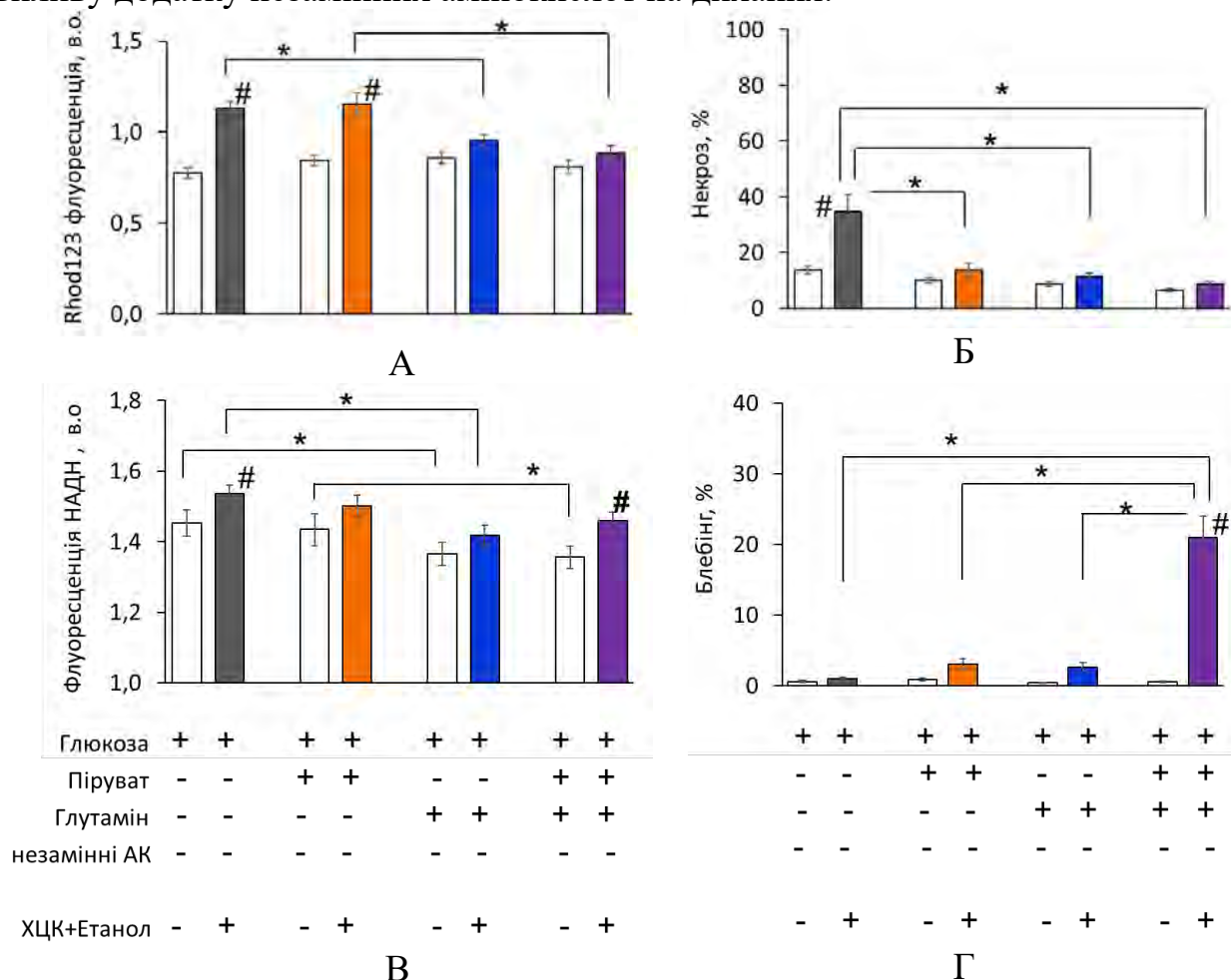


Рис. 5. Скорегована флуоресценція родаміну 123 (Rhod123, А), НАД(Ф)Н (В), некроз (Б) і блебінг (Г) ацинарних клітин підшлункової залози за дії ХЦК і етанолу: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, # – щодо контролю (без ХЦК і етанолу) з $P < 0,05$, $n=7$ або 6 (А)

Для дослідження флуоресценції НАД(Ф)Н, родаміну 123 та вивчення життєздатності клітини інкубували у середовищах з глюкозою, глутаміном і /або піруватом впродовж 2 годин. Статистично вірогідне зростання флуоресценції (зниження мембранного потенціалу) спостерігалось лише за дії ХЦК й етанолу і лише у випадках, коли в середовищі не було глутаміну. Глутамін однак спричиняв зниження автофлуоресценції НАД(Ф)Н як в контролі, так і за інкубації з ХЦК і етанолом (рис. 5В). 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. 5Б). Було виявлено статистично значуще зростання блебінгу за дії ХЦК й етанолу, причому лише за одночасної наявності у середовищі глюкози, глутаміну й пірувату (рис. 5Г).

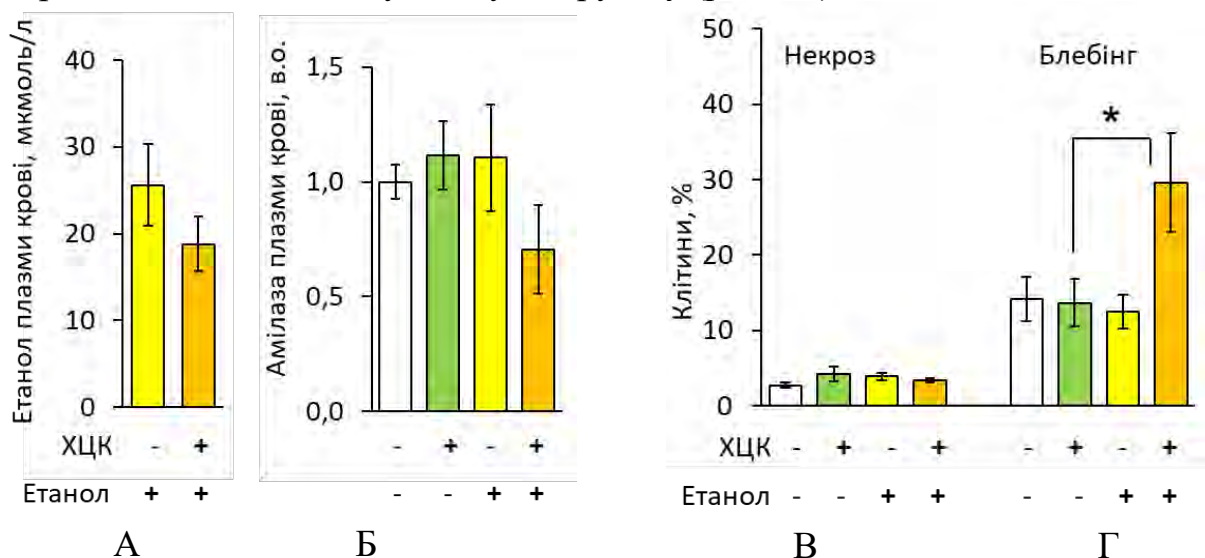


Рис. 6. Концентрація етанолу (А) та активність амілази (Б) у плазмі щурів після введення етанолу і/або ХЦК, а також життєздатність (В) і блебінг ацинарних клітин підшлункової залози одразу після виділення: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, $n = 7$

Для вивчення короточасного впливу етанолу та ХЦК на життєздатність і мітохондріальне дихання ацинарних панкреатитів було проведено експеримент *in vivo*. Концентрацію етанолу у плазмі через 2 години після його внутрішньошлункового введення 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. 6А). 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. 6Б).

Для дослідження впливу ХЦК й етанолу на підшлункову залозу ми ізолювали ацинарні панкреатити через 2 години після введення етанолу й через 1 годину після ін'єкції ХЦК. Кількість некротичних клітин у свіжих ізолюваних панкреатитах не змінювалась (рис. 6В). Проте, зростала частка клітин з мембранними блебами у групі тварин, яким вводили ХЦК і етанол – до 30% від загальної кількості клітин (рис. 6Г). Не виявлено зростання блебінгу за окремої дії ХЦК чи етанолу.

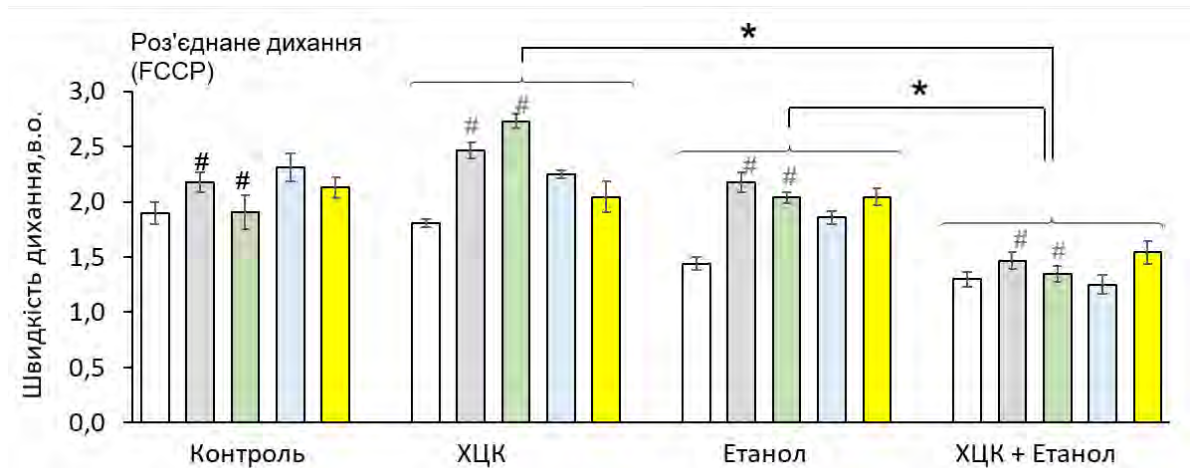


Рис. 7. Максимальне роз'єднане дихання ацинарних панкреатитів тварин, яким вводили етанол і/або ХЦК: субстрати окиснення розміщені у порядку глюкоза, глутамін, піруват, ДМ-кетоглутарат, ММ-сукцинат, * – статистично вірогідна різниця згідно ANOVA з $P < 0,05$; # – статистично вірогідний вплив пірувату і глутаміну з $P < 0,05$, $n = 7$ (у кожній групі)

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 7). Не виявлено ніяких змін стабільності роз'єданого дихання за введення етанолу чи ХЦК.

4. Амінокислоти як безпечне джерело енергії для ацинарних клітин підшлункової залози. У наступних серіях досліджень проведено скринінг амінокислот у концентраціях 0,1-20 ммоль/л на їх здатність підвищувати роз'єдане дихання ацинарних панкреатитів, що є свідченням їх окиснення у мітохондріях. Виявлено, що глутамат, глутамін (1-20 ммоль/л), аланін, лізин та аспартат (5-20 ммоль/л) окиснюються мітохондріями ацинарних панкреатитів, а стимуляція роз'єданого дихання амінокислотами є сильнішою за відсутності глюкози у середовищі. Не виявлено ознак окиснення аргініну, аспарагіну чи гістидину.

Іншим важливим критерієм вибору амінокислот для підтримання мітохондріального окиснення у підшлунковій залозі є їх безпечність для цих клітин. Після 24 годин інкубації у середовищі DMEM з додатковими досліджуваними амінокислотами (20 ммоль/л) виявлено, що аргінін, лізин та глутамін спричиняють загибель усіх клітин некротичним шляхом, що підтверджено за допомогою електрофорезу ДНК і флуоресцентної мікроскопії з пропідій йодидом (рис. 8). Глутамін також спричиняв статистично вірогідне зростання блебінгу і площі клітин (через 2–4 год. інкубації).

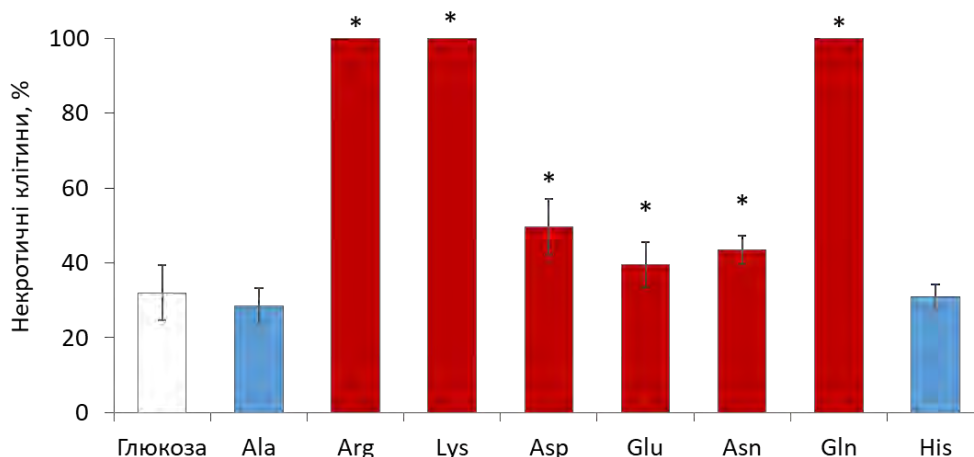


Рис. 8. Амінокислоти (20 ммоль/л) знижують життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози після інкубації впродовж 24 год у середовищі DMEM, окрім аланіну й гістидину: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю (глюкоза) з $P < 0,05$, $n = 8$

5. Введення пірувату за моделі аргінін-індукованого панкреатиту. Для моделювання гострого панкреатиту тваринам внутрішньоочеревинно вводили дві дози L-аргінін-HCl ($pH=7,4$) у розрахунку 2,5 г на кг маси тварини з інтервалом в одну годину. 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 зрізах підшлункових залоз, отриманих із тварин, яким вводили аргінін (незалежно від введення пірувату) було виявлено ознаки фіброзу. Не було ознак інфільтрації лімфоцитів, некрозу, чи набряку, очевидно, через пізнє дослідження (7 днів після епізоду панкреатиту).

Дослідження рівня амінокислот у плазмі щурів провели на 8 день експерименту. Рівень більшості незамінних амінокислот у плазмі щурів з панкреатитом статистично вірогідно знижувався: триптофан – на 49%, метіонін – на 27%, фенілаланін – на 40%, лейцин та ізолейцин (пікі 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. 4). Концентрація лізину у плазмі крові не відрізнялася між групами тварин.

Таблиця 4

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 *
Лізин	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.

6. Характеристика адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих гепатоцитів. У перших експериментах ми отримували ізольовані 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. У контролі (без субстратів окиснення) протонофор стимулював дихання, однак за його високої концентрації (1 мкмоль/л) воно в середньому дещо знижувалось. Виявилось, що глюкоза практично не впливала на базальне і роз'єднане дихання гепатоцитів, незалежно від наявності інших субстратів окиснення. 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.

Були проведені також додаткові дослідження впливу на дихання субстратів циклу Кребса сукцинату і α -кетоглутарату, а також їх більш проникних метилових естерів. Парадоксально, але швидкість базального та роз'єданого дихання зростала практично однаково як за наявності сукцинату, так і монометилсукцинату. 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'єднане дихання чинив лише естер цього субстрату. Також, підтверджено зростання максимальної швидкості роз'єданого дихання саме за диметил- α -кетоглутарату.

У іншому експерименті, коли клітини печінки ізолювали за умов перфузії печінки *in vitro*, багато особливостей дихання були подібними до попереднього досліду. 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: природні форми стимулювали дихання значно менше, що, очевидно, пов'язано не зі здатністю мітохондрій їх окиснювати, а з швидкістю транспорту через плазматичну мембрану.

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. 9). Доведено статистично вірогідну різницю для обох параметрів як у досліді без жодних субстратів, так і за окиснення глюкози, глутаміну, α -кетоглутарату і сукцинату (рис. 9). Для пірувату і метилових естерів доведено лише різницю у оптимальній концентрації протонофора.

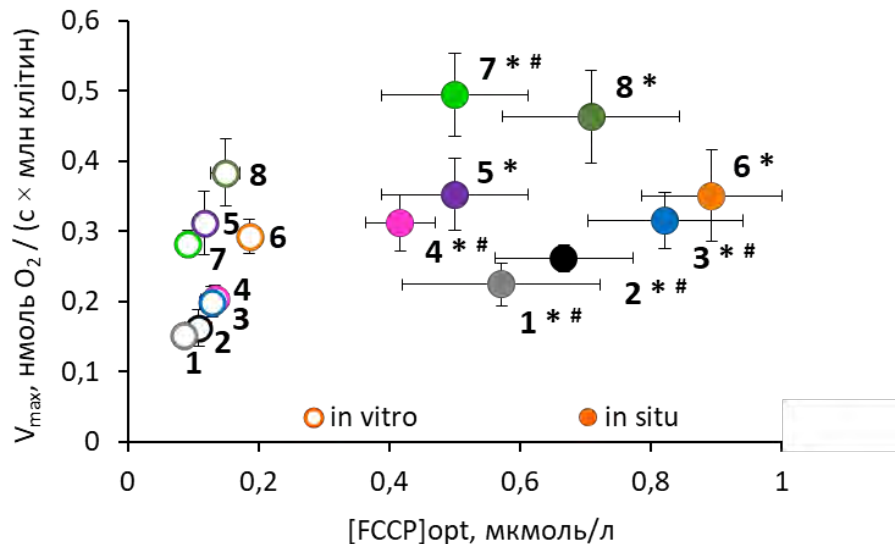


Рис. 9. Залежність параметрів роз'єданого дихання гепатоцитів від способу їх ізолювання: 1 – без субстратів, 2 – глюкоза, 3 – глутамін, 4 – α -кетоглутарат, 5 – диметил- α -кетоглутарат, 6 – піруват, 7 – сукцинат, 8 – монометилсукцинат; статистично вірогідна різниця оптимальної концентрації протонофора (*) чи максимальної швидкості роз'єданого дихання (#) з $P < 0,05$, $n = 6$

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.

На моделі пермеабілізованих гепатоцитів виявлено, що за активації мітохондріальної пори перехідної провідності внаслідок перевантаження мітохондрій йонами Ca^{2+} відбувалось зниження швидкості роз'єданого і АДФ-стимульованого дихання.

7. Вплив хронічного введення етанолу за високожирової дієти на дихання ізолюваних гепатоцитів та ацинарних панкреатитів щурів. 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.

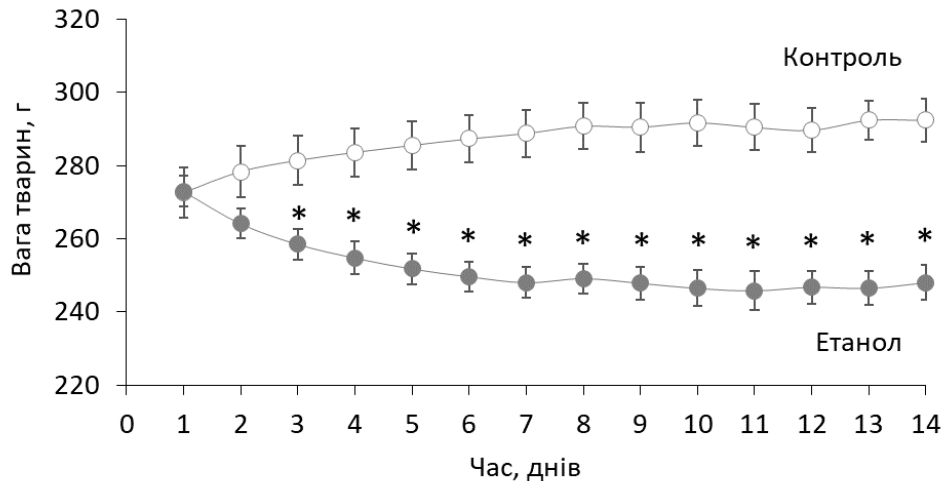


Рис. 10. Динаміка змін ваги щурів за хронічного введення етанолу за високожирової дієти; у контролі тварини перебували на дієті з вмістом 35 % свинячого смальцю (за калоріями); * – статистично вірогідна різниця з $P < 0.05$, $n = 15$

Виявилось, що у групі «Етанол» впродовж перших 5 днів тварини швидко втрачали вагу (рис. 10). Натомість контрольні тварини поступово набирали вагу впродовж перших 7 днів, після чого різниця у вазі між групами стабілізувалась (рис. 10). Загалом, впродовж експерименту вага контрольних тварин зросла на 7,28%, а у групі «Етанол» знизилась на 9,15%.

Для оцінки функціональної активності ізольованих ацинарних панкреатитів 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 панкреатитів із обох груп тварин. 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). Стимульована ацетилхоліном секреція панкреатитів тварин, яким вводили етанол, була статистично вірогідно нижчою за всіх концентрацій нейромедіатора. Піком секреції за 1 мкмоль/л ацетилхоліну становив лише $12,1 \pm 1,45$ % амілази.

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

Клітинне дихання досліджували за наявності різних субстратів окиснення у середовищі. Як і у попередніх експериментах, саме за суміші глюкози, пірувату та глутаміну було виявлено найвищу швидкість роз'єданого дихання ацинарних панкреатитів. Олігоміцин пригнічував дихання панкреатитів приблизно вдвічі за всіх досліджуваних субстратів, що підтверджує нормальний стан окисного

фосфорилування. У тварин із групи «Етанол» не виявлено змін базального, олігоміцин-нечутливого чи максимального дихання ацинарних клітин.

На відміну від ацинарних панкреатитів, введення етанолу щурам приводило до суттєвого зростання швидкості дихання ізольованих гепатоцитів (рис. 11). 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%.

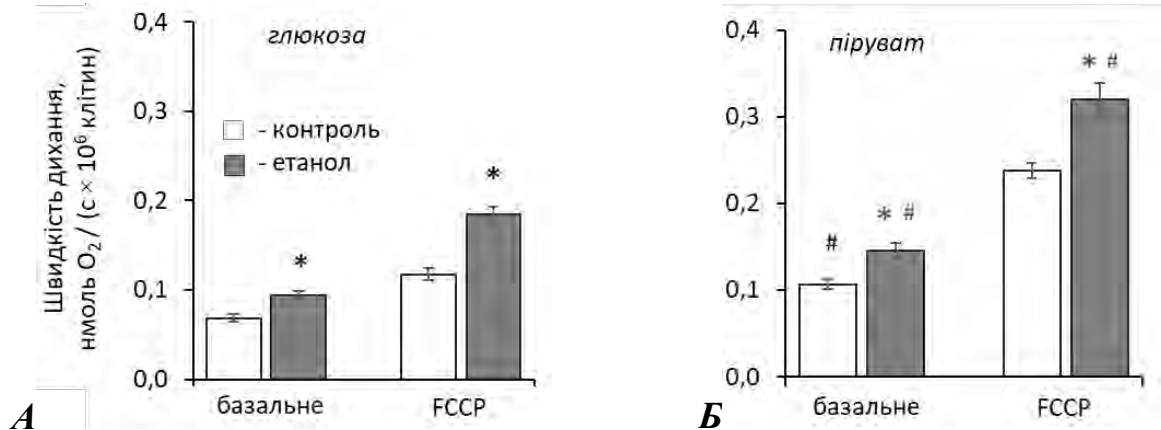


Рис. 11. Дихання ізольованих гепатоцитів щурів, що перебували на високожировій дієті та щурів, яким додатково вводили розчин етанолу впродовж 14 днів за окиснення: А – глюкози (10 ммоль/л), Б – пірувату (2 ммоль/л); * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, # – щодо відповідної проби без субстратів з $P < 0,05$, $n = 10$ (контроль) чи 12 (етанол)

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

8. Вплив раціонів харчування з високим вмістом жирів та цукру на мітохондріальні функції підшлункової залози, печінки. Для дослідження впливу харчового раціону з високим вмістом жирів (ВЖ) або високим вмістом жирів та цукрів (ВЖВЦ) проводили хронічний експеримент впродовж 7 тижнів. Дані про склад модифікованих кормів представлені у таблиці 5. Цукор та смалець додавали до сухого корму, до води не додавали нічого. Масу тварин вимірювали впродовж усіх 7 тижнів експерименту. Однак маса тіла тварин не відрізнялась між трьома групами тварин впродовж всіх дні експерименту. У нашому експерименті

встановлено, що у тварин, що перебували на ВЖВЦ харчуванні незначно зростала маса вісцерального жиру, але не печінки.

Таблиця 5

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

У щурів з груп ВЖ та ВЖВЦ відбувалось статистично вірогідне зростання рівня загального холестеролу плазми крові. 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. Концентрація глюкози та тригліцеридів плазми були в межах норми у всіх групах тварин.

Ми дослідили дихання ізолюваних мітохондрій печінки щурів на 50-й день експерименту. Висока якість отриманих препаратів мітохондрій була підтверджена вищими за 4 коефіцієнтами дихального контролю. Проте ми не виявили жодного впливу високого вмісту жиру чи цукру у кормі на дихання ізолюваних мітохондрій печінки (рис. 12).

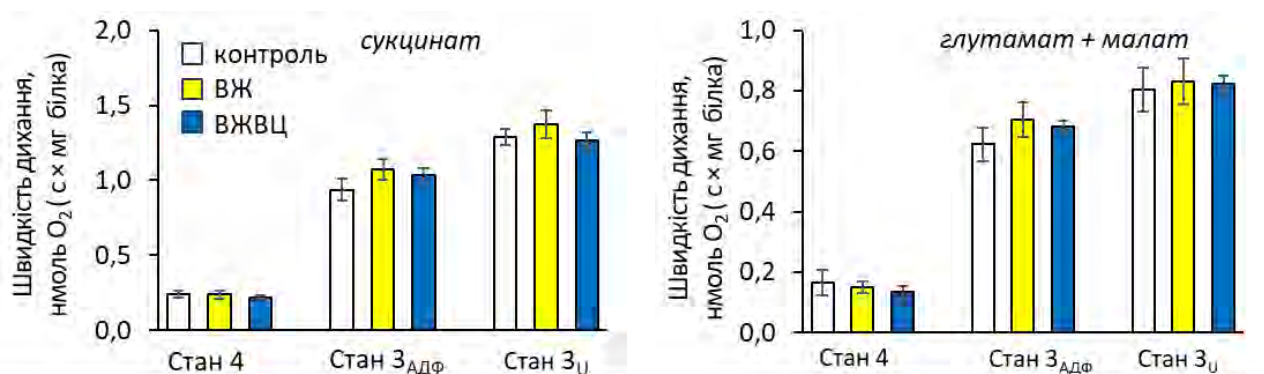


Рис. 12. Дихання мітохондрій печінки щурів після згодовування корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ), n = 10

У щурів, у яких в раціоні був підвищений вміст жирів, базальне дихання ізолюваних ацинарних панкреатитів знижувалось (на близько 15%) незалежно від субстрату окиснення (рис. 13). У іншій експериментальній групі (ВЖВЦ) таких змін не спостерігали. Не було також підтверджено статистично вірогідного

зниження максимальної швидкості роз'єднаного дихання (рис. 13Б). Однак для всіх трьох груп доведено зростання роз'єднаного дихання завдяки присутності 3-гідроксибутирату (2 ммоль/л) у середовищі.

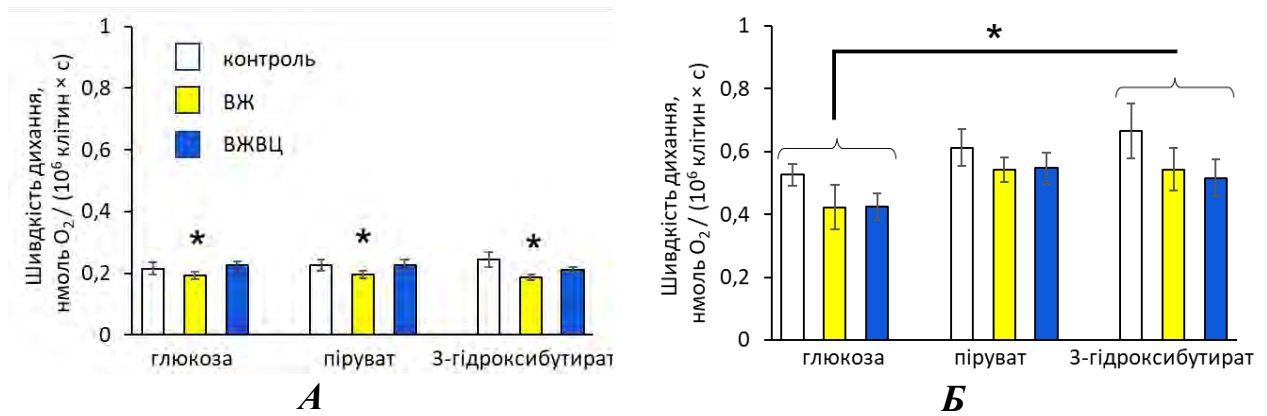


Рис. 13. Дихання ацинарних панкреатитів щурів після згодовування корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ): А – базальне дихання, Б – максимальне роз'єднане дихання, * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, $n = 5-10$

У цьому експерименті ми не виявили змін флуоресценції TMRM (100 нмоль/л) – ні за різних субстратів у середовищі, ні внаслідок дії раціону тварин (рис. 14А). Як протонатор FCCP, так і інгібітор гліколізу бромопіруват (500 мкмоль/л) суттєво знижували автофлуоресценцію НАД(Ф)Н ацинарних панкреатитів (рис. 14 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. 14 Б).

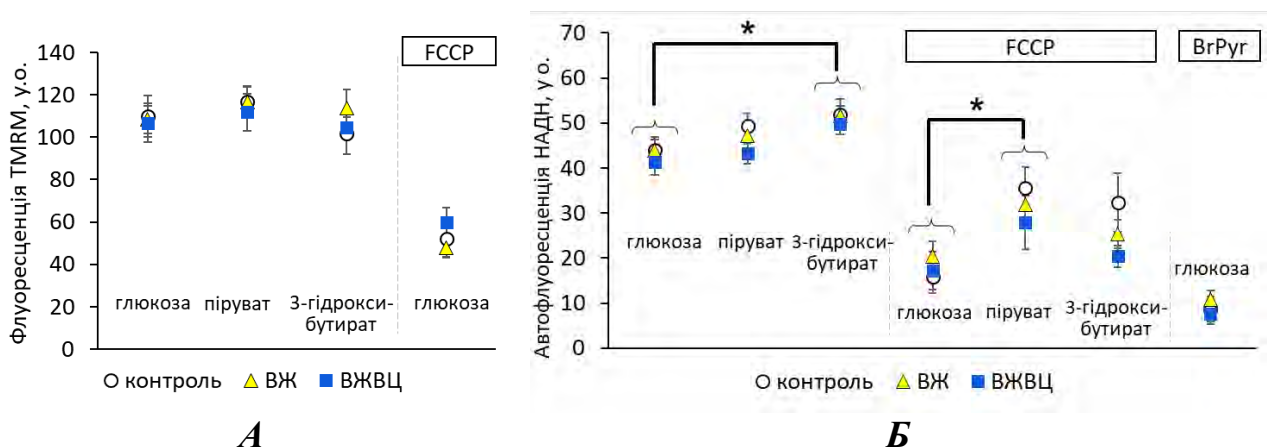


Рис. 14. Флуоресценція TMRM і НАД(Ф)Н ацинарних панкреатитів щурів, згодовування корму з високим вмістом жиру (ВЖ) або високим вмістом жиру і цукру (ВЖВЦ): * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$, $n = 10$

Узагальнення

Підсумкова схема основних змін параметрів адаптаційної здатності мітохондрій (максимальної швидкості і стабільності роз'єданого дихання), виявлених у нашій роботі, представлена на рис. 15. Класичний параметр біоенергетики мітохондрій у цілісних клітинах – максимальне роз'єдане дихання – зростало за фізіологічної стимуляції клітин агоністами, за умов оптимального забезпечення субстратами. Зниження ж його відбувалось, здебільшого, за дії патогенних факторів – гіперстимуляції ХЦК, введення щурам етанолу з ХЦК, перевантаження йонами Ca^{2+} , дії амоній хлориду.

Поки що єдиним встановленим 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 ацинарних панкреатитів чи додавання до середовища інкубації малату або ізоцитрату. Більш нетиповими чинниками зниження стабільності роз'єданого дихання є дія NH_4Cl *in vitro* та хронічне введення етанолу щурам.

Поєднання двох цих параметрів дає змогу краще оцінити адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих клітин.

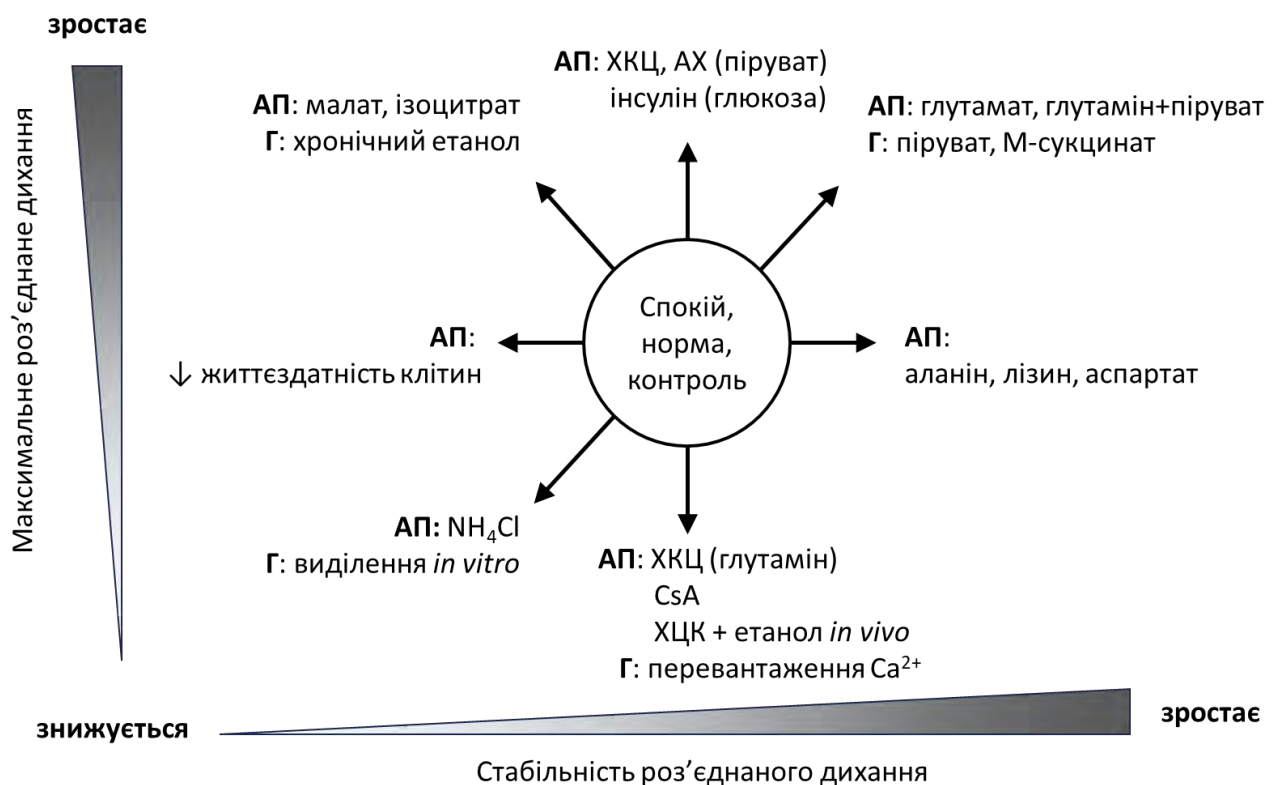


Рис. 15. Підсумки впливу досліджуваних чинників на максимальну швидкість (вісь Y) і стабільність (вісь X) роз'єданого дихання ацинарних панкреатитів (АП) і гепатоцитів (Г)

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 короточасного 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.

ПУБЛІКАЦІЇ ЗДОБУВАЧА

Праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

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 на корисну модель:

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.

Опубліковані праці апробаційного характеру (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. 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 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.
 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.

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.

Для ізольованих ацинарних панкреатитів і гепатоцитів щурів запропоновано оцінювати адаптаційну здатність мітохондрій за максимальною швидкістю і стабільності роз'єданого дихання. Стабільність залежить від наявності субстратів окиснення чи амінокислот у середовищі, якості й життєздатності клітин, а максимальна швидкість змінюється за стимуляції агоністами чи дії патогенних факторів.

Обґрунтовано використання пірувату, глутаміну, глутамату чи аланіну для підвищення стійкості підшлункової залози до патогенних чинників. Піруват та глутамін *in vitro* захищають ацинарні панкреатити від некрозу за впливу етанолу і холецистокініну. У щурів з аргінін-індукованим панкреатитом піруват нормалізує рівень амінокислот у крові. Аланін і глутамат безпечні і ефективні для забезпечення мітохондріальних функцій ацинарних панкреатитів.

Мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози і печінки мають суттєві відмінності у адаптаційній здатності. Найвища адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних панкреатитів щурів за окиснення пірувату й глутаміну, а гепатоцитів

– пірувату або сукцинату. Хронічне введення етанолу щурам підвищує адаптаційну здатність мітохондрій печінки, але не підшлункової залози.

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.

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 primary agonists (acetylcholine, cholecystokinin, and insulin) on the adaptive capacity of mitochondria in isolated pancreatic acini of rats was 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 does not affect mitochondrial NAD(P)H autofluorescence or the membrane potential in hepatocytes. Chronic alcohol administration to 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. Conversely, rat sperm mitochondria adapted to increased sugar intake by intensifying both basal and uncoupled respiration.

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