

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Білонога Ольга Олегівна

УДК 577.23 : 57.042 : 612.34

**АДАПТАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МІТОХОНДРІЙ АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДШ-
ЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ СТАНІВ**

03.00.02 –біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів –2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному університеті імені Івана Франка Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Манько Володимир Васильович,
Львівський національний університет
імені Івана Франка,
завідувач кафедри фізіології людини і тварин

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Цимбалюк Ольга Володимирівна,
професор кафедри молекулярної біотехнології
та біоінформатики Інституту високих технологій
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка;

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Бабіч Лідія Григорівна,
провідний науковий співробітник
відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України

Захист відбудеться 7 травня 2021 р. о 13 : 30 год на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 у Львівському національному університеті імені Івана Франка на платформі Zoom (Meeting ID: 876 0098 6497, Passcode: 833954)

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розіслано 6 квітня 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14
кандидат біологічних наук, доцент



М. В. Бура

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Мітохондрії є ключовими органелами, що забезпечують енергетичні потреби клітини. Процеси мітохондріального окиснення не є статичними, а регулюються відповідно до функціонального стану клітини [Voronina, Sukhomlin, Johnson et al., 2002; Voronina, Barrow, Simpson, 2012; Mankad, James, Siriwardena et al., 2012; Chvanov, Voronina, Zhang et al., 2020]. Здатність мітохондрій адекватно адаптуватись до змін енергетичних потреб є передумовою тривалої і ефективної життєдіяльності клітини [Gerritje, van der Windt, Everts et al., 2012; Marc, Shirihai, 2013].

Одним із способів оцінки функціонального стану мітохондрій є визначення максимальної швидкості дихання за допомогою протонофорів, що деполаризують внутрішню мембрану мітохондрій і активують максимальну компенсаторну реакцію дихального ланцюга [Raraty, Ward, Erdemli et al., 2000; Voronina, Barrow, Gerasimenko et al., 2004; Brand, Nicholls, 2011]. Однак цей методологічний підхід до вивчення адаптаційної здатності мітохондрій недостатньо детально розроблений. Не приділяють достатньої уваги, зокрема, зниженню дихання після максимальної стимуляції, часу дії протонофора та його концентрації.

Ацинарні клітини підшлункової залози синтезують велику кількість білка [van Dijk, Horstman, Smeets et al., 2019] та забезпечують значний його експорт шляхом секреції, що потребує достатньої кількості енергії та пластичних речовин [Korc, Williams, Goldfine et al., 1979]. Значна кількість АТФ у цих клітинах синтезується шляхом окисного фосфорилування [Voronina, Sukhomlin, Johnson et al., 2002; Voronina, Barrow, Simpson et al., 2010; Manko B.O., Manko V.V., 2013; Tanton, Voronina, Evans et al., 2018]. Дані про протонофор-стимульоване дихання ізольованих ацинарних клітин чи ацинусів підшлункової залози є неповними та суперечними [Schulz, Chalmers, Hayes et al., 1995; Kosowski, Schild, Kunz et al., 1998; Manko B.O., Manko V.V., 2013]. У значній мірі нез'ясованою залишається залежність роз'єданого дихання від надходження субстратів окиснення, концентрації протонофора та функціонального стану клітини.

Порушення окисного фосфорилування та низький рівень АТФ може бути одним із механізмів ураження підшлункової залози за патологічних станів. Зокрема відомо, що неокислювальні метаболіти етанолу, опосередковано через Ca^{2+} -залежний шлях, інгібують функціонування мітохондрій, що спричиняє зниження вмісту АТФ і, як наслідок, некроз ацинарних клітин підшлункової залози [Criddle, Murphy, Fistetto et al., 2006; Criddle, Gerasimenko, Baumgartner et al., 2007]. Але на сьогодні не зрозуміло, чи порушення мітохондріального окиснення є первинною причиною загибелі ацинарних клітин підшлункової залози за дії патологічних чинників, чи лише корелюючим процесом. Відповідь на це питання є важливою для розробки специфічної терапії гострого панкреатиту, якої ще немає [Zerem, 2014].

Вищенаведені факти свідчать про актуальність та нагальність розширення і валідації методології дослідження адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в межах держбюджетних тем кафедри фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка « Ca^{2+} -транспортувальні

системи та регуляції клітинного дихання екзокринних залоз у нормі і за дії стресорних чинників» (2015–2017 рр., № держреєстрації 0115U003246) та «Адаптаційний потенціал мітохондрій секреторних клітин підшлункової залози і печінки у нормі та за розвитку патології» (2018–2020 рр., № держреєстрації 0118U003604).

Мета і завдання досліджень. Метою роботи було дослідити параметри адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів. Для досягнення цієї мети виконували такі завдання:

1. Визначити параметри адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих панкреатичних ацинусів за окиснення різних субстратів.
2. Охарактеризувати залежність швидкості дихання від мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози
3. Дослідити вплив ацетилхоліну, холецистокініну та інсуліну на адаптаційну здатність мітохондрій підшлункової залози щурів.
4. Проаналізувати вплив етанолу та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин *in vitro* та після одноразового введення тваринам *in vivo*.
5. Дослідити вплив короткотривалої хронічної дії алкоголю на адаптаційну здатність мітохондрій підшлункової залози щурів на тлі високожирової дієти.

Об'єкт досліджень: енергетичне забезпечення мітохондрій.

Предмет досліджень: параметри адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів за різної доступності субстратів, а також впливу секретогів, інсуліну та етанолу.

Методи досліджень. *Біофізичні* – дослідження параметрів дихання ізольованих ацинусів; *фізіологічні* – моделювання станів одноразовим або короткотривалим хронічним введенням етанолу та пірувату *in vivo*; *фізико-хімічні* – полярографічне визначення вмісту кисню; *біохімічні* – визначення активності амілази, дослідження вмісту етанолу в плазмі крові за допомогою оксидазно-переоксидазного та газово-хроматографічного методу; *флуоресцентні* – вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій з використанням родаміну 123, дослідження автофлуоресценції НАДН та флуоресценції трипанового синього; *математичні* – рівняння поліному другого порядку, обчислення площі фігури під кривою; *статистичні* – описова статистика, t-тест Стьюдента, двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з/без повтореннями з подальшим коригуванням за допомогою post-hoc t-тестів Голма-Бонферроні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози і обґрунтовано критерії її оцінювання – оптимальну концентрацію FCCP, максимальну швидкість, прискорення та сповільнення роз'єданого дихання, еластичність залежності швидкості дихання від мембранного потенціалу мітохондрій. Вперше досліджено залежність цих параметрів від доступності субстратів окиснення. Показано, що суміш глюкози, глутаміну та пірувату є найоптимальнішою для підтримки адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів, оскільки за окиснення цих субстратів найвищими є максимальна швидкість роз'єданого дихання, оптимальна концентрація FCCP та коефіцієнт еластичності. Вперше показано, що адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози залежить від функціонального стану клітин. Ацетилхолін (АХ) та холецистокінін

(ХЦК) збільшують швидкість роз'єданого дихання за окиснення глюкози та пірувату, а інсулін – лише за окиснення глюкози. Встановлено, що інсулін усуває ефекти ХЦК на максимальну швидкість роз'єданого дихання за окиснення пірувату. Вперше показано, що дія етанолу у поєднанні з ХЦК *in vitro* збільшує кількість некротичних клітин та стимулює утворення блеб плазматичної мембрани ацинарних клітин. Таке поєднання спричиняло зменшення швидкості роз'єданого дихання лише тоді, коли у середовищі був глутамін (незалежно від наявності інших субстратів), що корелює зі змінами інтенсивності флуоресценції родаміну 123 й автофлюоресценції НАДН. Виявлено, що додавання до розчину пірувату та/або глутаміну нівелює розвиток некрозу, спричинений дією етанолу та ХЦК *in vitro*. Після одноразового введення тваринам етанолу та ХЦК *in vivo* швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин знижується, а кількість блеб плазматичної мембрани збільшується. Вперше показано, що піруват *in vivo* усуває негативний вплив короткотривалої хронічної дії етанолу на тлі високожирової дієти на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати поглиблюють знання про адаптаційну здатність мітохондрій панкреатичних ацинусів та зміни її параметрів за різних функціональних станів, що є підґрунтям для з'ясування механізмів розвитку гострого панкреатиту і розробки методів його лікування. У ході виконання дисертаційної роботи було розроблено спосіб оцінки функціонального стану мітохондрій, який можна використовувати для аналізу адаптаційної здатності мітохондрій за фізіологічних умов та за дії патологічних чинників [Пат. України 118816, 2017]. Також було розроблено спосіб підвищення енергозабезпечення ацинарних клітин підшлункової залози [Пат. України 118820, 2017]. Основні положення дисертаційної роботи будуть впроваджені у навчальний процес у Львівському національному університеті імені Івана Франка при викладанні загальних курсів «Біофізика» та «Фізіологія людини і тварин», а також спецкурсу «Основи біоенергетики».

Особистий внесок здобувача полягає у підборі та опрацюванні даних літератури, виконанні всієї експериментальної частини дисертації, статистичній обробці результатів, а також, за участю наукового керівника і співавторів публікацій, плануванні наукової роботи, аналізі та інтерпретації одержаних результатів.

Апробація результатів дисертації. Матеріали результатів дисертації доповідались і обговорювались на XI–XIV Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2015–2018); VI–VII з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк – Світязь, 2015; Київ, 2018); Third Kyiv International «Symposium Smooth Muscles Physiology, Biophysics & Pharmacology: From genes and molecules to functions, disorders and their novel treatment opportunities» (Kyiv – Lutsk, 2017); VIII Міжнародній науковій конференції, присвяченій 175-річчю кафедри фізіології людини і тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 2017), а також на наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин та щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка протягом 2014–2018 рр.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 3 статті у фахових наукових виданнях (два з яких належать до наукометричної бази Scopus), 12 тез доповідей наукових конференцій та 2 патенти України на корисну модель.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 138 сторінках і складається зі вступу, 4-х розділів, де викладено огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, експериментальні дані та їх обговорення, а також висновків і списку використаної літератури. Робота містить 32 рисунки та 3 таблиці. Бібліографічний список налічує 213 джерел літератури.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Досліди виконували використовуючи білих нелінійних щурів-самців або щурів лінії Wistar масою 200–300 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Моделювання гострого впливу алкоголю та холецистокініну. У досліді *in vivo* оцінювали вплив гострої дії (одноразового введення) розчину етанолу та холецистокініну на ацинарні клітини підшлункової залози. Тварин розділили на чотири групи, яким одноразово перорально вводили 40 %-й розчин етанолу (4 г/кг маси тіла) або робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію холецистокініну (10 нмоль/л) або їхнє поєднання; контрольним тваринам вводили воду та робили ін'єкцію фізіологічного розчину.

Моделювання короткотривалого хронічного впливу алкоголю на тлі високожирової дієти. Усі тварини (незалежно контрольні чи дослідні тварини) знаходились на спеціальній дієті з високим вмістом жиру (35 % калорій з жиру тваринного походження). Тварин було поділено на 4 групи, яким кожного вечора протягом 14 днів перорально через зонд вводили воду або етанол з розрахунку 6 г/кг маси тіла. На 8-ий день та до кінця досліді тваринам двічі на день робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію пірувату натрію (0,5 г/кг маси тіла) або таку ж фізіологічного розчину.

Методика ізолювання ацинарних клітин підшлункової залози. Суспензію ізолюваних панкреатичних ацинусів отримували з використанням колагенази (тип 4, 220 од./мл) за модифікованим методом Вільямса і співавт. [Williams, Kors, Dormer, 1978]. Життєздатність клітин, оцінена за допомогою тесту з трипановим синім (0,1 %-й розчин), становила понад 93 %. Клітини рахували за допомогою камери Горяєва.

Полярграфічна реєстрація швидкості споживання кисню ізолюваними ацинусами. Принцип методу ґрунтується на реєстрації електрохімічного відновлення фізично розчиненого кисню на катоді під час накладання сталого потенціалу. Величину дифузного струму реєстрували за допомогою полярграфічної установки, зібраної на базі електрода Кларка, полярграфа (YSI 5300, США), цифрового вольтметра, комп'ютера, скляної термостатованої (37 °C) закритої комірки об'ємом 1,6 мл та пропелерної мішалки. Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль O₂. Суспензію інтактних панкреатичних ацинусів інкубували впродовж 15, 30 або 60 хв за температури 37 °C у середовищах зі складом розчину відповідно до умов експерименту, а потім вносили у полярграфічну комірку. Дихання стимулювали за допомогою протонофора FCCP у концентраціях 0,5, 1, 1,5 і 2 мкмоль/л. Для інгібування АТФ-синтази застосовували 5 мкмоль/л олігоміцину за окиснення глюкози та її поєднання з піруватом чи глутаміном або їх суміші.

Флуоресцентна мікроскопія. Більшість досліджень флуоресценції проводили за допомогою мікроскопа Olympus IX73 та камери DP-74. Для оцінки некрозу ізольовані ацинуси підшлункової залози фарбували за допомогою броміду етидію. Для фарбування ядер живих і мертвих клітин використовували Hoechst 33342. Мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози оцінювали за допомогою флуоресценції родаміну 123. Для цього ізольовані панкреатичні ацинуси після інкубації з етанолом та/або ХЦК протягом 1 год і 45 хв або з FCCP і ротеноном протягом 5 хв, інкубували ще з родаміном 123 у концентрації 20 мкмоль/л протягом 15 хв за температури 37 °С. Інтенсивність флуоресценції аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ, використовуючи синій канал для автофлуоресценції НАДН та зелений канал для вимірювання флуоресценції родаміну 123. У кожному експерименті було проаналізовано принаймні 20 різних ацинусів зі щонайменше 5-ти різних фотографій.

У деяких дослідженнях для вимірювання флуоресценції родаміну 123 використовували мікроскоп ЛЮАМ-І-1. Випромінювання фіксували камерою DSLR Nikon D3000 (CCD Sensor, 10⁶ пікселів). Ізольовані панкреатичні ацинуси (0,5 мл) інкубували (15 хв, 37 °С) в середовищі з різним субстратним складом, що відповідав умовам досліду, та родаміном 123 у концентрації 10 мг/мл. Відбирали серію аліквот для преінкубації з 0,5–5 мкмоль/л FCCP протягом 60 с за 37 °С. Спектр поглинання родаміну 123 вимірювали за допомогою спектрофотометра Denovix DS-11+ за довжини хвилі 505 нм. Для цього ізольовані ацинуси підшлункової залози інкубували з родаміном 123 у концентрації 20 мкмоль/л протягом 15 хв за 37 °С.

Метод дослідження секреції амілази. Базальне та ХЦК-стимульоване вивільнення амілази з панкреатичних ацинусів досліджували *in vitro* (час інкубації становив 30 або 60 хв) [Smith, Roe, 1949; Virolle, Morris, Bibb, 1990]. Усі проби досліджували спектрофотометрично в кюветі 1 см за довжини хвилі 578 нм (червоний світлофільтр) стандартним методом йод-крохмальної колориметрії. Загальну кількість амілази визначали шляхом лізису ацинарних клітин зі використанням 1%-го Triton-X100, розчиненого у базовому позаклітинному середовищі. У серії хронічних дослідів активність амілази у плазмі крові та за стимуляції АХ (0,1, 1 і 10 мкмоль/л) досліджували турбідиметричним кінетичним методом [Virolle, Morris, Bibb, 1990], що ґрунтується на зменшенні мутності розчину. Мутність розчину досліджували за допомогою спектрофотометра DENOVIХ DS-11 FX+ в кюветі 1 см за довжини хвилі 300 нм.

Визначення вмісту етанолу в плазмі крові здійснювали за допомогою оксидазно-переоксидазного методу [Pavlishko, Ryabinina, Zhilyakova et al., 2005], що ґрунтується на реакції етанолу з киснем за дії алкогольоксидази з утворенням кольорового продукту, який визначається фотометрично за довжини хвилі 450 нм.

Газово-хроматографічне визначення вмісту етанолу в плазмі крові. Газову хроматографію проводили з використанням хроматографа “Chrom-5” (виробництва Laboratorne pruzstroje, Praha). Метод базується на перетворенні етанолу на етил нітрит в реакції з NaNO₂ та трихлороцтовою кислотою. Кількісний вміст етилового спирту в плазмі крові розраховували за попередньо побудованим калібрувальною кривою або за попередньо розрахованими коефіцієнтами регресії.

Трансмiсiйна електронна мiкроскопiя. Суспензiю iзольованих панкреатичних ацинусiв фiксували за допомогою 1,5 %-го розчину OsO_4 в 0,2 ммоль/л розчинi какодилату натрiю за рН 7,2 протягом 2–2,5 годин на холодi, потiм зневоднювали у рiзних концентрацiях етанолу по 30 хв за кiмнатної температури. Зразки поміщали у чисту епоксидну смолу, а потiм у полiмеризацiйну капсулу на добу. Зрiзи виготовляли ультрамiкроскотом УМТП-6М та обробляли 1,5%-м розчином уранiацетату за Рейнольдсом [Reynolds, 1963], пiсля чого фотографували на трансмiсiйному електронному мiкроскопi ПЭМ-100.

Статистично-математичне опрацювання результатiв дослiдження. Необхiднi статистичнi розрахунки проводили за використання пакету програм Microsoft Office Excel та Origin. Цифровi результати поданi як $M \pm m$. Кожен експеримент повторювали, як мiнимум, на п'яти окремих препаратах iзольованих клiтин, отриманих iз рiзних тварин ($n \geq 5$). У випадку флуоресцентної мiкроскопiї знаходили середнє арифметичне iз даних флуоресценцiї, як мiнимум, 10 рiзних ацинусiв у кожнiй дослiднiй пробi для кожної тварини. Вiрогiднiсть рiзницi середнiх арифметичних (P) визначали за t -тестом або двофакторним дисперсiйним аналізом та post-hoc t -тестами з корекцiєю за методом Голма-Бонферронi (Holm–Bonferroni). За записом споживання кисню розраховували максимальну швидкiсть роз'єданого дихання, оптимальну концентрацiю протонофора (середньоарифметичне значення концентрацiї, за яких i спостерiгають максимальний ефект), а також розраховували сповiльнення споживання кисню за рiвнянням полiному другого порядку, що описує динамiку вмісту кисню у середовищi пiд час другої фази FCCP-стимульованого дихання:

$$N = N_0 - (v_0 t + \frac{1}{2} a t^2), \quad (1)$$

де N – вміст O_2 у розчинi в момент часу t (нмоль), N_0 – початковий вміст O_2 у розчинi (нмоль), t – час (хв), v_0 – швидкiсть споживання кисню (нмоль O_2 / млн клiтин / хв), a – прискорення споживання кисню (нмоль O_2 / млн клiтин / хв²).

Рiвняння (1) використовують для розрахунку прискорення споживання кисню як другу похiдну по часу:

$$a = \frac{dv}{dt}. \quad (2)$$

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛIДЖЕННЯ

1. Адаптацiйна здатнiсть мiтохондрiй ацинарних клiтин пiдшлункової залози за окиснення рiзних субстратiв. Вiдомо, що протонофор-стимульована швидкiсть дихання залежить вiд субстрату окиснення (глюкоза, пiруват, амінокислоти) [Schulz, Chalmers, Hayes et al., 1995; Kosowski, Schild, Kunz et al., 1998; Doliba, Qin, Vatamaniuk, 2006; Choi, Gerencser, Nicholls, 2009; Dranka, Benavides, Diers et al., 2011; Manko В.О., Manko V.V., 2013]. Але залежнiсть роз'єданого дихання вiд субстратiв окиснення не дослiджувалася на iнтактних ацинарних клiтинах пiдшлункової залози. З'ясувалося, що базальна швидкiсть дихання iзольованих ацинусiв не залежала вiд субстрату окиснення (iнкубацiя 15 хв). Коли до полярографiчної комiрки додавали 0,5 мкмоль/л FCCP, швидкiсть дихання панкреатичних ацинусiв збiльшувалася у разi використання всiх субстратiв, а найбільше – за окиснення глутамату (до $2,17 \pm 0,33$ в.о). Внаслiдок додавання FCCP у концентрацiї 1 мкмоль/л швидкiсть дихання iзольованих

ацинусів продовжувала збільшуватись (відносно 0,5 мкмоль/л FCCP) у разі використання пірувату (до $2,16 \pm 0,30$ в.о.) чи глютаміну (до $2,12 \pm 0,26$ в.о.), але не глютаму. FCCP у вищих концентраціях (1,5 та 2 мкмоль/л) зменшував швидкість дихання за окиснення всіх субстратів.

Для підтримки синтезу АТФ шляхом гліколізу в умовах дефіциту окисного фосфорилування у наступному експерименті ми додали до середовища глюкозу. Встановлено, що за таких умов після внесення в полярографічну комірку FCCP у концентрації 1 мкмоль/л швидкість дихання панкреатичних ацинусів зросла та досягала найвищих значень за окиснення глюкози і глютаміну або глюкози, глютаміну і пірувату й становила $2,64 \pm 0,4$ та $2,31 \pm 0,26$ в.о. відповідно (рис. 1, $P = 0,04$ і $0,03$, але статистична різниця не була підтверджена тестом Голма-Бофферонні). У разі використання глюкози і глютаміну швидкість дихання ацинусів досягала найвищих показників за дії 1,5 мкмоль/л FCCP, незалежно від наявності пірувату (рис. 1).

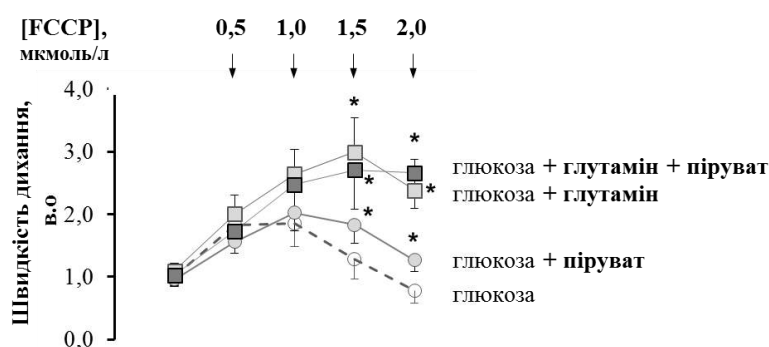


Рис. 1. Швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів за окиснення різних субстратів у поєднанні з глюкозою: тут і далі [глюкоза] = 10 ммоль/л, концентрація усіх інших субстратів 2 ммоль/л; дані нормалізовані до базальної швидкості дихання без додавання FCCP за окиснення глюкози; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно швидкості дихання за окиснення глюкози, $n = 6$; $M \pm m$.

У разі використання сукцинату (2 ммоль/л) або α -кетоглутарату (2 ммоль/л) швидкості дихання за внесення у комірку 1 мкмоль/л FCCP були нижчими, ніж у контролі, а за окиснення метильованих похідних цих субстратів, FCCP-стимульоване дихання ацинарних клітин підшлункової залози, навпаки, збільшилось.

Для оцінки функціональної здатності мітохондрій панкреатитів ми використали два параметри – оптимальну концентрацію FCCP та максимальну швидкість роз'єданого дихання. Загалом, можна виділити два варіанти: 1) низьке значення оптимальної концентрації FCCP і, водночас, висока максимальна швидкість роз'єданого дихання (за окиснення глютаму, ізоцитрату, малату, сукцинату, α -кетоглутарату); 2) високе значення обох показників (за окиснення глюкози, пірувату, глютаміну, монометилсукцинату, диметил- α -кетоглутарату або їх поєднання). Обидва параметри були найвищими у разі використання суміші глюкози, глютаміну і пірувату. Внаслідок додавання до глюкозовмісного середовища субстратів циклу Кребса максимальна швидкість роз'єданого дихання збільшилася, а оптимальна концентрація FCCP, навпаки, зменшилася. На основі отриманих результатів можна припустити про сповільнення дихання з часом.

Внаслідок одноразового додавання 0,5 або 1,5 мкмоль/л FCCP можна виокремити три фази дихання (рис. 2): збільшення швидкості дихання (фаза прискорення),

пік швидкості дихання, зменшення швидкості дихання (фаза сповільнення). Часові параметри цих фаз залежать від концентрації протонофора та субстрату окиснення. Для більшості субстратів (окрім глутаміну) найбільше прискорення дихання реєстрували після внесення 1,5 мкмоль/л FCCP, а за окиснення диметил- α -кетоглутарату збільшення прискорення дихання було зареєстроване як після додавання 0,5 мкмоль/л FCCP, так і після 1,5 мкмоль/л FCCP. Найнижче прискорення дихання зареєстровано за окиснення глутаміну після додавання 0,5 мкмоль/л FCCP.

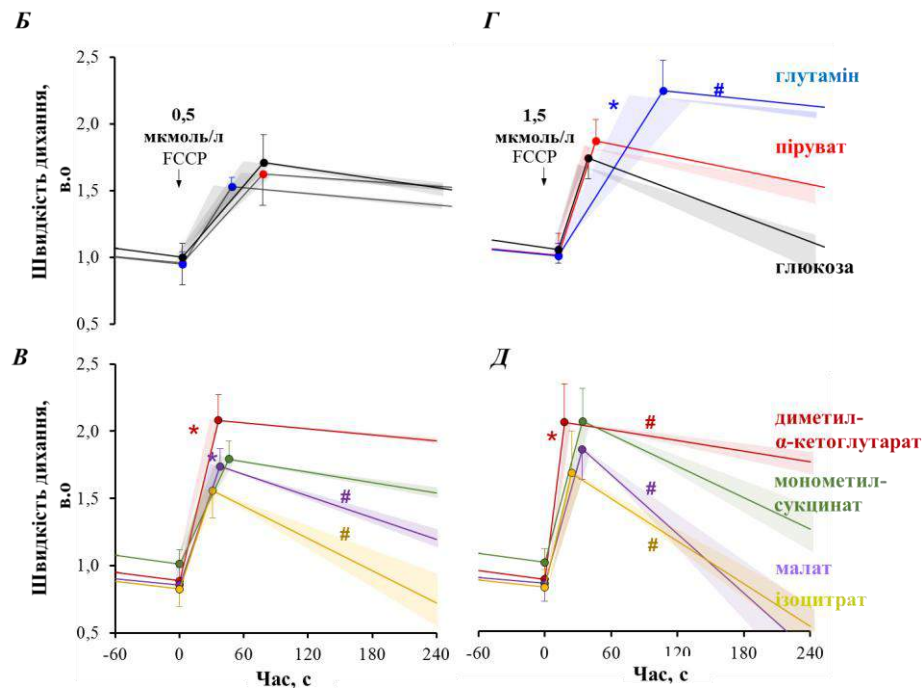


Рис. 2. Трифазна відповідь FCCP-стимульованого дихання за окиснення різних субстратів; дані нормалізовані до базальної швидкості дихання (без додавання FCCP) за окиснення глюкози; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно з прискоренням дихання за окиснення глюкози; # – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно зі сповільненням дихання за окиснення глюкози; $n = 5$; $M \pm m$.

Пік швидкості дихання реєстрували після внесення 0,5 мкмоль/л FCCP для більшості субстратів, а за окиснення глутаміну – за додавання 1,5 мкмоль/л FCCP (рис. 2). Далі спостерігали зниження швидкості дихання (фаза сповільнення) ацинарних клітин підшлункової залози і найбільші показники були зареєстровані за окиснення малату або ізоцитрату (рис. 2 Б). Проте, у разі використання глутаміну або диметил- α -кетоглутарату сповільнення дихання панкреатичних ацинусів не спостерігали (рис. 2 А та Б). Отже, отримані параметри адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин залежать від субстрату окиснення. Поєднання глутаміну, пірувату та глюкози підтримує високу швидкість дихання.

2. Залежність швидкості дихання від мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Швидкість дихання обмежується багатьма факторами, у тому числі й мембранним потенціалом мітохондрій. Відомо, що протонофор зменшує мембранний потенціал мітохондрій і тим самим нівелює зворотний механізм обмеження швидкості дихання. Для оцінки залежності швидкості роз'єднаного дихання від мембранного потенціалу мітохондрій (рис. 3) одержали коефіцієнти

еластичності, що розраховувались за наступним рівнянням для початкових змін внаслідок додавання до суспензії ацинусів 0,5 мкмоль/л FCCP:

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

де v – швидкість дихання, яка не була заінгібована олігоміцином, $\Delta\Psi_m$ – максимальний мембранний потенціал мітохондрій без додавання FCCP; диференціали, обчислені після додавання 0,5 мкмоль/л FCCP.

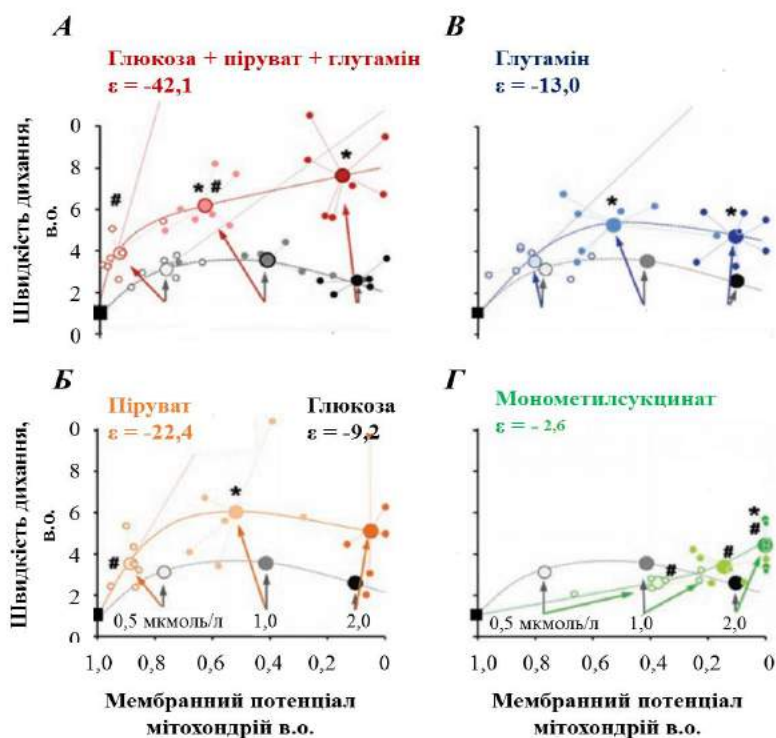


Рис. 3. Здатність FCCP знижувати мембранний потенціал мітохондрій та підвищувати швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози залежить від субстрату окиснення: малі маркери – дані кожного експерименту, великі маркери – середнє значення; дані нормалізовані до базальних значень (без додавання FCCP) та до значень за дії 5 мкмоль/л олігоміцину (чорні квадрати); статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно швидкості дихання (*) або мембранного потенціалу мітохондрій (#) за окиснення глюкози (сірі кола).

Коефіцієнт еластичності був найвищим за окиснення суміші глюкози, глутаміну та пірувату (-42,1), а найнижчим – за окиснення монометилсукцинату (-2,6).

Отже, поєднання у середовищі глутаміну, пірувату та глюкози забезпечує найбільший рівень відновлювальних еквівалентів дихального ланцюга, потрібних для підтримки найвищих рівнів мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за навантаження FCCP.

3. Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів за впливу ацетилхоліну, холецистокініну та інсуліну. Для ацинарних клітин підшлункової залози встановлено, що під час фізіологічної стимуляції первинними агоністами відбувається деполяризація внутрішньої мембрани мітохондрій [Voronina, Barrow, Gerasimenko et al., 2004], що спричиняє збільшення синтезу АТФ [Voronina, Barrow, Simpson et al., 2010] та збільшення швидкості роз'єданого дихання [Manko B.O., Manko V.V., 2013], що спонукало до подальших досліджень.

З'ясувалося, що швидкість базального дихання у стані спокою (у контролі), як і у попередніх серіях, не залежала від субстрату окиснення, але збільшувалася під впливом АХ (4,5 мкмоль/л) чи ХЦК (0,5 нмоль/л). Лише за окиснення суміші глюкози і пірувату (але не глюкози із глутаміном, монометилсукцинатом або α -кетоглутаратом; рис. 4) максимальна швидкість роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів під впливом АХ та ХЦК збільшилася – на 56 і 37,5% відповідно.

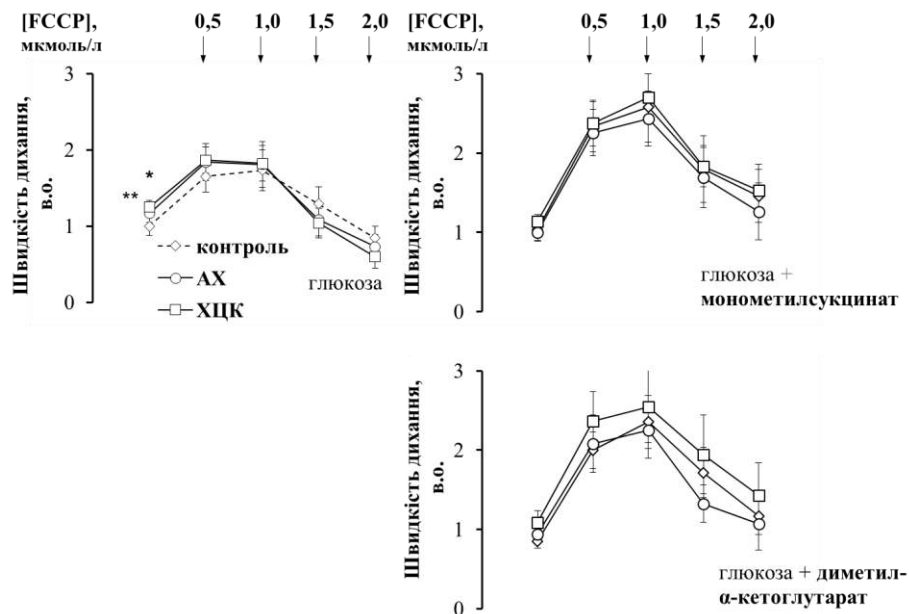


Рис. 4. Вплив первинних агоністів-активаторів секреції на швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози залежить від субстрату окиснення; дані нормалізовані до швидкості дихання за окиснення лише глюкози без додавання FCCP; * – статистично вірогідна різниця за $P < 0,05$ між швидкостями дихання у контролі та за впливу АХ, # – за впливу ХЦК; $n = 11$ (A) або 5–6 (B, B).

Для формалізації оцінки адаптаційної здатності мітохондрій ми розраховували площу під кривими залежності швидкості дихання у діапазоні досліджуваних концентрацій FCCP:

$$S = \int_0^2 v_i(C) \cdot dC ,$$

де v_i – швидкість дихання за певної концентрації FCCP, C – концентрація FCCP.

З'ясувалося, що адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин у контролі (на тлі глюкози) зменшується у такій послідовності: глутамін : сукцинат : піруват : α -кетоглутарат : глюкоза. Коли діють секретогоги, площа під кривою залежності швидкості дихання від концентрації FCCP збільшується тільки за окиснення суміші глюкози та пірувату.

У наступній серії експериментів досліджували вплив інсуліну на дихання ацинарних клітин підшлункової залози, так як відомо, що інсулін впливає на функціональність панкреатичних ацинусів, зокрема на генну регуляцію, синтез та продукцію травних ферментів [Sans, Bruce, Williamis, 2020]. З'ясувалося, що у стані спокою за

дії інсуліну спостерігали статистично вірогідне збільшення базальної швидкості дихання та максимальної швидкості роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів за окиснення лише глюкози. Інсулін повністю нівелював стимулюючий ефект ХЦК на максимальну швидкість роз'єданого дихання за окиснення пірувату (двофакторний аналіз ANOVA) (рис. 5).

Тому, параметри адаптаційної здатності є чутливими до змін не лише субстратного забезпечення, а й функціонального стану мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози.

4. Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин за впливу етанолу та холецистокініну *in vitro* та після одноразового введення тваринам *in vivo*. Для оцінки чутливості параметрів адаптаційної здатності мітохондрій за впливу патогенних чинників, що викликають деструктивні зміни в тканині, ми використали клітинну модель панкреатиту, інкубуючи ізольовані ацинуси із ХЦК (0,1 нмоль/л) та етанолом (20 ммоль/л) у базовому позаклітинному середовищі (із субстратів окиснення містить глюкозу, піруват, глутамін і амінокислоти). Внаслідок інкубації ацинусів з ХЦК протягом 30 хв швидкість FCCP-стимульованого дихання статистично вірогідно збільшилась до $2,75 \pm 0,2$ в.о. Коли ж до цього середовища інкубації додавали ще й етанол, то ефект ХЦК на швидкість дихання нівелювався (двофакторний аналіз ANOVA). Подібні зміни зареєстровані і після 60 хв інкубації, проте під впливом етанолу за цих умов зареєстровано збільшення швидкості базального дихання.

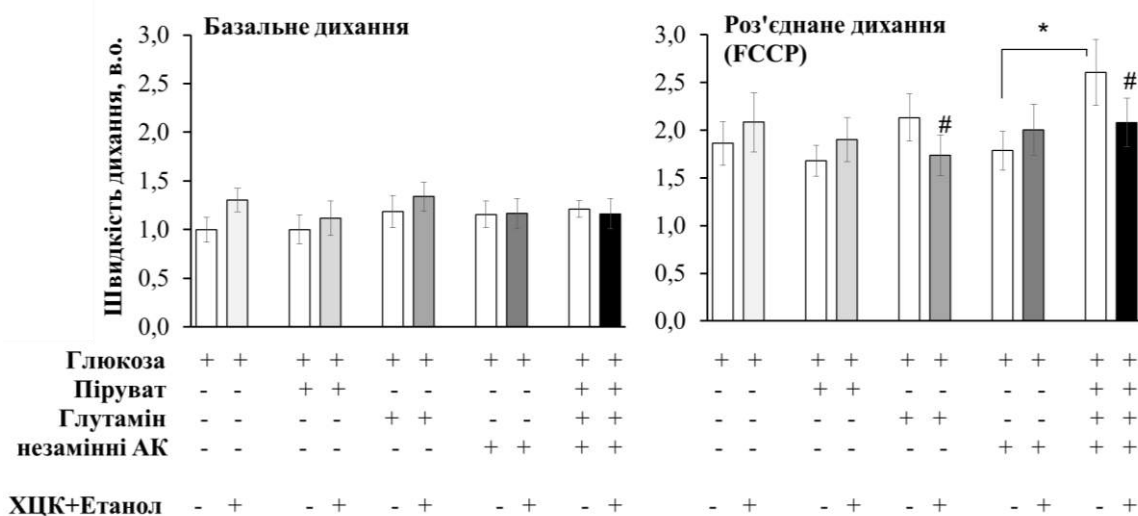


Рис. 5. Субстрати окиснення визначають вплив етанолу та холецистокініну (30 хв) на швидкість дихання панкреатичних ацинусів; статистичну різницю оцінювали за допомогою дисперсного двофакторного аналізу ANOVA та post-hoc t-тестами з корекцією за методом Голма-Бонферроні: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ між позначеними даними, # – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно з контролем (без ХЦК + етанол); $M \pm m$, $n=7$ або 6.

Також зареєстровано, що етанол після 30 хв інкубації суттєво знижував ХЦК-стимульовану секреторну відповідь, але не впливав на базальну секрецію. Під впливом етанолу спостерігалось лише часткове збільшення інтенсивності флуоресценції родаміну 123 у ацинарних клітинах підшлункової залози, що не досягало статистично достовірної різниці ($P = 0,0507$). Поєднання етанолу та ХЦК спричиняло статистично достовірне збільшення кількості некротичних клітин (~5 %) та збільшення (у 2 рази)

кількості блеб плазматичної мембрани (явище «васкуляризації» мембран [Lampel, Kern, 1977], що характерне для некротичних і апоптичних клітин [Kerr, Wyllie, Currie, 1972; Trump, Berezsky, 1995]).

Для з'ясування механізмів зміни адаптаційної здатності мітохондрій за одночасної дії ХЦК та етанолу протокол досліджу ускладнили – спочатку протягом 30 хв ізолювані ацинуси інкубували з ХЦК (0,1 нмоль/л) та етанолом (20 ммоль/л) у середовищах із різними субстратами окиснення, а потім ще 15 хв – у середовищі зі всіма субстратами. Інкубація з ХЦК та етанолом спричиняла статистично вірогідне зменшення швидкості FCCP-стимульованого дихання лише тоді, коли у середовищі був глутамін – незалежно від наявності інших субстратів (рис. 5).

Внаслідок інкубації ізолюваних ацинусів з ХЦК й етанолом протягом 2 год збільшилася інтенсивність флуоресценції родаміну 123 за окиснення глюкози або глюкози та пірувату, проте такого ефекту не спостерігали, коли у розчин додавали ще й глутамін (двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA; рис. 6 Б). Додавання ХЦК та етанолу до середовища інкубації статистично вірогідно також збільшило інтенсивність автофлуоресценції НАДН, але тоді, коли ацинуси інкубували у середовищі з глюкозою або глюкозою, глутаміном та піруватом, і зменшило – за окиснення глюкози і глутаміну (рис. 6 А).

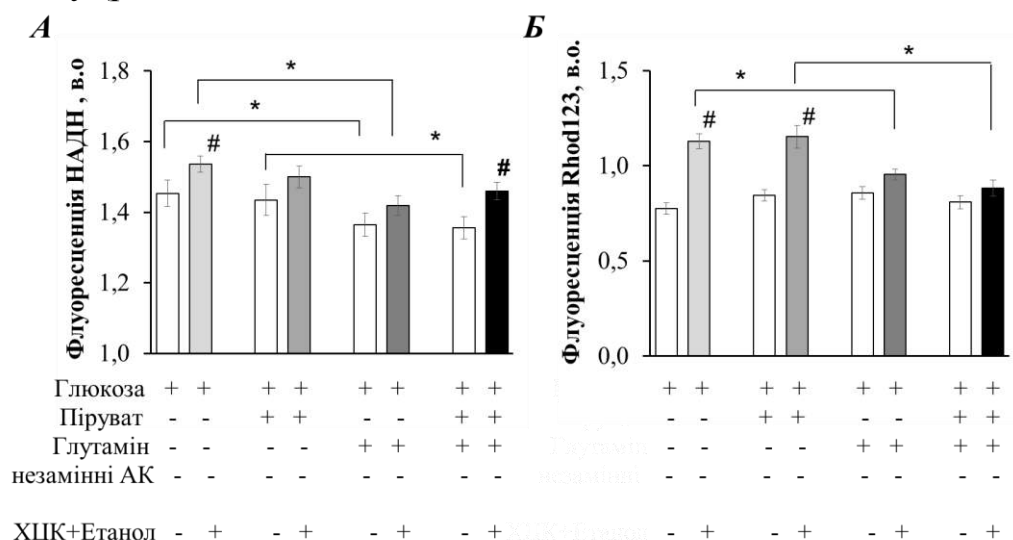


Рис. 6. Субстрати окиснення визначають вплив етанолу та холецистокініну (2 год) на аутофлуоресценцію НАДН (А) та мембранний потенціал мітохондрій (Б); статистичну різницю оцінювали за допомогою дисперсного двофакторного аналізу ANOVA та post-hoc t-тестами з корекцією за методом Голма-Бонферроні: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ між позначеними даними, # – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно з контролем (без ХЦК + етанол); $M \pm m$, $n=7$.

Для оцінки залежності розвитку некрозу та блеб був проведений двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA. З'ясувалося, що статистично вірогідне збільшення кількості некротичних клітин (до 35 %) після 2 год інкубації з ХЦК та етанолу спостерігалося лише тоді, коли у середовищі була лише глюкоза; додавання до цього середовища глутаміну чи пірувату нівелювало цей ефект. Збільшення кількості блеб плазматичної мембрани внаслідок дії ХЦК й етанолу спостерігали, навпаки, лише після інкубації ацинусів зі сумішшю глюкози, глутаміну і пірувату.

Для перевірки, чи реалізуються отримані результати на тваринних моделях, провели дослідження впливу одноразового введення етанолу та ХЦК *in vivo*. Оксидно-пероксидазним методом встановлено, що рівень етанолу в плазмі становив $25,6 \pm 4,7$ ммоль/л у групі тварин, яким вводили лише розчин етанолу, та $18,8 \pm 3,2$ ммоль/л у тварин, яким вводили етанол та ХЦК. Отримані дані підтверджені методом газової хроматографії. Рівень амілази в плазмі крові був однаковий у всіх дослідних групах тварин, що свідчить про відсутність ушкоджень тканини підшлункової залози. Відсоток некротичних клітин в ізольованих ацинусах також не збільшувався, однак кількість ацинарних клітин із блебами плазматичної мембрани збільшилась у групі тварин, яким вводили розчин етанолу та ХЦК (до 30 % від загальної кількості клітин в ацинусах).

Після проведення дисперсійного аналізу ANOVA виявилось, що у групі тварин, яким вводили розчин етанолу, спостерігається статистично вірогідне зниження базальної швидкості дихання незалежно від субстрату окиснення. Самі по собі етанол або ХЦК не впливали на швидкість роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів, але їхнє поєднання спричинило статистично вірогідне зниження максимальної швидкості роз'єданого дихання на ~25–50 %.

Отже, етанол у поєднанні з ХЦК знижують адаптаційну здатність мітохондрій та сприяють утворенню блеб на плазматичній мембрані ацинарних клітин підшлункової залози *in vitro* та після одноразового введення тваринам *in vivo*. Лише за впливу етанолу та ХЦК *in vitro* спостерігали зростання кількості некротичних клітин у панкреатичних ацинусах за окиснення глюкози, цей ефект нівелювався за додавання до розчину пірувату та/або глутаміну.

5. Вплив короткотривалої хронічної дії алкоголю на адаптаційну здатність мітохондрій підшлункової залози шурів на тлі високожирової дієти. У попередніх експериментах ми з'ясували, що етанол лише у поєднанні з іншими факторами зменшує адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Тому у наступному експерименті ми перевірили іншу модель гострого панкреатиту (поєднання етанолу та жирних кислот), а ґрунтуючись на отриманих результатах, як терапевтичний агент було використано піруват. Як і у попередньому досліді *in vivo*, рівень амілази у крові тварин, яким вводили етанол, не відрізнявся від контрольних значень. Кількість некротичних клітин після їх виділення статистично вірогідно зростала у групі тварин, яким вводили етанол, але такого ефекту не спостерігали у групі тварин, яким також вводили і піруват. Введення тваринам етанолу пригнічувало секрецію амілази панкреатичними ацинусами, що була стимульована АХ (1 та 10 мкмоль/л) *in vitro*; у групі тварин, яким вводили піруват, навпаки, секреторна відповідь на 10 мкмоль/л АХ збільшувалася. За допомогою електронної мікроскопії було оцінено морфологічний стан ацинарних клітин підшлункової залози та не було виявлено видимих змін, окрім зменшення щільності ЕПР у тварин, яким вводили етанол. Хронічне введення етанолу та пірувату не впливало на базальне дихання ацинарних клітин ні за окиснення глюкози, ні суміші глюкози, глутаміну та пірувату (рис. 7 А). Водночас, короткотривале хронічне введення етанолу статистично вірогідно підвищувало FCCP-стимульоване дихання за окиснення глюкози (від $1,6 \pm 0,1$ до $2,0 \pm 0,1$ ммоль $O_2 / c \times$ млн клітин; рис. 7 Б), а також підвищувало олігоміцин-нечутливе дихання

ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення глюкози та суміші глюкози, пірувату та глутаміну (рис. 7 В). Крім того, значення IC50 для FCCP, яким спричиняли деполаризацію внутрішньої мембрани мітохондрій, зменшувалося за окиснення суміші глюкози, пірувату та глутаміну на 59 % (рис. 7 Г). Однак цих ефектів етанолу не було у групі тварин, яким також вводили піруват (рис. 7).

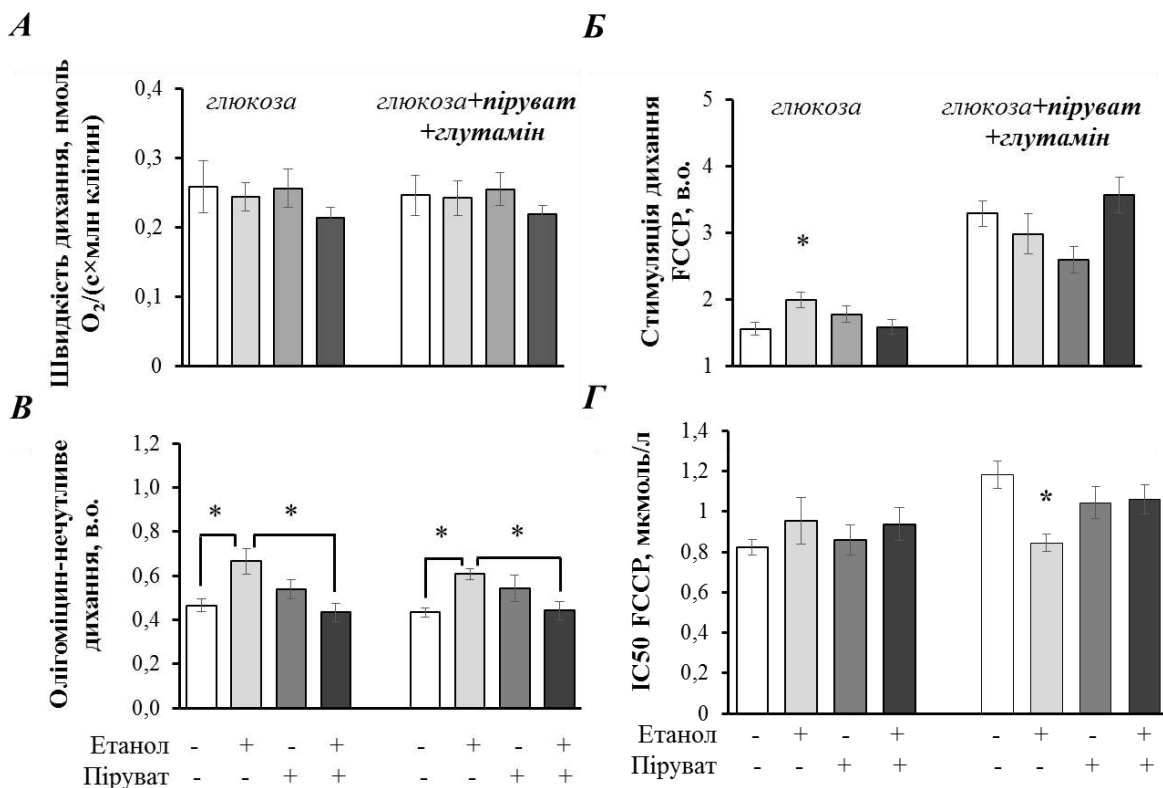


Рис. 7. Вплив етанолу і пірувату *in vivo* на дихання та мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози: * – статистично вірогідна різниця щодо контролю за ANOVA та post-hoc тестом Голма-Борффероні; P < 0,05; n = 7–8.

Отже, введення пірувату нівелює негативний вплив хронічного введення етанолу щурам (на тлі високожирової дієти) на функціонування мітохондрій. Отримані результати підтверджують, що дослідження адаптаційної здатності мітохондрій є чутливим інструментом для оцінки мітохондрій за різних функціональних станів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У дисертаційній роботі описано та охарактеризовано нові підходи для визначення адаптаційної здатності мітохондрій (рис. 8). Типова реакція на одноразове внесення FCCP до суспензії ацинусів характеризується (1) прискоренням, (2) піковим значенням швидкості та (3) сповільненням роз'єданого дихання. Після титрування за допомогою кількох концентрацій FCCP отримано два інших параметри – максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію протонофора. Крім того, у поєднанні з напівкількісним вимірюванням мембранного потенціалу мітохондрій можна отримати коефіцієнти еластичності для швидкості дихання.

Максимальна швидкість роз'єданого дихання відображає здатність клітин до метаболізму субстратів у відповідь на дію протонофора, а не є абсолютною максимальною ємністю електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, як це вважалося раніше. Важливо досліджувати залежність максимальної окисної здатності мітохондрій

від концентрації і тривалості дії протонофора, динаміки збільшення та зменшення швидкості FCCP-стимульованого дихання, які спостерігаються у першій та третій фазі дії протонофора – до і після досягнення максимальної швидкості дихання.

Прискорення роз'єданого дихання, очевидно, свідчить про те, наскільки швидко окислювальні системи мітохондрій можуть пристосуватись до деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій. Для ацинарних клітин підшлункової залози найбільше прискорення роз'єданого дихання зареєстровано за окиснення диметил- α -кетоглутарату. До сповільнення роз'єданого дихання призводить, мабуть, надмірна деполяризація внутрішньої мембрани мітохондрій. На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що недостатня здатність клітин транспортувати та/або окислювати субстрати спричиняє повне розсіювання мембранного потенціалу мітохондрій, що є загальною причиною сповільнення дихання.

Максимальна швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин суттєво залежить як від процесів прискорення, так і сповільнення, а тому є різною для кожного субстрату окиснення або їх комбінації. Більше того, вона збільшувалася під впливом АХ або ХЦК за окиснення пірувату та інсуліном – за окиснення глюкози.

Також виявлено зміни адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за дії патологічних чинників. Так, етанол і ХЦК *in vitro* та за одноразового введення тваринам (*in vivo*) знижують здатність мітохондрій панкреатичних ацинусів відповідати на високі навантаження протонофором (рис. 8) та сприяють збільшенню кількості блеб, утворених на плазматичній мембрані. Під впливом етанолу і ХЦК *in vitro* було зареєстровано зниження секреторної відповіді та розвиток некрозу клітин. Ефект етанолу та ХЦК залежав від субстратного забезпечення. Показано, що зміни адаптаційної здатності мітохондрій за дії патологічних факторів можна зареєструвати ще до втрати життєздатності клітин. Так, за дії етанолу та ХЦК *in vivo* знижувалась швидкість дихання панкреатичних ацинусів підшлункової залози, але не спостерігалось розвитку некрозу. Це підтверджується й іншими отриманими нами результатами за хронічного введення етанолу на тлі високожирової дієти.

Застосування пірувату з терапевтичною метою ґрунтується на отриманих нами результатах про залежність адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози від субстратного забезпечення та функціонального стану клітин. Внесення пірувату, так само як і глутаміну, запобігають некрозу ацинарних клітин підшлункової залози, що був спричинений впливом етанолу та ХЦК *in vitro*. За таких умов піруват підтримує ХЦК-стимульовану швидкість дихання панкреатичних ацинусів, але, на диво, не впливає ні на швидкість роз'єданого дихання, ні на деполяризацію внутрішньої мембрани мітохондрій. Глутамін за впливу ХЦК та етанолу, навпаки, спричиняє зниження рівня НАДН, що запобігає деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій, але спричиняє зменшення максимальної швидкості роз'єданого дихання. Також саме піруват, на відміну від глутаміну, підвищує адаптаційну здатність мітохондрій за стимулювання агоністами (рис. 8). Отримані результати за короткотривалого хронічного введення етанолу на тлі високожирової дієти підтверджують позитивний вплив пірувату на адаптаційну здатність мітохондрій ще до розвитку клінічних симптомів гострого панкреатиту.

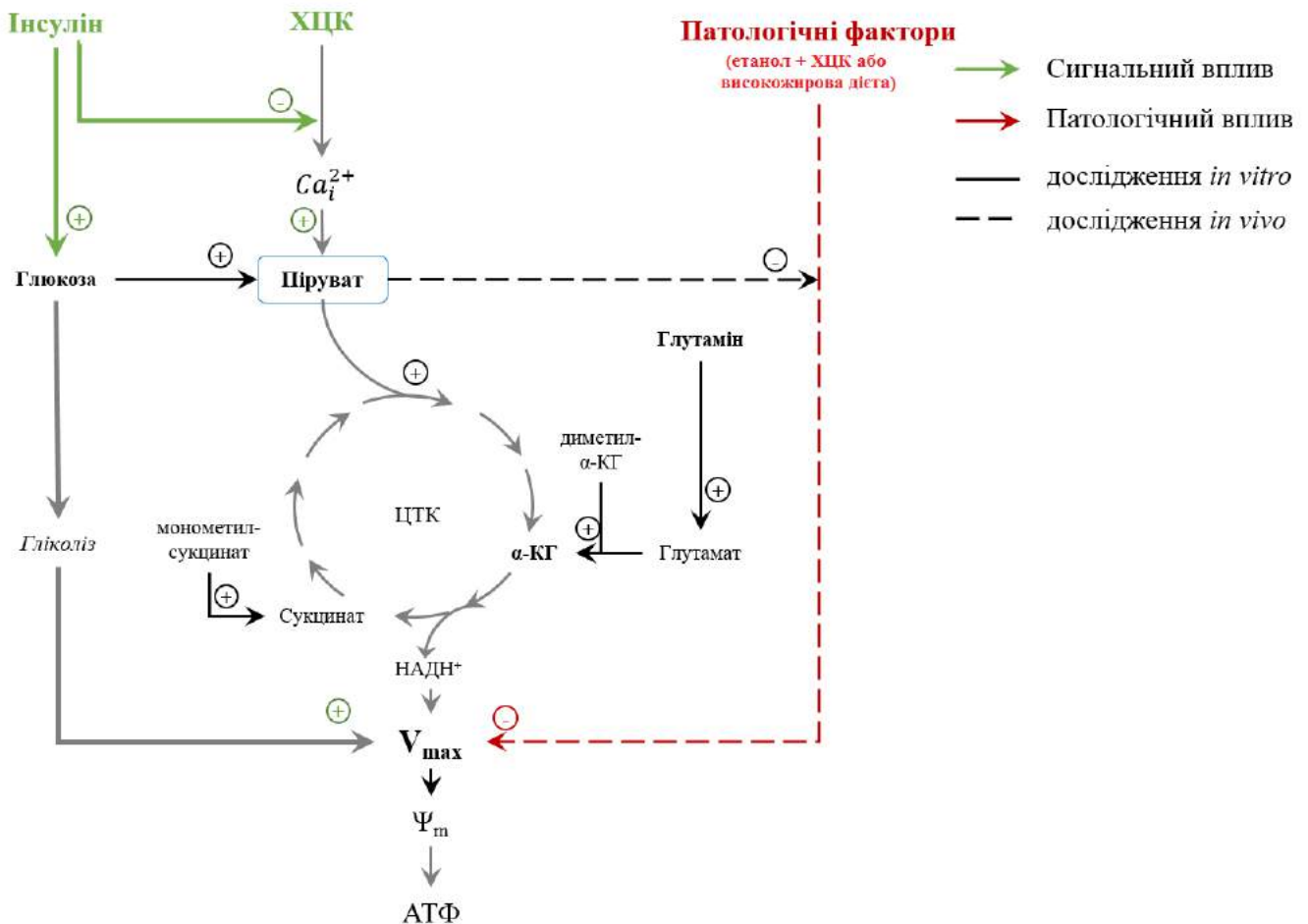


Рис. 8. Схема зміни швидкості дихання та мембранного потенціалу мітохондрій залежно від функціонального стану: ХЦК – холецистокінін, α-КГ – α-кетоглутарат; НАДН⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотид; ЦТК – цикл трикарбонових кислот; V_{max} – максимальна швидкість дихання; Ψ_m – мембранний потенціал мітохондрій; АТФ – аденозинтрифосфат.

Отже, параметри оцінки адаптаційної здатності мітохондрій є інформативними та чутливими до змін функціонального стану клітин, що дають змогу краще досліджувати процеси у цілих живих клітинах та мітохондріях як у нормі, так і за дії патологічних чинників.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі обґрунтовано критерії та охарактеризовано адаптаційну здатність мітохондрій ацинусів підшлункової залози, її залежність від субстратів окиснення та зміни за дії ацетилхоліну, холецистокініну, інсуліну й етанолу.

На основі аналізу отриманих результатів зроблено такі висновки:

1. Адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози можна охарактеризувати такими параметрами, як максимальна швидкість роз'єданого дихання, оптимальна концентрація FCCP, прискорення та сповільнення дихання внаслідок додавання FCCP. Адаптаційна здатність мітохондрій залежить від доступності субстратів окиснення. Максимальна швидкість роз'єданого дихання ($2,82 \pm 0,51$ в.о.) та оптимальна концентрація FCCP (1,75 мкмоль/л) виявилися найвищими за окиснення суміші пірувату, глютаміну та глюкози.

2. Найповніше характеризує адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози залежність швидкості роз'єданого дихання від мембранного потенціалу мітохондрій. Коефіцієнт еластичності цієї залежності виявився найвищим теж за окиснення суміші пірувату, глутаміну та глюкози.
3. Механізм збільшення адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за дії різних фізіологічно-активних речовин є різним. Ацетилхолін та холецистокінін збільшують максимальну швидкість роз'єданого дихання ацинусів підшлункової залози за окиснення глюкози та пірувату, а інсулін – за окиснення глюкози. Інсулін нівелює стимулюючий ефект холецистокініну на максимальну швидкість роз'єданого дихання за окиснення пірувату.
4. Внаслідок інкубації ізольованих ацинусів підшлункової залози з етанолом (20 ммоль/л) та холецистокініном (0,1 нмоль/л) швидкість роз'єданого дихання знижувалася лише тоді, коли у середовищі був глутамін (незалежно від наявності інших субстратів); автофлуоресценція НАДН збільшувалася – за окиснення глюкози або глутаміну та пірувату і, водночас, збільшилась інтенсивність флуоресценції родаміну 123 – за окиснення глюкози або глутаміну та пірувату, але не глутаміну. Коли у середовищі інкубації була глюкоза, етанол та холецистокінін, інтенсифікувався розвиток некрозу, який усувався додаванням пірувату та/або глутаміну. Збільшення кількості блеб плазматичної мембрани внаслідок дії етанолу та холецистокініну спостерігали, навпаки, лише після інкубації ацинусів зі сумішшю глюкози, глутаміну і пірувату.
5. Після одноразового введення тваринам етанолу та холецистокініну *in vivo* швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин знижується, а кількість блеб плазматичної мембрани збільшується.
6. Введення пірувату *in vivo* підвищує адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів за короткотривалої хронічної дії етанолу на тлі високожирової дієти. У групі тварин, яким вводили етанол, збільшувалася швидкість роз'єданого дихання за окиснення глюкози, швидкість олігоміцин-нечутливого дихання – за окиснення глюкози чи поєднання глюкози, пірувату та глутаміну, і зменшувалося значення IC50 для FCCP-спричиненої деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій за окиснення глюкози, пірувату і глутаміну. Цих ефектів не спостерігали у групі тварин, яким вводили крім етанолу ще й піруват.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Білонога О.О., Манько Б.О., Манько В.В. Вплив ацетилхоліну та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Фізіол. журн. 2019; 65 (4): 73–81. (Здобувач опрацювала дані літератури, самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті)
2. Manko V.O., Bilonoha O.O., Manko V.V. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization. Ukr. Biochem. J. 2019; 91 (3): 34–45. (Здобувач брала участь у виконанні експериментальної частини досліджень (дослідження швидкості дихання за окиснення різних субстратів), взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).

3. **Bilonoha O.**, Manko B.O., Manko V.V. Effects of insulin on adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 2020; 83: 24–30. (Здобувач особисто провела експериментальні дослідження, проаналізувала літературні дані, взяла активну участь у написанні й оформленні статті)
4. **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. *Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів.* Львів, 2015; 496–497.
5. **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. Луцьк – Світязь, 2015; 27.
6. **Сідорова О.**, Манько Б.В., Манько Б.О., Манько В.В. Мембранний блебінг і дихання інтактних панкреатичних ацинусів за дії алкоголю *in vivo*. *Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів.* Львів, 2016; 311–312.
7. **Сідорова О.**, Манько Б.О., Манько В.В. Максимальна окисна здатність мітохондрій та стійкість процесів мітохондріального дихання ацинарних панкреатитів. *Молодь і поступ біології: збірник тез XII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів.* Львів, 2016; 311–312.
8. 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; 64.
9. Манько В.В., Манько Б.О., **Сідорова О.**, Мазур Г.М., Манько Б.В. Алкоголь за хронічного введення на тлі високо жирної дієти порушує мітохондріальне дихання панкреатитів, але не гепатоцитів. VIII Міжнародна наукова конференція, присвячена 175-річчю кафедри фізіології людини і тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Київ, 2017; 69.
10. 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*. *Молодь і поступ біології: збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів.* Львів, 2017; 259–260.
11. 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. *Молодь і поступ біології: збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів.* Львів, 2017; 263–264.
12. **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. *Молодь і поступ біології: збірник тез XIII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів.* Львів, 2017; 267–268.
13. Манько Б.В. **Сідорова О.О.**, Манько Б.О., Манько В.В. Мембранний потенціал мітохондрій як критерій оцінки адаптаційної здатності мітохондрій. *Молодь і поступ*

- біології: збірник тез XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів. Львів, 2018; 287–288.
14. Якубовська А. **Сідорова О.**, Манько Б.О., Манько В.В. Вплив глутаміну на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози. Молодь і поступ біології: збірник тез XIV Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів Львів, 2018; 291–292.
15. Манько В.В. **Білонога О.О.**, Манько Б.О., Максимальна адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Матеріали Тематичного VII з'їзду УБФТ. Київ, 2018; 9.
16. Пат. 118820 Україна, МПК (2006) 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. – № u2017 02662 ; заявл. 21.03.2017; опубл. 28.08.2017, Бюл. № 16. – 4 с.
17. 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. – № u2017 02649 ; заявл. 21.03.2017; опубл. 28.08.2017, Бюл. № 16. – 3 с.

АНОТАЦІЯ

Білонога О.О. Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів за різних функціональних станів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.02 – біофізика – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2021.

Дисертація присвячена розширенню та валідації методології дослідження адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Вперше описано, що адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози можна охарактеризувати такими параметрами, як оптимальна концентрація протонофора, максимальна швидкість, сповільнення та прискорення роз'єданого дихання, а також коефіцієнт еластичності залежності швидкості дихання від мембранного потенціалу мітохондрій. Для формалізації оцінки використано обчислення площі приросту під кривими залежності швидкості дихання від концентрації FCCP. Встановлено, що ці параметри залежать від субстрату окиснення та функціонального стану ацинарних клітин. У стані спокою параметри адаптаційної здатності мітохондрій панкреатичних ацинусів були найвищими за окиснення суміші субстратів глюкози, глутаміну і пірувату. Ацетилхолін та холецистокінін збільшують максимальну швидкість дихання за окиснення глюкози та пірувату, а інсулін – за окиснення глюкози. Інсулін нівелює стимулюючий ефект холецистокініну на швидкість дихання за окиснення пірувату. Показано, що дія етанолу у поєднанні з ХЦК *in vitro* збільшує кількість некротичних клітин та стимулює утворення блеб плазматичної мембрани ацинарних клітин. Таке поєднання спричиняло зменшення швидкості роз'єданого дихання лише за тоді, коли у середовищі був глутамін (незалежно від присутності інших субстратів), що корелює із змінами інтенсивності флуоресценції родамину 123 та автофлуоресценції НАДН. Виявлено, що додавання до розчину пірувату та/або глутаміну нівелює

розвиток некрозу, спричинений дією етанолу та ХЦК *in vitro*. Після одноразового введення тваринам етанолу та ХЦК *in vivo* швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин знижується, а кількість блеб плазматичної мембрани збільшується. Досліджено, що хронічне введення етанолу підвищувало швидкість роз'єданого дихання за окиснення глюкози, зростала швидкість олігоміцин-нечутливого дихання за окиснення глюкози чи поєднання глюкози, пірувату та глутаміну та зменшувалось значення IC50 для FCCP-спричиненої деполяризації внутрішньої мембрани мітохондрій за окиснення глюкози, пірувату та глутаміну, проте всі ці ефекти усувалися введенням пірувату.

Отже, наведені вище параметри роз'єданого дихання оцінюють різні аспекти максимальної адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та є чутливими до змін функціональних станів.

Ключові слова: панкреатичні ацинуси, адаптаційна здатність мітохондрій, роз'єдане дихання, FCCP, етанол, субстрати окиснення.

АННОТАЦІЯ

Билонога О.О. Адаптационный ответ митохондрий ацинарных клеток поджелудочной железы крыс при различных функциональных состояниях. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.02 – биофизика. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2021.

Диссертация посвящена расширению и валидации методологии изучения адаптационного ответа митохондрий ацинарных клеток поджелудочной железы. Впервые показано, что адаптационный ответ митохондрий ацинарных клеток поджелудочной железы можно охарактеризовать такими параметрами, как максимальная скорость дыхания, оптимальная концентрация протонофора, замедление и ускорение разобщенного дыхания, а также коэффициент эластичности зависимости скорости дыхания от величины мембранного потенциала митохондрий. Для формализации оценки использовано вычисления площади прироста под кривыми зависимости скорости дыхания от концентрации FCCP. Установлено, что эти параметры зависят от субстрата окисления, а также от функционального состояния. Параметры адаптационного ответа митохондрий панкреатических ацинусов в состоянии покоя были самыми высокими при окислении смеси субстратов глюкозы, глутамина и пирувата. Под влиянием ацетилхолина и холецистокинина максимальная скорость дыхания панкреатических ацинусов увеличилась при наличии в среде пирувата, а инсулин – при окислении глюкозы. Инсулин устраняет стимулирующий эффект холецистокинина на скорость дыхания при окислении пирувата. Показано, влиянием этанола *in vitro* увеличило количество некротических клеток та образования блеб в плазматической мембране клеток. Такое сочетание вызвало уменьшение скорости разобщенного дыхания лишь при наличии в среде глутамина, независимо от других субстратов. Эти данные коррелируют с данными об интенсивности флуоресценции и автофлуоресценции НАДН в ацинарных клетках поджелудочной железы. Выявлено, что добавление пирувата и / или глутамина нивелирует развитие некроза, что был вызванный действием этанола

и ХЦК *in vitro*. После однократного введения животным этанола и ХЦК *in vivo* скорость разобщенного дыхания ацинарных клеток снижается, а количество блеб в плазматической мембраны увеличивается. Исследовано, что хроническое введение этанола повышало скорость разобщенного дыхания при окислении глюкозы, увеличивало скорость олигомицин-нечувствительного дыхания за окисления глюкозы или сочетание глюкозы, пирувата и глутамина, а так же уменьшалось значение IC50 для FCCP-вызванной деполяризации внутренней мембраны митохондрий за окисления глюкозы, пирувата и глутамина, однако все эти эффекты устранялись введением пирувата.

Итак, приведенные выше параметры разобщенного дыхания оценивают различные аспекты максимальной адаптационного ответа митохондрий ацинарных клеток поджелудочной железы и есть чувствительны к изменениям функциональных состояний.

Ключевые слова: панкреатические ацинусы, адаптационная способность митохондрий, разобщенное дыхание, FCCP, этанол, субстраты окисления.

ANNOTATION

Bilonoha O.O. Adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria upon various functional states. – Manuscript.

Thesis for PhD degree in Biology, specialty 03.00.02 – biophysics. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2021.

The dissertation is dedicated to the expansion and validation of the methodology of assessing the adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria.

New parameters of adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria were characterized: maximal uncoupled respiration, optimal protonophore concentration, respiration acceleration and deceleration. These parameters depended on the oxidative substrate and functional states of pancreatic acini. In most cases (except for glutamine oxidation) the acceleration was much higher after 1.5 μ M FCCP and maximal peak respiration – after 0.5 μ M FCCP. Only when malate or isocitrate was present, deceleration was significantly higher. It has been found that, the increase in the respiration rate was proportional to the decrease in membrane potential. The coefficient of elasticity and the area under the curves of the dependence of respiratory rate on the concentration of FCCP were used for formalize the assessment of adaptive capacity of mitochondria. Elasticity coefficient was the highest when the combination of glucose, glutamine and pyruvate was present and the lowest when monomethyl-succinate was oxidized. The combination of three substrates (glucose, pyruvate and glutamine) maintains the highest respiration rate in response to FCCP load.

Upon acetylcholine or cholecystokinin stimulation, maximal uncoupled respiration rate increased only upon the oxidation of pyruvate with glucose; insulin stimulated only when glucose-fueled uncoupled respiration, but abolished the stimulative effect of cholecystokinin on pyruvate-fueled uncoupled respiration.

Ethanol *in vitro* suppressed rate of cholecystokinin-stimulated uncoupled respiration of pancreatic acini, while combination of ethanol with cholecystokinin caused an increase in number of necrotic cells and cells with plasma membrane blebs. These effects were dependant on the oxidative substrates in the medium. Combination of ethanol and CCK *in vitro* caused the decrease of uncoupled respiration of pancreatic acini only upon the oxidation of

glutamine independently of other substrates. Moreover, mitochondrial membrane depolarization and NADH autofluorescence increase caused by CCK and ethanol were not observed upon glutamine supplementation. Combination of ethanol and CCK caused increase necrosis only in case of glucose presence, but not when either pyruvate or glutamine were added. Substantial increase in plasma membrane blebbing was observed only after incubation with combination of glucose, glutamine, pyruvate and combination of ethanol and CCK.

After a single *in vivo* administration of ethanol (2 h), CCK (1 h) or combination thereof, the fraction of necrotic cells and plasma amylase level did not change indicating the lack of pancreatic damage. However, the number of cells with membrane blebbing substantially increased in animal group treated with both ethanol and CCK. Basal respiration rate of isolated pancreatic acini was lower in animals after ethanol administration irrespectively of the oxidative substrate. Neither EtOH nor CCK on their own affected the uncoupled respiration, but their combination caused a significant decrease of the maximal uncoupled respiration.

Chronic alcohol administration (14 days) caused an increase of FCCP-stimulated respiration upon glucose oxidation, but not when pyruvate was co-administered for 7 last days. Pyruvate also ameliorated the negative effects of ethanol administration on other mitochondrial parameters: oligomycin-insensitive respiration and IC_{50} of FCCP on mitochondrial membrane potential. Number of necrotic cells mildly increased in the group of animals after ethanol administration, but no such effect was observed in the group of animals that were also injected with pyruvate. Plasma amylase level in animals after ethanol administration did not increase indicating no full-blown pancreatitis.

Thus, the parameters of adaptive mitochondrial capacity are useful tools to study both different aspects of normal pancreatic acinar cells functioning and mechanisms of pathogenesis of pancreatic diseases.

Key words: pancreatic acini, adaptive capacity of mitochondria, uncoupled respiration, FCCP, ethanol, oxidation substrate.

Підписано до друку
Формат 60×90/16. Папір офсетний.
Друк на різнографі. Зам. №
Ум. друк. арк. 0,9
Наклад 100 прим.