

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Білонога Ольга Олегівна

УДК 577.23 : 57.042 : 612.34

АДАПТАЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ МІТОХОНДРІЙ АЦИНАРНИХ КЛІТИН
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ ЗА РІЗНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ
СТАНІВ

03.00.02 – біофізика

подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії
(кандидата біологічних наук)

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

_____ Білонога О.О.

Науковий керівник: **Манько Володимир Васильович**, доктор біологічних
наук, професор

Львів – 2021

АНОТАЦІЯ

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

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 вивчення 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. Досліджено, що для всіх субстратів окиснення, окрім глютаміну, найвищі показники прискорення дихання реєстрували після внесення 1,5 мкмоль/л FCCP, а максимальний пік швидкості дихання – після внесення 0,5 мкмоль/л FCCP. Найвищі показники коефіцієнту еластичності для ацинарних клітин підшлункової залози реєстрували за окиснення комбінації глюкози, глютаміну та пірувату, і найнижчі за окиснення монометилсукцинату. Досліджено, що у стані спокою параметри адаптаційної здатності мітохондрій панкреатичних ацинусів були найвищими за окиснення суміші субстратів глюкози, глютаміну і пірувату.

Встановлено, що ацетилхолін та холецистокінін збільшують адаптаційну здатність мітохондрій панкреатичних ацинусів лише за окиснення глюкози та пірувату. Виявлено, що інсулін стимулює адаптаційну здатність мітохондрій панкреатичних ацинусів за наявності саме глюкози, а не пірувату. Також

показано, що інсулін усуває ефекти холецистокініну на швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози за наявності пірувату.

Показано, що дія етанолу у поєднанні з ХЦК *in vitro* збільшує кількість некротичних клітин та стимулює утворення блеб плазматичної мембрани ацинарних клітин. Встановлено, що швидкість базального дихання не залежала ні від субстрату, ні від поєднання холецистокініну з етанолом, на відміну від швидкості роз'єданого дихання, що знижувалася лише за тоді, коли у середовищі був глутамін (незалежно від наявності інших субстратів). Отримані результати корелюють з іншими мітохондріальними показниками, а саме даними про інтенсивність флуоресценції та автофлуоресценції НАДН у ацинарних клітинах підшлункової залози.

Показано, що за умов короткотривалого введення *in vivo* розчину етанолу (2 год) у поєднанні з стимуляцією секреції (1 год) суттєво збільшило кількість клітин з утворенням блеб на плазматичній мембрані у групі тварин, які отримували розчин етанолу та холецистокініну. Проте таке поєднання не впливало на відсоток некротичних клітин та рівень амілази в плазмі крові тварин, що свідчить про відсутність ушкодження підшлункової залози, хоча зміни адаптаційної здатності мітохондрій вже були зареєстровані. Встановлено, що у групі тварин, яким вводили етанол та холецистокінін швидкість роз'єданого дихання знижувалась, проте не відрізнялась у групах тварин, яким вводили лише етанол чи холецистокінін.

На основі отриманих результатів було проаналізовано вплив пірувату *in vivo* на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітинах підшлункової залози щурів за умов введення етанолу на тлі високожирової дієти. Вперше зареєстровано, що піруват нівелює негативний вплив хронічного введення етанолу на функціонування мітохондрій. Водночас досліджено, що рівень амілази у групах тварин, яким вводили етанол не відрізнявся від контрольних значень. А кількість некротичних клітин зростала у групі тварин, яким вводили етанол, проте такого ефекту не спостерігали у групі тварин, яким також вводили і піруват. Зареєстровано, що FCCP-стимульована швидкість

дихання збільшилось за наявності у середовищі пірувату та глютаміну у всіх дослідних групах. Досліджено, що хронічне введення етанолу підвищувало FCCP-стимульоване дихання за окиснення глюкози, проте такого ефекту не спостерігалось у групі тварин, яким також вводили піруват. Отримані результати позитивного впливу пірувату корелюють і з іншими показниками: олігоміцин-нечутливе дихання, мембранний потенціал мітохондрій та IC50.

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.

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 B.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 V. **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 високожирної дієти порушує мітохондріальні 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.

ANNOTATION

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

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

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 μM FCCP and maximal peak respiration – after 0.5 μM FCCP. Only when malate or isocitrate was pre-sent, 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.

To determine whether the mitochondrial adaptability of pancreatic acinar cells changes with changes in functional status, stimulators of the secretory response of the pancreatic acini were used. For investigation adaptive capacity of rat pancreatic acinar cells mitochondria for changes in their functional state, we used stimulators of the secretory response of the pancreatic acini. 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 cholecystinin-stimulated uncoupled respiration of pancreatic acini, while combination of ethanol with cholecystinin 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 IC₅₀ 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.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – Аденозиндифосфат

АМФ – Аденозинмонофосфат

АМФК – АМФ-залежна протеїназа

АЛТ – Аланінамінотрансфераза

АТФ – Аденозинтрифосфат

АХ – Ацетилхолін

ЕПР – Ендоплазматичний ретикулум

НАДН – Нікотинамідаденіндинуклеотид

ФАД – Флавінаденіндинуклеотид

ХЦК – Холецистокінін,

ЦТК – Цикл трикарбонових кислот

ГАЕЕ – Етилові ефіри жирних кислот

ІЛ-6 – Інтерлейкін 6

Зміст

ВСТУП	14
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	20
1.1. Регуляція окисного фосфорилування у живих клітинах та методологічні підходи до її дослідження	20
1.2. Особливості будови та мітохондріального окиснення ацинарних клітин підшлункової залози	27
1.3. Негативний вплив алкоголю та жирних кислот на функціонування мітохондрій підшлункової залози	31
1.4. Використання нутрієнтів для корекції патологічних процесів у підшлунковій залозі	34
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	38
2.1. Умови роботи з тваринами при проведенні досліджень	38
2.2. Методика ізолювання ацинарних клітин підшлункової залози	41
2.3. Полярнографічна реєстрація швидкості споживання кисню ізолюваними ацинусами	42
2.4. Флуоресцентна мікроскопія.....	43
2.5. Метод дослідження секреції амілази	46
2.6. Ензиматичний метод визначення вмісту етанолу в плазмі крові	47
2.7. Газово-хроматографічне визначення вмісту етанолу в плазмі крові	47
2.8. Трансмисійна електронна мікроскопія	48
2.9. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження	48
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	51
3.1. Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення різних субстратів.	51

3.2. Залежність швидкості дихання від мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози.....	62
3.3. Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів за впливу ацетилхоліну, холецистокініну та інсуліну	68
3.4. Механізми змін адаптаційної здатності мітохондрій за короткочасного впливу алкоголю та холецистокініну <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i>	78
3.5. Вплив довготривалої дії алкоголю та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій підшлункової залози щурів на тлі високожирової дієти.	94
4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	103
ВИСНОВКИ.....	111
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	113
ДОДАТОК А.....	136

ВСТУП

Актуальність теми. Мітохондрії є ключовими органелами, що забезпечують енергетичні потреби клітини. Процеси мітохондріального окиснення не є статичними, а регулюються від-повідно до функціонального стану клітини [39; 138; 198; 197;]. Здатність мітохондрій адекватно адаптуватись до змін енергетичних потреб є передумовою тривалої і ефективної життє-діяльності клітини [79; 131].

Одним із способів оцінки функціонального стану мітохондрій є визначення максимальної швидкості дихання за допомогою протоніофорів, що деполяризують внутрішню мембрану мітохондрій і активують максимальну компенсаторну реакцію дихального ланцюга [28; 167; 197]. Однак цей методологічний підхід до вивчення адаптаційної здатності мітохондрій недостатньо детально розроблений. Не приділяють достатньої уваги, зокрема, зниженню дихання після максимальної стимуляції, часу дії протоніофора та його концентрації.

Ацинарні клітини підшлункової залози синтезують велику кількість білка [195] та забезпечують значний його експорт шляхом секреції, що потребує достатньої кількості енергії та пластичних речовин [117]. Значна кількість АТФ у цих клітинах синтезується шляхом окисного фосфорилування [140; 188; 198; 199]. Дані про протоніофор-стимульоване дихання ізольованих ацинарних клітин чи ацинусів підшлункової залози є неповними та суперечними [118; 140; 178]. У значній мірі нез'ясованою залишається залежність роз'єднаного дихання від надходження субстратів окиснення, концентрації протоніофора 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 [44; 45]. 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 [212].

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 «Ca²⁺-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 дослідження. 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 секретогогів, інсуліну та етанолу.

Методи дослідження. *Біофізичні* – дослідження параметрів дихання ізольованих ацинозів; *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 Стюдента, 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, глу-таміну 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 глютамін (незалежно від наявності інших субстратів), що корелює зі змінами інтенсивності флуоресценції родаміну 123 й автофлуоресценції НАДН. Виявлено, що додавання до розчину пірувату та/або глютаміну нівелює розвиток некрозу, спричинений дією етанолу та холецистокініну *in vitro*. Після одноразового введення тваринам етанолу та холецистокініну *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 високожиро-вої 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 біо-логії» (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” (Київ – 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.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Регуляція окисного фосфорилування у живих клітинах та методологічні підходи до її дослідження

Окисне фосфорилування забезпечує синтез більшої частини АТФ, яку вищі тварини використовують для підтримки життєдіяльності, і відповідає за встановлення та підтримку метаболічного гомеостазу. Було підраховано, що середня людина у спокої споживає 100 ккал / год, що становить близько 65 кг АТФ / день [169].

Ключовим функціональним елементом у мітохондріях є окисне фосфорилування, що поєднує в собі транспорт електронів у дихальний ланцюг та синтез АТФ. Електрон-транспортний ланцюг мітохондрій включає: НАДН-дегідрогеназу (комплекс I) [176], сукцинатдегідрогеназу (комплекс II) [35], убіхінон: цитохром с-оксидоредуктазою (комплекс III) [75], цитохромоксидаза (комплекс IV) [193]. Більшість електронів, що транспортуються за допомогою дихального ланцюга, надходять від НАДН та передаються до кисню, тоді як мембранний потенціал мітохондрій генерується перекачуванням протонів через внутрішню мітохондріальну мембрану, а протонний градієнт використовується АТФ-синтазою (комплекс V), яка використовує зворотний потік протонів для виробництва АТФ [106].

Процеси окисного фосфорилування регулюються рівнем НАДН (або іншого джерела електронів з високим потенціалом), киснем, АДФ та неорганічним фосфором. Найважливішим фактором, що визначає швидкість окисного фосфорилування, є рівень АДФ. Відомо, що швидкість споживання кисню мітохондріями помітно зростає при додаванні АДФ, а потім повертається до початкового значення, коли доданий АДФ перетворюється на АТФ [13]. Рівень АДФ також впливає на швидкість циклу трикарбонових кислот через потребу в НАД⁺ і ФАД. Фізіологічне значення цього регуляторного механізму очевидне, оскільки рівень АДФ підвищується при споживанні АТФ, і тому окисне фосфорилування пов'язане з використанням

АТФ. Електрони не переносяться від субстратів окиснення на O_2 , якщо не потрібно синтезувати АТФ [13].

Також важливим регулятором окисного фосфорилування є співвідношення внутрішньомітохондріального рівня $НАД^+$ до НАДН, що є джерелом більшості відновлювальних еквівалентів, які використовуються для окисного фосфорилування та є джерелом окисно-відновного потенціалу. Потенціал напівредукції для пари $НАД^+$ становить $-0,320\text{ V}$, а $pH = 7,0$ [69; 86]. Зниження рівня внутрішньомітохондріального $НАД^+$ зміщує енергетичну рівновагу вправо, а концентрація АДФ – уліво для кожного оберту цитохрому с.

Ще однією найбільш загально визнаною системою для обміну сигналами про енергетичний стан клітини є АМФ-залежна протеїнкіназа (АМФК). АМФК називають головним регулятором енергетичного обміну [63; 90; 206]. Коли клітинам потрібний високий рівень АДФ та АТФ, то АМФК індукує підвищений вміст мітохондрій, а також впливає на концентрацію ферментів [191; 90]. Наприклад, подібні зміни спостерігалися в м'язах, що зазнали хронічної легкої ішемії [172] та у ізольованих перфузійних серцях щурів, в яких потік перфузату тісно корелює з енергетичним станом тканини [150].

Специфічні регулятори комплексів дихального ланцюга встановлені лише для цитохром с-оксидоредуктази (IV комплекс дихального ланцюга): експресія ізоформ, алостеричний контроль та фосфорилування [96]. Було показано, що субодиниця V_a , яка не має трансмембранної спіралі та локалізується на ділянці матриксу, зв'язує тиреоїдний гормон T_2 , що алостерично інгібує АТФ [9]. Цитохром с-оксидоредуктази, що містить ізоформу типу печінки V_{Ia} , перекачує протони при високому співвідношенні в присутності кардіоліпіну незалежно від співвідношення АТФ / АДФ, тоді як додавання пальмітату призводить до зниження стехіометрії протон / електрон [128].

Встановлено, що активація цАМФ шляху з використанням активатора аденілатциклази форсколіну призводить до інгібування IV комплексу

дихального ланцюга завдяки прямій взаємодії. Очевидно, що залежний від цАМФ шлях веде до фосфорилування цитохром с-оксидоредуктази та пригнічує його активність [127].

Протягом останніх двох десятиліть робота багатьох лабораторій встановила важливість дії NO на мітохондріальну функцію [31; 30;85]. Цікаво, що підтип nNOS локалізується в мітохондріях і тому був позначений мітохондріальним NOS (mtNOS) [189]. mtNOS може безпосередньо взаємодіяти з цитохром с-оксидоредуктазою та зв'язуватися із субодиницею Va [163]. Підвищений рівень NO у клітинах корелює з багатьма захворюваннями людини, включаючи артрит [48], сепсис та септичний шок [11], травми [185], рак [73], ожиріння та діабет [186]. Інгібування клітинного дихання також є можливим механізмом, що лежить в основі розвитку нейродегенеративних захворювань, опосередкованих надмірним продукуванням NO [186].

Також було встановлено, що цитохром с-оксидоредуктаза ссавців містить ділянку обміну кальцію і натрію в субодиниці I [113]. Функція оборотного зв'язування кальцію невідома. Були повідомлення, що вказують, що цитохром с-оксидоредуктаза може зв'язувати принаймні два іони цинку в двох різних місцях, що призводить до інгібування ферментів і, зокрема, до інгібування процесу перенесення протонів [65; 120; 144]. Проте залишається до кінця незрозумілим чи коливання концентрацій цинку може впливати на активність цитохром с-оксидоредуктази та чи справді цинк є фізіологічним регулятором.

Для дослідження окисного фосфорилування використовують як ізольовані мітохондрії, так і цілісні клітини чи групи клітин. Дослідження на ізольованих мітохондріях має певні переваги, адже відсутній вплив цитозольних факторів та додаткові речовини додають прямо до суспензії мітохондрій [28], проте за таких умов втрачається клітинний контакт. Також у процесі ізолювання мітохондрії дуже пошкоджуються, а виділення мітохондрій з малих та щільних тканин може бути досить проблематичним.

Незважаючи на пошкодження під час виділення, ізольовані мітохондрії дуже корисні для вивчення часткових реакцій окисного фосфорилування, що є важливим для розуміння того, як вони функціонують *in vivo* та *in vitro* [96].

Одним з методів дослідження окисного фосфорилування є реєстрація протонрушійної сили. Вона складається з двох компонентів: ΔpH (градієнт рН на внутрішній мембрані) та $\Delta \psi_m$ (мембранний потенціал мітохондрій (різниця в електричному потенціалі між цитоплазмою та матрицею)) [28]. Проте вимірювання протонного струму, як правило, є більш інформативним.

Тісне зв'язування між транспортом електронів та екструзією протонів як в мітохондріях, так і в клітинах [27; 88; 166] означає, що для даного субстрату швидкість використання мітохондріального кисню є точним показником загального струму протона. Ця швидкість вимірює активність одного процесу: перенесення в комплексі IV чотирьох електронів до молекули кисню для утворення двох молекул води. Незважаючи на це очевидне обмеження, експерименти можуть бути призначені для отримання інформації про широкий спектр процесів. Наприклад транспорт субстрату в клітину чи мітохондрію, доставку електронів до дихального ланцюга та діяльність одного з комплексів електрон-транспортного ланцюга, синтез або експорт чи використання АТФ у клітинах.

Використання реєстрації швидкості дозволяє проводити експерименти у яких найлегше розпізнати та визначити кількісно дисфункцію мітохондрій. Кисневий електрод Кларка використовується протягом 50 років для вимірювання мітохондріального дихання [36], але інші методи, наприклад, аналіз флуоресценції на основі пластин [78; 205], може надати ту ж інформацію.

Класичні експерименти для визначення функціональної активності мітохондрій з використанням кисневих електродів були розроблені Ченсом та Вільямсом [36]. До ізольованих мітохондрій спочатку додають субстрат, після чого додають АДФ, що дозволяє АТФ-синтазі функціонувати, протонрушійна сила починає зменшуватися і прискорюється транспорт електронів («стан

$3_{\text{АДФ}}$). За умов коли встановлюється рівновага у співвідношенні концентрації АТФ до АДФ, то протонрушійна сила збільшується, повторне надходження протону через синтазу припиняється, а дихання сповільнюється («стан 4»). Будь-яка забруднююча активність АТФази (наприклад, порушені мітохондрії з незчепленими АТФазами або залишковими м'язовими волокнами в м'язовому мітохондріальному препараті) запобіжить відновленню слабкого дихання. З цієї причини дихання стану $3_{\text{АДФ}}$ може бути припинено додаванням інгібітора АТФ-синтази олігоміцину для досягнення швидкості «стану 4_o» («стан 4_{oligomycin}»). Внесення олігоміцину може супроводжуватися додаванням протоннофора FCCP (карбонілціанід-п-трифторметоксифенілгідрозон) для надання роз'єданого дихання ("стан 3_{FCCP} ") [29].

Для кількісної оцінки функціонування мітохондрій використовують два параметри: коефіцієнт дихального контролю (стан 3 / стан 4), який визначається як дихання в стані $3_{\text{АДФ}}$, поділене на таке у стані 4 та співвідношення Р / О (респіраторний контроль), 1 моль синтезованого АТФ на 1 моль використовуваного О ($1 / 2\text{O}_2$). У нормі мітохондрії в правильно підібраних умовах інкубації демонструють високий дихальний контроль: збільшення частоти дихання при АДФ з подальшим поверненням до стану 4. Респіраторний контроль мітохондрій оцінює основну функцію мітохондрій, а саме їх здатність реагувати на АДФ, утворюючи АТФ з високою швидкістю. Високий коефіцієнт дихального контролю означає, що мітохондрії мають високу здатність до окислення субстрату та обміну АТФ та низький витік протону.

Дихальний контроль мітохондрій - це складна функція, значення якої залежить від численних факторів: зміна майже будь-якого компоненту окисного фосфорилування змінить коефіцієнт дихального контролю [29].

Загальним методом моніторингу $\Delta\psi_m$ є інкубація суспензії мітохондрій з низькими концентраціями ліпофільних катіонів, що пронизують мембрану, таких як TRP⁺ (іон тетрафенілфосфонію) або TRMP⁺ (іон

трифенілметилфосфонію) та кількісна оцінка поглинання катіонів з використанням зовнішнього макроелектрода [28; 109].

Ще одним популярним методом є суспендування мітохондрій у кюветі з регульованою температурою або багатопланшетній пластині та визначення зміни загальної передачі у відповідь на ефектори мембранного потенціалу.

Поширеним підходом для оцінки мітохондріальної біоенергетичної дисфункції є вимірювання експресії, концентрації або максимальної активності кількох комплексів електрон-транспортного ланцюга або метаболічних ферментів, таких як комплекс I, комплекс IV або ферменти циклу трикарбонової кислоти [29].

Також популярною моделлю для дослідження окисного фосфорилування є ізольовані клітини, що в свою чергу мають наступні переваги: непорушене клітинне середовище та більша фізіологічна значимість, взаємодія з рештою клітини зберігається, хоча багато реагентів і субстратів є непроникними для мембрани, обмежуючи експериментальні можливості [29].

Донедавна єдиним приладом, який зазвичай використовувався для контролю клітинного дихання, були кисневий електрод і камера Кларка. Він широко застосовувався для дослідження швидкості поглинання кисню нервовими закінченнями (синаптосомами) [26; 179], гепатоцитами [2, 142], раковими клітинами [93] та ацинарними клітинами підшлункової залози [139,140] проте нині є більш популярна модель, а саме клітинний респірометр, що суперфузує інкубаційне середовище над клітинним моношаром у закритій перфузійній камері [100]. Мікропроточні кисневі електроди, розміщені вище і нижче за течією, дозволяють постійно контролювати частоту дихання клітин, а камера встановлена на флуоресцентному мікроскопі, що дозволяє паралельно контролювати сигнали флуоресценції. До прикладу, таке обладнання використовувалося для моніторингу дихання культивованих нейронів з акцентом на енергетичні потреби патологічної активації рецепторів глутамату [100; 105; 154].

Описано декілька методик для моніторингу дихання клітин з використанням флуоресценції для контролю концентрації кисню в середовищі. Ці методи працюють або в стаціонарному стані, де споживання кисню врівноважується внутрішньою дифузією кисню [54] або вимірюють виснаження кисню в герметичній камері [97; 213].

Швидкість синтезу мітохондріального АТФ у визначеному базальному стані можна оцінити за зменшенням дихання при інгібуванні АТФ-синтази олігоміцином. Максимальна швидкість дихання, спричинена додаванням протонофора, такого як FCCP, відображає більш складний і нестабільний стан у клітинах, ніж у ізольованих мітохондріях, де субстрат додається в надлишку, а стан з є обмежений V_{\max} поглинанням субстрату, метаболізмом та діяльністю дихального ланцюга [29].

Також для дослідження окисного фосфорилування використовують флуоресцентний моніторинг $\Delta\psi_m$. Реєстрація показників потенціалу мембрани мітохондрій є найпоширенішим методом контролю функції мітохондрій в інтактних клітинах на одноклітинному або навіть одномітохондріальному рівні. Використання такого зонда, як родамін 123 використовується не лише для реєстрації мітохондріального потенціалу, а й для тестування на наявність транспортерів [17].

Кілька біоенергетичних проміжних продуктів, крім $\Delta\psi_m$, можна виміряти в клітинних моношарах. Визначення рівня АТФ у клітині проводять з використанням люциферази, а рівень НАДН оцінюють за допомогою автофлюоресценції. Загалом, вони дають приблизно ту саму інформацію, що і $\Delta\psi_m$, оскільки вони тісно пов'язані між собою [29].

Респірометрія всього тіла теж може бути використана для вивчення функції мітохондрій *in vivo*, адже більша частина кисню, який вдихає людина, споживається цитохромоксидазою в тканинах. Тому дихання всього тіла використовується для вимірювання загальної швидкості транспорту електронів у мітохондріях [29]. А позитронно-емісійна томографія дозволяє безпосередньо вимірювати *in vivo* поглинання глюкози клітинами з

отриманням тривимірної та динамічної картини використання енергії в різних тканинах.

Кращим методом оцінки для біоенергетики *in vivo* є використання стабільного радіоактивного ізотопу фосфору для ядерного магнітного резонансу, що дозволяє виміряти АТФ в інтактних органах. Заблокувавши кровотік, а потім вивільнивши його, можна виміряти швидкість ресинтезу АТФ, даючи оцінку максимальної здатності окисного фосфорилування генерувати АТФ, швидкості обороту АТФ у стаціонарному стані та (використовуючи відповідні показники споживання кисню) ефективно співвідношення Р / О [42]. Такі підходи мають великі перспективи для безпосереднього вивчення функції та дисфункції мітохондрій *in vivo*.

1.2. Особливості будови та мітохондріального окиснення ацинарних клітин підшлункової залози

Відомо, що підшлункова залоза складається з двох частин – екзо- та ендокринної. Екзокринна частина залози представлена ацинарними та протоковими клітинами. Ацинарні клітини підшлункової залози є структурними одиницями, що секретують ферменти у відповідь на стимуляцію первинними агоністами. Ці клітини є сильно поляризованими та містять багато гранул зимогену, які розташовуються у їх апікальній частині, що зумовлено їх функцією. У базалатеральній частині клітини домінує ендоплазматичний ретикулум (ЕПР), що оточує ядро [83]. Дослідження Герасименка та співавторів показали, що кожна везикула із зимогеном оточена ЕПР [77]. Ці структурні докази у поєднанні з функціональними дослідженнями демонструють високий рівень транспортування іонів Ca^{2+} у просвіті ЕПР для забезпечення цитозольного кальцієвого сигналу в апікальній частині ацинарних клітин підшлункової залози.

Ранніше вважалося, що мітохондрії поширені по всій клітині, а розмір та їх внутрішньоклітинний розподіл залежить від різних параметрів таких, як форма клітини, організація цитоскелету, а також потреби в енергії [19, 20 ; 72;

183]. Проте дослідження Джонсона та співавторів демонструють, що у ацинарних клітинах підшлункової залози найбільша щільність мітохондрії була у перигранулярній частині, де мітохондрії займали $25,69 \pm 1,58$ % площі, тоді у субплазмолемному регіоні $12,61 \pm 0,77$ % та перинуклеарній частині $9,07 \pm 0,97$ % [104]. Автори також показують, що мітохондрії тісно пов'язані з внутрішньоклітинними органелами, включаючи ЕПР та плазматичну мембрану, а перинуклеарні мітохондрії завжди відокремлені від нуклеоплазми шарами ЕПР. Мітохондрії є енергетичними станціями і важливість дослідження біоенергетики у фізіологічних та патофізіологічних процесах підшлункової залози була підкреслена в ряді досліджень [16; 44; 89; 118; 177; 197; 152].

Стаття Бадудінга та його колег вказує, що 90% АТФ у підшлунковій залозі виробляється у процесі окисного фосфорилування [18]. Однак у цій роботі інгібування АТФ-синтази з високою концентрацією олігоміцину призвело до зниження концентрації АТФ лише на 60%. Антиміцин викликав набагато сильніше зниження АТФ [18], проте індукований антиміцином колапс мембранного потенціалу мітохондрій ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози, як очікується, є причиною зворотньої дії АТФ-синтази і, як наслідок, збільшення споживання АТФ мітохондріями [18].

Х. Косовський та його колеги з лабораторії В. Халангга показали зменшення вмісту АТФ приблизно на 21% порівняно з контролем після індукції гіпоксії [118]. Експерименти з моделюванням гіпоксії та використання антиміцину можна трактувати, як доказ досить невеликого внеску гліколізу в генерацію АТФ у ацинарних клітинах підшлункової залози. Експерименти з олігоміцином або його поєднання з інгібітором електронно-транспортного ланцюга можуть дати кращу оцінку внеску гліколізу в генерування АТФ у ацинарних клітинах підшлункової залози. Деякі автори повідомляють про 41% АТФ [18], що утворюється за допомогою гліколізу. Це вказує на значний внесок цього процесу в генерацію АТФ у ацинарних клітинах підшлункової залози [188; 199].

Про це повідомляють і дослідження Вороніної та співробітників використовували інгібітори окисного фосфорилування та олігоміцин для забезпечення інгібування окисного фосфорилування в умовах, коли АТФ-синтаза також інгібується (і не може бути перетворена в додаткового потужного споживача АТФ) та виявили, що окисне фосфорилування мітохондрій відповідає приблизно за половину вмісту АТФ в ацинарних клітинах підшлункової залози. На основі цих фактів можна зробити висновок, що і гліколіз, і окисне фосфорилування вносять значний внесок у вироблення АТФ у клітинах ацинарних клітин [199].

На пермеабілізованих ацинарних клітинах підшлункової залози було продемонстровано, що внесення АДФ у низькій концентрації (100 ммоль / л) не впливала на швидкість дихання мітохондрій, тоді як при більш високій концентрації (750 ммоль / л) спостерігалось короткочасне посилення дихання.

Крім того, рівень виробництва гліколітичного та окисного АТФ залежить від зовнішніх факторів. Зокрема, секретогоги, які виробляють помірні сигнали Ca^{2+} , підвищують швидкість циклу Кребса та генерування мітохондріального АТФ [39; 198; 199], тоді як застосування інсуліну посилює гліколітичну продукцію АТФ, яка може підтримувати біоенергетику ацинарних клітин з пошкодженими мітохондріями [138; 174]. За умов стимуляції секретогогами (церулеїн, холецистокінін або карбахолін) рівні клітинного АТФ були стабільними або навіть дещо підвищеними [117; 2004]. Хоча підвищені потреби в енергії, що виникають внаслідок стимуляції секреції, повинні навпаки зменшити вміст АТФ. Таким чином, були отримані парадоксальні результати, що наштовхнуло на думку про існування ефективного механізму, який здатний надмірно компенсувати збільшене використання АТФ. Це підтверджують дослідження М. Корса та його колег, що демонструють сильну та швидку регуляцію поглинання глюкози в ізольованих панкреатичних ацинусах мишей, які були стимульовані секретогогами [117]. Досліди проводилися також з використанням церулеїну, холецистокініну та карбахоліну і всі вони показали збільшення споживання

глюкози у 2,5 – 3 рази порівняно з контролем [117]. Для панкреатичних ацинусів встановлено, що секретогоги (ацетилхолін та холецистокінін) викликають деполяризацію внутрішньої мембрани мітохондрій [167; 197], підвищують вміст НАДН [198], збільшують рівень АТФ [199] та інтенсифікують швидкість дихання [139].

Важливі висновки, що характеризували роль, яку відіграє сигналізація Ca^{2+} у регулюванні біоенергетики, були зроблені в лабораторії Дентона. Ці експерименти виявили здатність Ca^{2+} підвищувати швидкість циклу Кребса [53; 143].

Для ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози є дані щодо FCCP і динітрофенол-стимульованого дихання, однак показники суттєво відрізняються у різних авторів [118; 140; 178]. Залежність роз'єданого дихання від надходження окисних субстратів систематично не вивчалась у інтактних ацинусах підшлункової залози. Відмінності у забезпеченні окислювальними субстратами є очевидною причиною розбіжностей у показниках максимальної швидкості протонофор-стимульованого дихання ацинарних клітин підшлункової залози щурів: FCCP мав значно менший вплив на дихання, за окиснення лише глюкози [140], ніж у випадку з добавкою ще й глутаміну [118].

Дослідження, проведене С. Арая та його колегами, підкреслило високий рівень транспорту глутаміну в ацинарних клітинах підшлункової залози [8]. На основі оригінальних даних аворами було зроблено висновок, що глутамін є найкращим джерелом енергії для ацинарних клітин підшлункової залози, адже ці клітини здійснюють ефективне перетворення глутаміну в глутамат з подальшим використанням глутамату через α -кетоглутарат у циклі Кребса [8]. Проте інші субстрати теж використовували для вивчення синтезу АТФ мітохондрій у клітинах ацинарних клітин підшлункової залози, а саме піруват та глюкозу [199]. Тому, на сьогодні залишається відкритим питання про ефективне субстратне забезпечення процесів окисного фосфорилування у мітохондріях ацинарних клітин підшлункової залози.

1.3. Негативний вплив алкоголю та жирних кислот на функціонування мітохондрій підшлункової залози

Відомо, що надмірне споживання алкоголю є одним з факторів, що спричиняє розвиток різних патологічних станів організму. За оцінками Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я 4 з 100 смертей у світі, викликані споживанням алкоголю [211]. Недавнє дослідження датських вчених повідомляє про підвищений ризик розвитку гострого панкреатиту у осіб, які споживають понад 14 чарок спиртних напоїв на тиждень, незалежно від виду або частоти його прийому [119]. Проте, введення високих доз етанолу протягом тривалого періоду перорально або парентерально не викликає змін, характерних як для гострого, так і для хронічного панкреатиту [50]. На відміну від впливу етилових ефірів жирних кислот [43; 87; 200] або етанолу з інгібуванням його окислювального механізму [201] або з кукурудзяною олією [192; 115] або з секретогогами у дозах, які інакше б не викликали б панкреатит [50; 110; 157; 134].

Встановлено, що для ацинарних клітин підшлункової залози характерні два різні шляхи метаболізму етанолу: окисний та неокисний [47; 87]. Дані літератури свідчать про, те що обидва шляхи, швидше за все, сприятимуть шкідливому впливу алкоголю на ацинарні клітини підшлункової залози через різні механізми, які в кінцевому рахунку викликають зниження функціональної здатності мітохондрії цих клітин [44; 45; 180; 147]. Окисний метаболізм протікає через залучення нікотинамід аденіндинуклеотид (НАД⁺) у декілька етапів під дією альдегіддегідрогеназ (ADH та ALDH) з утворенням ацетальдегіду та ацетату, відповідно. Недавні результати свідчать, що етанол індукує дисфункцію мітохондрій, зменшуючи співвідношення саме окислених та відновлених форм НАД, на відміну від механізму впливу високих концентрацій холецистокініну, що пов'язаний зі збільшенням концентрації йонів Ca²⁺ у цитозолі [180; 167].

Неокисний метаболізм етанолу сприяє етерифікації жирних кислот з утворенням високоліпофільних етилових ефірів жирних кислот (FAEE) за допомогою відповідної синтази, включаючи карбоксиефірліпазу, а також тригліцеридліпазу, ліпопротеїнліпазу та ацил-коферментА: етанол-О-ацилтрансфераза [126]. Доведено, що підшлункова залоза містить високі концентрації неокислювальних синтетазних ферментів [125; 87]. Активність FAEE-синтази у клітинах підшлункової залози людини становить до 54 нмоль / хв / г, що сприяє формуванню високого рівня етилових ефірів жирних кислот у тканині [57]. Дослідження показали, що у осіб, які померли від гострої інтоксикації алкоголю, був здебільшого підвищений рівень етилових ефірів жирних кислот в підшлунковій залозі на відміну від інших органів, які зазвичай пошкоджуються алкоголем, а саме серце та легені [125]. Це означає, що механізм неокисного метаболізму етанолу відіграє важливу роль при пошкодженні підшлункової залози.

У ацинарних клітинах підшлункової залози етилові ефіри жирних кислот зв'язуються з рецепторами інозитолтрифосфату та викликають вивільнення йонів Ca^{2+} з ЕПР. Такий вплив виснажує внутрішні кальцієві депо та сприяє стійкому підвищенню $[Ca^{2+}]_v$ у цитозолі, що здійснює токсичний вплив на клітинні структури та врешті-решт сприяє некротичній загибелі ацинарних клітин підшлункової залози [43-45].

Нагромадження йонів Ca^{2+} є також причиною зниження мембранного потенціалу мітохондрій та рівня АТФ, що підтверджується експериментальними даними, які продемонстрували наступне: внесення АТФ у ізольовані ацинарні клітини підшлункової залози нівелювало інтоксикацію йонами Ca^{2+} , що були викликані етиловими естерами жирних кислот [44, 147; 24].

Також патогенний вплив етилових ефірів жирних кислот підтверджують і наступні дослідження. Було продемонстровано, що додавання пальмітолеїнової кислоти до ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози спричинило велике та дозозалежне збільшення $[Ca^{2+}]_v$, як наслідок це

викликало дисфункцію мітохондрій та некроз ацинарних клітин, а використання хелатора (ВАРТА-АМ) зменшило концентрацію йонів Ca^{2+} та некроз клітин [44]. Також показано, що етилові ефіри жирних кислот викликають стійке зниження рівня НАДН у ацинарних клітинах підшлункової залози [47].

Існує й ще один механізм токсичного впливу етилових естерів жирних кислот на мітохондрії у ацинарних клітинах підшлункової залози. Відомо, що етилові ефіри жирних кислот гідролізуються до жирних кислот безпосередньо у мітохондріях та здійснюють прямий вплив на зниження функціональної активності органели [44; 94; 123]. Припускають, що цей ефект може здійснюватися через формування мітохондріальної пори тимчасового проникнення та прямого роз'єднання окисного фосфорилування у мітохондріях [123; 101; 99 25]. Недавні дані свідчать, що саме відкриття мітохондріальної пори тимчасового проникнення [180; 147] є тим тригером, що запускає розвиток мітохондріальної дисфункції за умов розвитку гострого панкреатиту. Порушення створює можливість вільно рухатись речовинам масою до 1,5 кДа всередину і назовні органели. Як наслідок це призводить до колапсу мембранного потенціалу та розсіювання необхідного градієнту протонів для виробництва АТФ [80; 23]. Існують дані з використанням інгібітора циклофіліну D – циклоспорину А, за впливу якого не спостерігали патологічних змін у ацинарних клітинах підшлункової залози, що були викликані неокислювальними метаболітами етанолу, які утворилися при введенні жирних кислот та алкоголю *in vivo* [95]. Такий ефект підтверджується і на нокаутних мишах *ppif* - / - (циклофілін D) [147].

Дослідження *in vivo* підтверджують пошкоджуючий вплив етилових ефірів жирних кислот на підшлункову залозу, що пов'язаний з розвитком гострого панкреатиту [200]. Наприклад, введення етанолу викликає інгібування його окисного метаболізму та сприяє утворенню етилових ефірів жирних кислот у плазмі крові та активує розвиток гострого панкреатиту [201].

Порушення у роботі мітохондрій підтверджується також і клінічними даними. Тканини взяті від пацієнтів з панкреатитом мали маркери мітохондріального ушкодження та порушення аутофагії [22].

Очевидно, що етилові ефіри жирних кислот, а не сам етанол, може бути причиною пошкодження підшлункової залози.

1.4. Використання нутрієнтів для корекції патологічних процесів у підшлунковій залозі

Некроз підшлункової залози є синдромом системної запальної реакції та поліорганної недостатності. У пацієнтів, яким діагностовано важку форму гострого панкреатиту рівень смертності становить від 10 – 15% [81; 34].

На сьогодні ведеться багато клінічних досліджень ліків, що мають полегшити життя хворих на гострий панкреатит, особливу увагу також приділяють і нутрієнтам. Розвиток цього захворювання пов'язують з дисфункцією мітохондрій та зниженням рівня АТФ. Тому є необхідним аналіз субстратів окиснення, що відіграють ключову роль у енергозабезпеченні клітини.

Нещодавні дослідження повідомляють, що внесення пірувату для коригування енергозабезпечення ацинарних клітин, показав високий рівень захисту від панкреонекрозу [161]. Відомо, що піруват – аніонна форма 2-оксопропіонової кислоти, що є кінцевим продуктом гліколізу і включається в цикл трикарбонових кислот. Піруват також є поглиначем активних форм кисню (ROS), таких як гідроксильний радикал [59].

Ефективним антиоксидантним та протизапальним агентом є похідна форма пірувату – етил піруват [135; 68]. У дослідженнях Туркільмаза та співавторів було показано, що у групі тварин, яким вводили етил піруват на тлі розвитку гострого панкреатиту, спостерігали зниження смертності. У відповідь на внутрішньоочеревне введення етил пірувату також відбувалося зниження рівня ІЛ-6 та некрозу підшлункової залози, а концентрація амілази та аланінтрансамінази знизилися до вихідних значень [194]. Інші дослідження

також підтверджують позитивний вплив етил пірувату на зменшення симптомів гострого панкреатиту. Введення етил пірувату забезпечило суттєві покращення за розвитку панкреатиту, а саме зниження концентрації сечовини, активності АЛТ та рівня Ca^{2+} у сироватці крові. Відомо, що етил піруват інгібував активацію NF- β , що відіграє важливу роль у прогресуванні локалізованого захворювання до поліорганної недостатності. Цей факт може пояснити його захисний механізм на інші органи [37, 207].

Робота Пенга та співавторів показала, що піруват і галактоза (1 ммоль/л або 10 ммоль/л), мали подібні захисні ефекти проти аспарагін-індукованого некрозу ацинарних клітин підшлункової залози. Цікаво, що глюкоза не впливала на розвиток некрозу. Отримані дані свідчать про те, що метаболізм глюкози знижується за впливу аспарагінази, але енергія може поповнюватися галактозою або піруватом, що приєднуються до циклу гліколізу [162]. Хоча спричинене аспарагіназою стійке підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$ і залежить від збільшення надходження Ca^{2+} , це може бути компенсовано збільшенням швидкості екструзії активного Ca^{2+} , якщо були б доступні достатні запаси АТФ. Додавання пірувату чи галактози нівелювало зменшення рівня АТФ. Введення галактози захищає від розвитку алкоголь-індукованого гострого панкреатиту *in vivo* та суттєво зменшує активність амілази, ІЛ-6 та внутрішньоклітинного трипсину [162]. Такий позитивний ефект галактози можна пояснити тим, що вона може потрапляти в цикл гліколізу, пропускаючи перший крок і не залежить від активності гексокінази, що забезпечує додаткове джерело енергії [162].

Ще одними нутрієнтами, що можуть покращити прогнози у пацієнтів з гострим панкреатитом є глутамін та ω -3 жирні кислоти. Глутамін, найпоширеніша вільна амінокислота, що регулює декілька біологічних функцій [149]. У пацієнтів з важкою формою захворювання відбувається швидке зниження глутаміну в плазмі та м'язах. Таке зниження рівня глутаміну в плазмі крові асоціюється із збільшенням смертності у відділенні інтенсивної терапії [156]. Відомо, що гострий панкреатит характеризується

гіперкатаболічним станом через системне запалення на ранній фазі захворювання та пов'язано з інфекційним сепсисом.

Повідомлялося, що під час розвитку панкреатиту катаболізм і протеоліз у скелетних м'язах посилюються на 80%. Крім того, було показано, що втрати азоту збільшуються до 20 % (до 40 г / день) [55; 91], при цьому спостерігається зменшення співвідношення розгалужених ланцюгів у ароматичних амінокислот [91; 181]. Рівень амінокислот зменшується до 40% від нормального, а рівень глутаміну падає до 55 – 15%. [92]. Виснаження глутаміну в основному спричинене великим споживанням цієї амінокислоти клітинами, що здатні до швидкого поділу. За відсутності адекватного споживання глутаміну, компенсаторне вивільнення його з м'язів не здатне або недостатнє для відновлення рівня глутаміну в плазмі крові. Виснаження глутаміну є клінічно важливим при перебігу важких захворювань, оскільки він індукує експресію білка теплового шоку [182], інгібує шлях NF- κ B [61; 209], індукує буфери оксидативного стресу через регенерацію глутатіону [151], захищає кишечник і є субстратом для утворення імунних клітин [151].

Показано, що глутамін знижує смертність, скорочує термін перебування у лікарні та збільшує рівень сироваткового альбуміну у пацієнтів, що хворіють важкою формою гострого панкреатиту [133]. Проте інше дослідження Мадхуліка та співавторів не зафіксувало значного покращення у хворих на гострий панкреатит, що отримували глутамін. Проте спостерігали статистично вірогідне зниження концентрації IL-6 у групі пацієнтів, що приймали глутамін [10].

Хоча кілька випробувань мали ефект на інфекційну захворюваність та тривалість перебування в реанімації важкохворих [132; 149; 208], проте інші дослідження, що не змогли продемонструвати будь-якого покращення [103; 136; 187]. Тому, вплив глутаміну на перебіг гострого панкреатиту залишається до кінця невідомим.

Очевидно, що вплив нутрієнтів на підшлункову залозу залишається не повністю вивчений та потребує подальшого дослідження їх місця у терапії та попередженні розвитку гострого панкреатиту.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Умови роботи з тваринами при проведенні досліджень

Досліди виконували використовуючи білих нелінійних шурів-самців або шурів лінії Wistar масою 200–300 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Всі 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).

Для дослідження впливу субстратів на адаптаційну здатність мітохондрій ізольовані ацинуси інкубували за температури 37° С впродовж 15 хв з різними субстратами окиснення або їх поєднанням. Потім клітини поміщали у полярографічну комірку і реєстрували базальну швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози. Далі з інтервалом 2 хв декілька разів вносили FCCP (до кінцевої концентрації 0,5, 1, 1,5 і 2 мкмоль/л) або лише одну концентрацію протонифору (0,5 або 1,5 мкмоль/л). У разі титрування за допомогою різних концентрацій протонифору оцінювали максимальну швидкість дихання та оптимальну концентрацію протонифору, а за одноразового внесення – прискорення швидкості дихання, максимальний пік та сповільнення дихання. Додатково вивчали мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози.

Для дослідження дії агоністів (холецистокініну та ацетилхоліну) на адаптаційну здатність мітохондрій: ізольовані ацинарні клітини підшлункової залози інкубували впродовж 15 хв за температури 37 °С у базовому середовищі з додаванням лише субстратів окиснення (контроль) чи також холецистокініну (0,5 нмоль/л) чи ацетилхоліну (4,5 мкмоль/л). Після інкубації клітини поміщали у полярографічну комірку. Швидкість дихання стимулювали за допомогою протонифору FCCP у концентраціях 0,5, 1, 1,5, 2 мкмоль/л.

Оцінювали максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію протонофора.

Для дослідження впливу інсуліну ізольовані ацинуси інкубували впродовж 30 хв за температури 37 °С у базовому середовищі з додаванням лише глюкози або пірувату (контроль) чи інсуліном (100 нмоль/л) або з додаванням до розчину лише пірувату і / або холецистокініну (0,1 нмоль/л). Реєстрували базальну та максимальну швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози.

Для дослідження впливу етанолу та холецистокініну *in vitro*, суспензію інтактних панкреатичних ацинусів інкубували впродовж 30 та 60 хв при температурі 37 °С у середовищах з вмістом різних субстратів окиснення, що додатково містили або етанол у концентрації 20 ммоль/л, або холецистокінін у концентраціях 0,1 чи 10 нмоль/л, або їхнє поєднання. Швидкість дихання стимулювали за допомогою протонофора FCCP у концентраціях 0,5, 1, 1,5, 2 мкмоль/л. Додатково визначали такі показники, як мембранний потенціал мітохондрій та нагромадження родаміну 123, автофлуоресценцію НАДН, секреторну відповідь та життєздатність клітин підшлункової залози щурів.

Для проведення гострого експерименту *in vivo* щурі були поділені на такі групи: 1 – контроль (тваринам одноразово перорально через зонд вводили воду та робили ін'єкцію 0,5 мл фізіологічного розчину внутрішньоочеревинно), 2 – етанол (тваринам вводили 40% розчин етилового спирту (4 г на кг маси тварини) та робили ін'єкцію 0,5 мл фізіологічного розчину), 3 – холецистокінін (тваринам вводили воду та робили ін'єкцію 2 мл холецистокініну у концентрації 10 нмоль/л (20 пмоль/л холецистокініну на кг маси тварини)), 4 – етанол + холецистокінін (тваринам вводили 40% розчин етилового спирту (4 г на кг маси тварини) та робили ін'єкцію 2 мл холецистокініну у концентрації 10 нмоль/л (20 пмоль/л холецистокініну на кг маси тварини)). Внутрішньоочеревинні ін'єкції холецистокініну чи фізіологічного розчину робили через 1 годину після перорального введення через зонд розчину етанолу чи води. Декапітацію тварин здійснювали через

годину після ін'єкції води чи холецистокініну. Після ізолювання панкреатичних ацинусів, суспензію клітин інкубували протягом 15 хв за температури 37 °С з такими субстратами окиснення: піруват, глутамін, монометилсукцинат, диметил- α -кетоглутарат (по 2 ммоль/л) або глюкоза (10 ммоль/л). Максимальну швидкість роз'єданого дихання мітохондрій панкреатичних ацинусів визначали, стимулюючи дихання FCCP у зростаючих концентраціях (0,5–2 мкмоль/л). Додатково вимірювали рівень етанолу та амілази в плазмі крові тварин та досліджували життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози.

Для проведення хронічного експерименту *in vivo*, всі тварини (незалежно контрольні чи дослідні тварини) перебували на спеціальній дієті з високим вмістом жиру, а саме 35% калорій були отримані з жиру тваринного походження. Тварин було поділено на такі групи: 1 – контроль (тваринам перорально через зонд вводили ~ 4 мл води (об'єм відповідав тому, що й у тварин, яким вводили розчин етанол) та робили ін'єкції 1 мл фізіологічного розчину внутрішньоочеревинно, 2 – піруват (тваринам вводили воду та робили ін'єкції пірувату натрію (0,5 г на кг тварини)), 3 – етанол (тваринам вводили 40 % розчин спирту (6 грам на кг маси тварини) та робили ін'єкції фізіологічного розчину), 4 – етанол + піруват (тваринам вводили 40 % розчин спирту (6 грам на кг маси тварини) та робили ін'єкції пірувату натрію (0,5 г на кг тварини)). Тваринам в залежності від групи кожного вечора о 18-19 годині впродовж 14 днів перорально через зонд вводили воду або 40 % розчин спирту, а на 7 день експерименту та до його кінця тваринами двічі на день робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію пірувату натрію або фізіологічного розчину. Після ізолювання панкреатичних ацинусів, клітини інкубували протягом 15 хв за температури 37 °С з такими субстратами окиснення: глюкоза або глюкоза, піруват та глутамін. Реєстрували базальну та максимальну швидкість роз'єданого дихання, а також мембранний потенціал ацинарних клітин підшлункової залози. Додатково вимірювали рівень амілази в плазмі крові тварин та досліджували життєздатність клітин, а також стан мітохондрій та

ЕПР ацинарних клітин підшлункової залози досліджували за допомогою електронної мікроскопії.

2.2. Методика ізолювання ацинарних клітин підшлункової залози

Ацинарні клітини підшлункової залози ізолювали використовуючи колагеназу за модифікованим методом Вільямса і співавт. [204]. Після декапітації та знекровлення тварини було здійснено розтин черевної стінки. На спільну жовчну протоку в місці її впадання в дванадцятипалу кишку накладали лігатуру, а іншу лігатуру підводили під голку, вставлену в початок протоки [140]. В протоку за допомогою шприца вводили базовий позаклітинний розчин об'ємом 5 мл, що додатково містив колагеназу(тип 4, 220 од./мл). Відпрепаровану підшлункову залозу переносили в чашку Петрі з базовим позаклітинним середовищем і відділяли від жирової тканини, після чого поміщали в конічну колбу об'ємом 25 мл та інкубували впродовж 15 хв за температури 37 °С з струшуванням з частотою 120 циклів в хвилину [140]. Після закінчення часу інкубації розчин було заміняно на новий розчин з колагеназою об'ємом 5 мл та продовжували інкубувати ізольовану підшлункову залозу ще 15 хв. Таку процедуру було проведено ще один раз. Після інкубації тканину підшлункової залози відмивали в чашках Петрі 5 мл базового позаклітинного середовища, відділяти тканину залози від проток і судин, а потім механічно диспергували протягуванням дозатором через серію наконечників з діаметром отворів 2, 1,5 і 1 мм [140]. Для вилучення більших за ацинуси часток, отриману суспензію клітин фільтрували через тканину з діаметром отворів 150 мкм, а потім нашаровували на 5 мл базового розчину з підвищеною до 4 % концентрацією БСА і центрифугували впродовж 5 хв на центрифусі ЦЛК-1 при 50 g [140]. Центрифугування через розчин білка повторювали 2 рази, а потім ацинуси додатково осаджували в 5 мл базового позаклітинного середовища [140]. Життєздатність клітин, оцінена за допомогою тесту з трипановим синім (0,1 %), що становила понад 93 %.

Клітини рахували за допомогою камери Горяєва. Ізольовані ацинуси отримували і зберігали у середовищі виділення, що містило (ммоль/л): NaCl - 140,0, KCl - 4,7, CaCl₂ - 1,3, MgCl₂ - 1,0, HEPES - 10,0, глутамін - 2,0, піруват - 2,0, глюкоза - 10,0; БСА - 2,5 мг/мл; соєвий інгібітор трипсину - 0,1 мг/мл та суміш амінокислот для середовища MEM (minimal essential medium); pH 7,4.

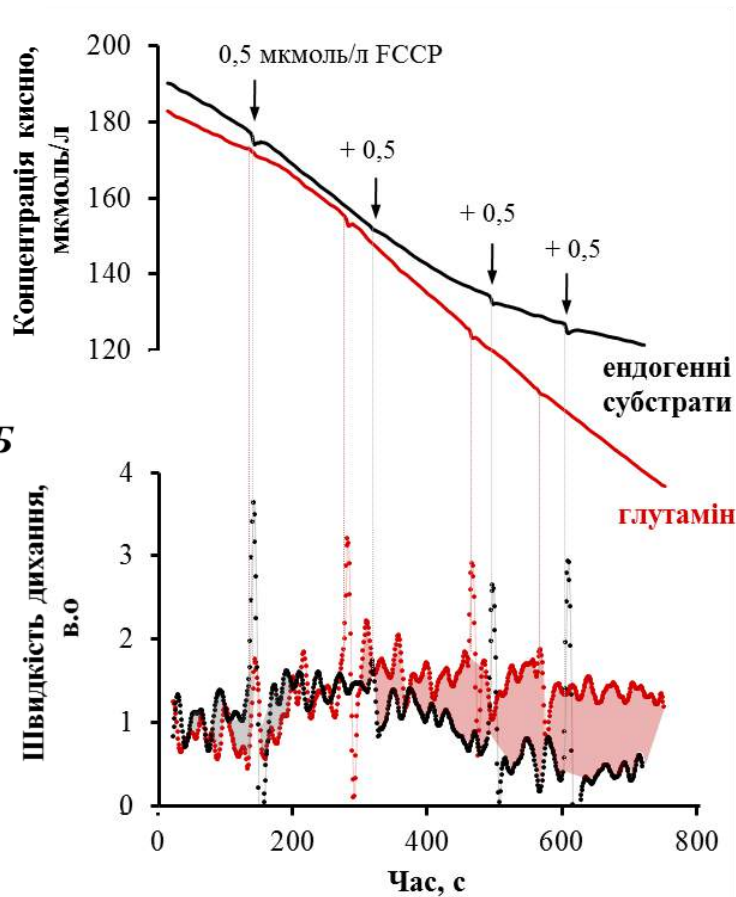
2.3. Полярграфічна реєстрація швидкості споживання кисню ізольованими ацинусами

Швидкість поглинання кисню ацинарними клітинами підшлункової залози визначали за допомогою полярграфічного методу з використанням установки, яка була зібрана на базі електрода Кларка, полярографа (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 хв за температури 37 °C у середовищах зі складом розчину відповідно до умов експерименту, а потім вносили у полярграфічну комірку. Швидкість дихання розраховували панкреатичних ацинусів, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль O₂.

Швидкість дихання стимулювали за допомогою протонофора FCCP у концентраціях 0,5, 1, 1,5, 2 мкмоль/л (рис.2.1). Олігоміцин у концентрації 5 мкмоль/л додавали для інгібування АТФ-синтази за використання наступних субстратів окиснення: лише глюкоза та її поєднання з піруватом чи глутаміном або їх суміші.

A



B

Рис. 2.1. Типовий запис реєстрації швидкості дихання ізолюваних ацинарних клітин підшлункової залози: *A* – зменшення вмісту кисню у полярографічній комірці після внесення суспензії ізолюваних панкреатичних ацинусів та додавання FCCP у наростаючих концентраціях 0,5, 1, 1,5, 2 мкмоль/л; *B* – розрахована миттєва швидкість дихання.

2.4. Флуоресцентна мікроскопія

Більшість флуоресцентних досліджень проводили за допомогою мікроскопа Olympus IX73 та камери DP-74. Зображення обробляли за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Для оцінки некрозу ізолювані ацинуса підшлункової залози фарбували за допомогою броміду етидію (за довжини хвилі збудження 340–390 нм. та випромінювання > 600 нм). Для фарбування ядер живих і мертвих клітин використовували Hoechst 33342 (за

довжини хвилі збудження 340–390 нм. та випромінювання > 420 нм). Мітохондріальний мембранний потенціал в клітинах оцінювали за допомогою флуоресценції родаміну 123 (за довжини хвилі збудження 470–490 нм. та випромінювання > 515 нм). Після інкубації з етанолом та / або холецистокініном 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 °C

Автофлюоресценцію НАДН (за довжини хвилі збудження 340–390 нм та випромінювання > 420 нм) вивчали за допомогою мікроскопа Olympus IX73 та камери DP-74. 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 з принаймні 5 різних фотографій.

У деяких дослідженнях (рис. 2.2) для вимірювання флуоресценції родаміну 123 використовували мікроскоп ЛЮМАМ–И–1 за довжини хвилі збудження 505 ± 25 нм (зелений фільтр) та довжини хвилі випромінювання 600–700 нм. Випромінювання фіксували камерою DSLR Nikon D3000 (CCD Sensor, 10^6 пікселів). Фотографії зберігали у NEF форматі та середню інтенсивність флуоресценції клітини розраховували за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Використовували макрос (набір команд для автоматизації процесу процесингу зображення), щоб відрізнити клітини від фону за інтенсивністю флуоресценції. Зображення із флуоресцентної мікроскопії розділялось на канали по кольорах. Використовували червоний канал, оскільки був відповідний фільтр у приладі. Так, як клітини не колоподібні (як еритроцити), то використовувати перетворення Хафа для кругів недоцільно. З отриманого шару із зображення, який мав вигляд матриці градацій сірого, вирізалась центральна ділянка для дотримання рандомізації вибірки клітин. Використовували порогове обмеження (Thresholding), параметри якого були задані вручну і зберігались однаковими для всієї

вибірки. Отримана мапа зображень представлена у вигляді високонтрасного зображення із ігнорованих темних і потрібних білих ділянок, визначаємо флюоресценцію тільки потрібних ділянок. Ізольовані панкреатичні ацинуси (0,5 мл) інкубували протягом 15 хв за температури 37 °С в середовищі з різним субстратним складом, що відповідав умовам досліду та родаміном 123 у концентрації 10 мг/мл. Відмивали від родаміну 123 за допомогою базового зовнішньоклітинного середовища, а потім відбирали серію аліквот для преінкубації з 0,5 – 5 мкмоль/л FCCP протягом 60 сек. за температури 37 °С. Флуоресценцію реєстрували протягом 90 сек. фотографуючи 10 різних ацинусів. Всі решта клітини зберігалися за кімнатної температури у базовому зовнішньоклітинному середовищі.

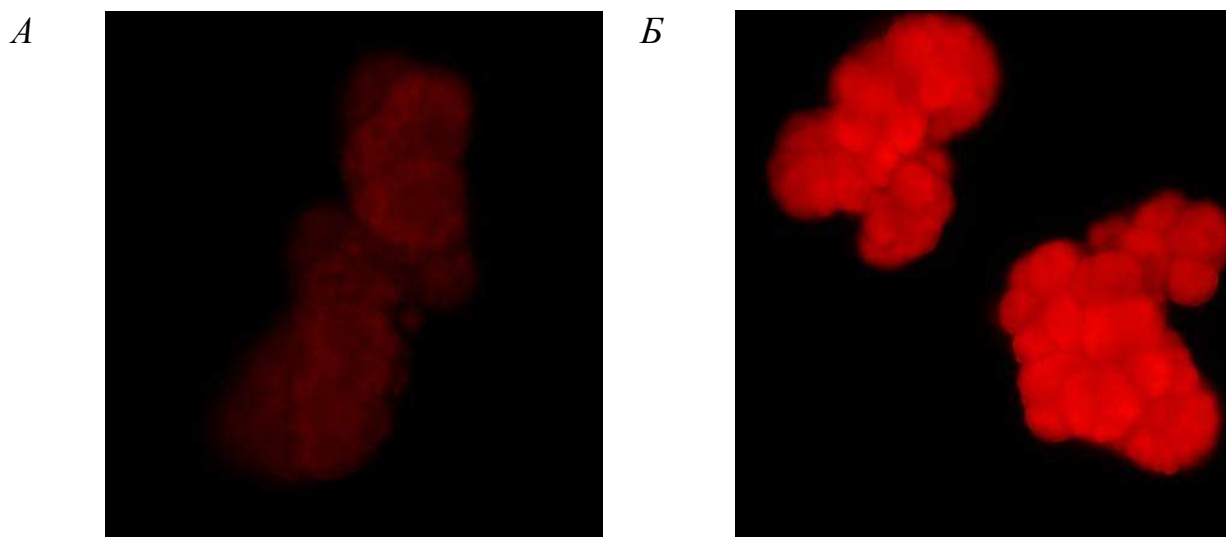


Рис 2.2. Фотографії ізольованих ацинарних клітин з накопиченням родаміном 123: А) без додавання FCCP; Б) з додаванням 0,5 мкмоль/л FCCP.

Поглинання родаміну 123 вимірювали за допомогою спектрофотометра Denovix DS-11+ при довжини хвилі 505 нм. Для цього ізольовані ацинуси підшлункової залози (5×10^5 клітин на зразок) інкубували з родаміном 123 у концентрації 20 мкмоль/л протягом 15 хв за 37 °С, а потім тричі відмивали з PBS (4 °С, 40 г). До відібраних клітин (без надосадової рідини) додавали 50 мкл NP-40 буферу, що додатково містив 0,1 мг/мл соєвий інгібітор трипсину.

Лізис клітин здійснювали на льодовій бані протягом 10 хв. Лізат центрифугували при 16000 g за 4 °С протягом 10 хв. Концентрацію родаміну 123 у клітинах розраховували за стандартною кривою. Кожне вимірювання нормалізували до вмісту білка в лізаті, що вимірювали при довжині хвилі 280 нм. Концентрацію родаміну 123 в клітинах оцінювали у об'ємі 3000 мкм³, що відповідає середньому об'єму клітин.

2.5. Метод дослідження секреції амілази

Активність амілази у плазмі крові вимірювали після декапітації тварини. Базальне та холецистокінін-стимульоване вивільнення амілази з панкреатичних ацинусів досліджували *in vitro*. Ізольовані ацинуси підшлункової залози преінкубували протягом 30 або 60 хв за температури 37 °С. Потім осаджували клітини центрифугуванням 10 с при 1600 g, відбирали 10 мкл супернатанту. Контрольні та дослідні проби досліджували з використанням суміші 2% розчину крохмалю, фосфатного буферу та розчину натрій хлориду до якої додавали 200, 100 та 50 мкл плазми крові або 20 мкл супернатанту та інкубували протягом 8 хв за температури 37 °С, потім відбирали 20 мкл інкубату та переміщали до розчину дистильованої води та калій йодиту (стандартним методом йод-крохмальної колориметрії) та досліджували спектрофотометрично в кюветі 1 см при червоному світлофільтрі (578 нм). Всі проби вимірювались навпроти води.

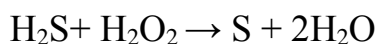
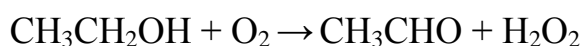
Загальну кількість амілази визначали шляхом лізису ацинарних клітин з використанням 1% Triton-X100 розчиненого у базовому зовнішньоклітинному середовищі.

У хронічній серії дослідів активність амілази у плазмі крові та за стимуляції ацетилхоліном у концентрації 10, 1, 0,1 мкмоль/л досліджували турбідиметричним кінетичним методом [196], що ґрунтується на зменшенні мутності розчину, що виникає при гідролізі суспензії крохмалю за дії ферменту α -амілази. Початкова стадія зменшення мутності розчину прямо

пропорційна широкому діапазону концентрацій ферменту. Такі характеристики дозволяють отримати калібрувальну криву, використовуючи серію розведень очищеної α -амілази відомої концентрації, яка потім може бути використана для оцінки α -амілазної активності досліджуваного зразка. Мутність розчину досліджували за допомогою спектрофотометра DENOVIX DS-11 FX+ в кюветі 1 см при довжині хвилі 300 нм.

2.6. Ензиматичний метод визначення вмісту етанолу в плазмі крові

Концентрацію етанолу в плазмі крові визначали після декапітації тварини за допомогою одоксидазно-переоксидазного методу [160]. Етанол вступає в реакцію з киснем при дії алкогольоксидази та окислюється за допомогою кисню до ацетальдегіду та перекису водню, який в спряженій реакції окислював хромоген до кольорового продукту, що визначається фотометрично:



Проби витримували при кімнатній температурі 5 хв і центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв для осадження білків. Для аналізу використовували надосадову рідину та калібрували проби на спектрофотометрі при довжині хвилі 450 нм.

2.7. 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 NaNO_2 та трихлороцтовою кислотою. Як стандарт використовували пропіл нітрит.

У флакон об'ємом 5 мл вносили 0,5 мл плазми крові, 0,5 мл розчину внутрішнього стандарту і 0,5 мл 50%-го розчину трихлороцтової кислоти. У закритий флакон додавали 0,5 мл 30 %-го розчину нітриту натрію та перемішували протягом 60 с. Потім за допомогою спеціалізованого шприца набирали 1 мл газової фази, що утворилась над рідиною і вводили в дозатор хроматографа.

Кількісний вміст етилового спирту в плазмі крові розраховували за попередньо побудованим калібрувальним графіком або за попередньо розрахованими коефіцієнтами регресії.

2.8. Трансмійна електронна мікроскопія

Мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум ацинарних клітин підшлункової залози досліджували методом електронної мікроскопії. Для цього суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів обробляли використовуючи 1,5 % розчином OsO_4 в 0,2 М розчині какодилату натрію (рН 7,2) впродовж 2 – 2,5 годин. Отримані зразки поетапно поміщали на 30 хв за кімнатної температури у розчин етанолу (50° , 70° , 90° і абсолютному). Потім обробляли епоксидною смолою, а далі витримували у полімеразній капсулі. Контрастування зразків здійснювали у 1,5%-му розчині уранілацетату, що був виготовлений за Рейнольдсом [168]. Препарати переглядали з використанням трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100.

2.9. Статистично-математичне опрацювання результатів дослідження

Необхідні статистичні розрахунки проводили за використанням пакету програм Microsoft Office Excel та Origin. Цифрові результати подані як $M \pm m$. Кожен експеримент повторювали як мінімум на п'яти окремих препаратах ізольованих клітин, отриманих із різних тварин ($n \geq 5$). У випадку

флуоресцентної мікроскопії знаходили середнє арифметичне із даних флуоресценції як мінімум 10 різних ацинусів у кожній дослідній пробі для кожної тварини. Вірогідність різниці середніх арифметичних (p) визначали з t -

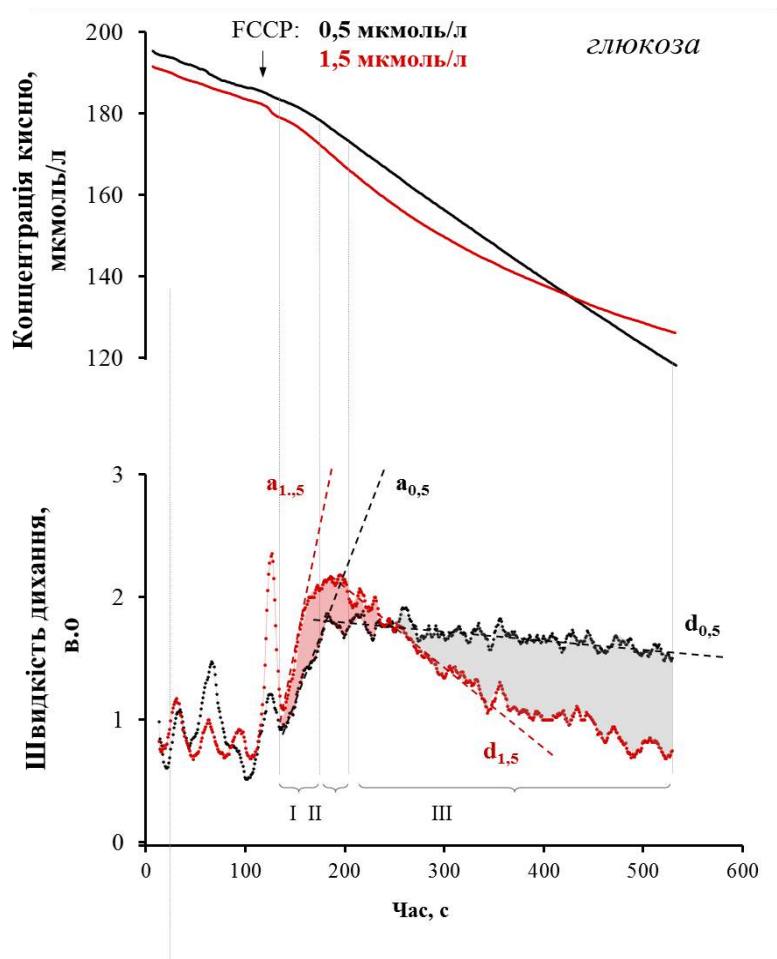


Рис. 2.3. Зменшення вмісту кисню у полярографічній комірці після внесення суспензії панкреатичних ацинусів (зверху) і розрахована миттєва швидкість дихання (знизу), коли у середовищі була глюкоза (10 ммоль/л), стрілками вказано додавання FCCP (0,5 або 1,5 мкмоль/л), I – фаза прискорення ($a_{0,5}$ або $a_{1,5}$ для відповідних концентрацій FCCP), II – фаза піку швидкості дихання, III – фаза сповільнення ($d_{0,5}$ або $d_{1,5}$ для відповідних концентрацій FCCP)

тестом або двофакторним дисперсійним аналізом та post-hoc t -тестами з корекцією за методом Голма-Бонферроні (Holm–Bonferroni). За записом споживання кисню розраховували максимальну швидкість роз’єданого дихання та оптимальну концентрацію протонофора (FCCP). Оптимальну концентрацію FCCP розраховували як середньоарифметичне значення

концентрацій, за яких і спостерігають максимальний ефект. Використовуючи рівняння поліному другого порядку розраховували сповільнення споживання кисню ацинарними клітинами підшлункової залози. під час другої фази FCCP-стимульованого дихання (рис. 2.3).

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

N – вміст O_2 у розчині в момент часу t (нмоль), N_0 – початковий вміст O_2 у розчині (нмоль), t – час (хв), v_0 – швидкість споживання кисню (нмоль O_2 / млн клітин / хв), a – прискорення споживання кисню (нмоль O_2 / млн клітин / хв²).

Рівняння (1) використовували для розрахунку прискорення споживання кисню як другу похідну по часу:

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

Оскільки швидкість дихання знижується з часом – спостерігається рівносповільнена зміна вмісту O_2 у розчині, значення a є від’ємним і характеризує сповільнення FCCP-стимульованого дихання клітин. Чим ближче значення a до нуля, тим стійкішими є мітохондрії до навантажень протонофором.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення різних субстратів.

На сьогодні не має стандартизованого підходу до використання протонофорів для дослідження дихання, у тому числі і для ацинарних клітин підшлункової залози. Результати отримані на інших клітинах показують, що протонофор-стимульована швидкість дихання залежить від субстрату окиснення (глюкоза, піруват, амінокислоти) [38, 62, 60, 178; 118; 140]. Проте, залежність роз'єданого дихання від субстратів окиснення не вивчалася у інтактних ацинарних клітинах підшлункової залози.

Тому у першому експерименті оцінювали вплив екзогенних субстратів, пірувату і глутаміну, на швидкість FCCP-стимульованого дихання ацинарних клітин підшлункової залози. Для цього ізольовані ацинуси інкубували впродовж 15 хв за температури 37° С зі субстратами окиснення (глюкозою, піруватом, глутаміном або глутаматом). Потім клітини поміщали у полярографічну комірку і реєстрували базальну швидкість дихання. Далі з інтервалом 2 хв декілька разів вносили FCCP (до кінцевої концентрації 0,5, 1, 1,5 і 2 мкмоль/л).

З'ясувалося, що базальна швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози не залежала від субстрату окиснення (рис. 3.1 А, Б). Коли до полярографічної комірки додавали 0,5 мкмоль/л FCCP, то швидкість дихання панкреатичних ацинусів у разі використання ендогенних субстратів збільшувалася і становила $1,76 \pm 0,33$ в.о., а найбільший показник швидкості дихання за цих умов був отриманий за окиснення глутамату та становив $2,17 \pm 0,33$ в.о (рис. 3.1 Б). За додавання FCCP у концентрації 1 мкмоль/л швидкість дихання ізольованих панкреатичних ацинусів статистично вірогідно збільшилась у разі використання пірувату до $2,16 \pm 0,30$ в.о. (рис. 3.1 А) чи глутаміну – $2,12 \pm 0,26$ в.о. (рис. 3.1 Б).

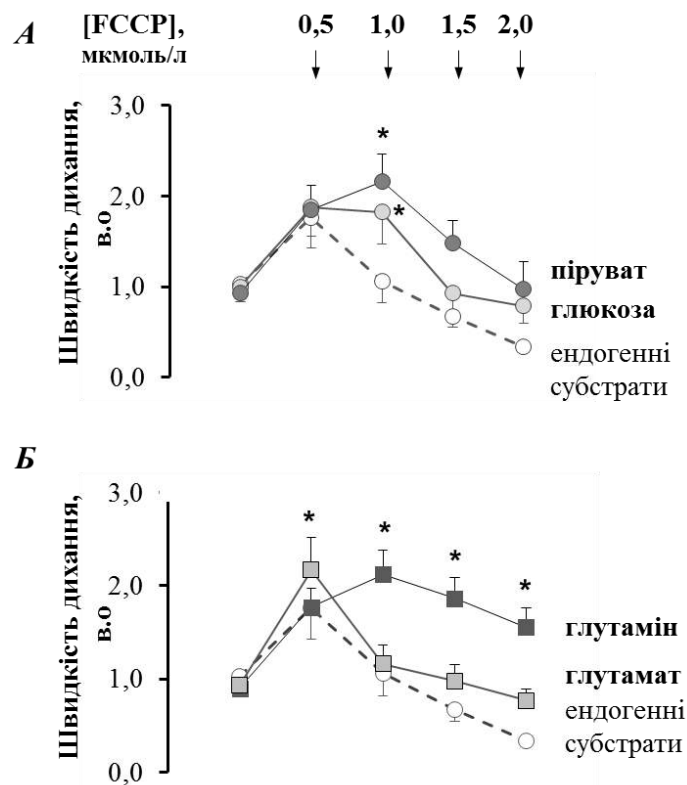


Рис. 3.1. Швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів за окиснення різних субстратів: [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін], [глутамат] = 2 ммоль/л; дані нормалізовані до базальної швидкості дихання без додавання FCCP за окиснення ендогенних субстратів; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно швидкості дихання за окиснення лише ендогенних субстратів, $n = 5$; $M \pm m$.

Така ж концентрація протонифору інгібувала швидкість дихання у контролі та за окиснення глутамату. Вищі концентрації FCCP (1,5 та 2 мкмоль/л) інгібували швидкість дихання панкреатичних ацинусів за окиснення всіх субстратів (рис. 3.1). У разі використання глутаміну швидкість дихання ацинарних клітини підшлункової залози статистично вірогідно зростала після додавання 1,0 – 2,0 мкмоль/л FCCP (рис. 3.1).

Отже, FCCP-стимульоване дихання ацинарних клітин підшлункової залози залежить від субстрату окиснення, а піруват та глутамін здатні підтримувати високі значення швидкості дихання за навантаження FCCP, на відміну від глюкози та глутамату. Такий ефект глутамату можливо пов'язаний з тим, що у ацинарних клітинах підшлункової залози щурів та мишей експресія

транспортерів глутамату нижче, ніж нейтральні транспортери амінокислот [Fukushima, 2010; Rooman, 2013]. Більше того, глутамат у значній кількості виділяється у панкреатичний сік [74], ймовірно, завдяки локалізації його транспортера EAAC1 на апікальній стороні клітини. Таким чином можна зробити висновок, що така відповідь швидкості дихання на внесення FCCP за окислення глутамату була обумовлена його обмеженим транспортом через базальну плазматичну мембрану.

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 0,5 мкмоль/л швидкість дихання панкреатичних ацинусів статистично вірогідно збільшилась та становила $1,83 \pm 0,30$ в.о., подібний ефект спостерігали і для комбінації глюкози з глутаміном та/або піруватом (рис. 3.2).

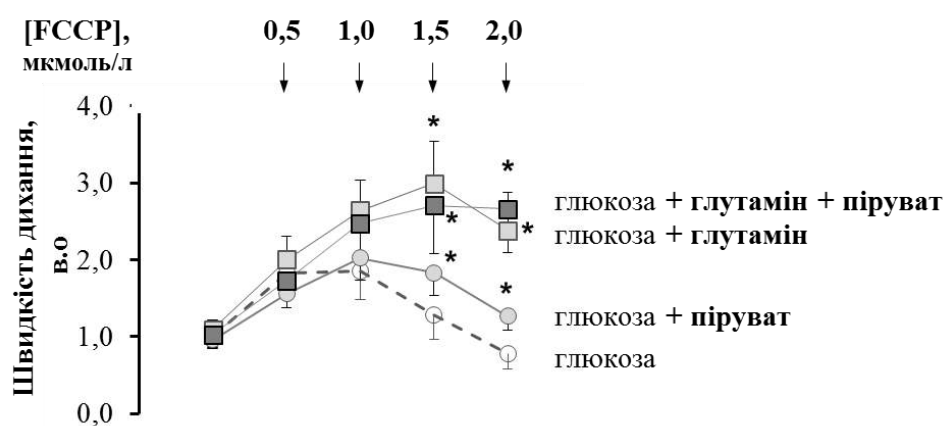


Рис. 3.2. Швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів за окиснення різних субстратів у поєднанні з глюкозою: [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін] = 2 ммоль/л; дані нормалізовані до базальної швидкості дихання без додавання FCCP за окиснення глюкози; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно швидкості дихання за окиснення глюкози, $n = 6$; $M \pm m$.

Після внесення FCCP у концентрації 1 мкмоль/л швидкість дихання панкреатичних ацинусів збільшилась. Найвищі показники дихання

zareєстровані за окиснення глюкози і глутаміну та поєднання глюкози з глутаміном та піруватом, що становили $2,64 \pm 0,4$ та $2,31 \pm 0,26$ в.о. відповідно ($P = 0,04$ і $0,03$ відповідно, але статистична різниця не була підтверджена тестом Голма-Бюфферонні). У разі використання глюкози та глутаміну швидкість дихання панкреатичних ацинусів досягала найвищих показників (за дії $1,5$ мкмоль/л FCCP швидкість дихання становила $3,00 \pm 0,55$ в.о.), незалежно від наявності пірувату. Таким чином, вплив глюкози та глутаміну на FCCP-стимульоване дихання є адитивним, адже вони потрапляють у цикл Кребса різними шляхами, на відміну від глюкози та пірувату. На наступному етапі експерименту ми досліджували також вплив субстратів циклу Кребса, а саме малату, ізоцитрату та α -кетоглутарату, на максимальну швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози.

Базальна швидкість дихання панкреатичних ацинусів була подібною та, як і у попередніх досліджах, не залежала від субстрату, що був у середовищі (рис. 3.3). Після внесення до комірки $0,5$ мкмоль/л FCCP у разі використання ацинарними клітинами підшлункової залози малату або ізоцитрату у поєднанні з глюкозою швидкість дихання статистично вірогідно збільшилась на 193 та 219 % у порівнянні з контролем. Подальше внесення вищих концентрацій FCCP спричинило інгібування швидкості дихання ацинарних клітин підшлункової залози (рис. 3.3). У разі використання сукцинату або α -кетоглутарату швидкість FCCP-стимульованого дихання не збільшилась, а навпаки була нижчою ніж у контролі за внесення у комірку 1 мкмоль/л FCCP (рис. 3.3).

Не відомо чи могли субстрати циклу Кребса достатньо транспортуватися через плазматичну мембрану ацинарних клітин підшлункової залози. Тому для полегшення проникнення цих субстратів у клітину в наступних дослідженнях ми використали метильовані форми – монометил-сукцинат та диметил- α -кетоглутарат. На відміну від природніх форм субстратів, їх метильовані похідні статистично вірогідно збільшили FCCP-стимульоване дихання ацинарних клітин підшлункової залози.

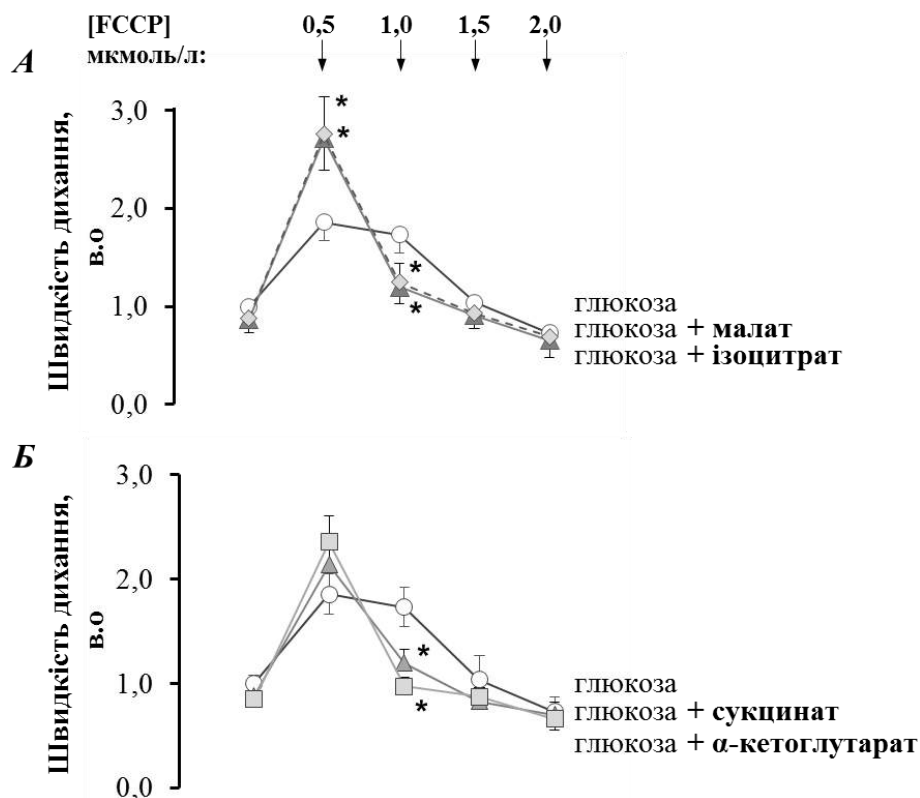


Рис. 3.3. Швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів за окиснення субстратів циклу Кребса у поєднанні з глюкозою: [глюкоза] = 10 ммоль/л, [ізоцитрат], [малат], [сукцинат], [α -кетоглутарат] = 2 ммоль/л; дані нормалізовані до базальної швидкості дихання без додавання FCCP за окиснення глюкози; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно швидкості дихання за окиснення лише глюкози; $n = 8$; $M \pm m$.

За окиснення глюкози та монометил-сукцинату швидкість роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів збільшилась як за внесення 0,5 мкмоль/л, так і за 1 мкмоль/л FCCP ($2,33 \pm 0,32$ в.о. та $2,58 \pm 0,44$ в.о. відповідно). Такий самий ефект спостерігали за окиснення ацинарними клітинами підшлункової залози глюкози та диметил- α -кетоглутарату (рис. 3.4).

Для оцінки адаптаційної здатності мітохондрій панкреатитів за максимальних навантажень було використано два параметри – оптимальну концентрацію FCCP (встановлюють як середньоарифметичне значення концентрацій за яких спостерігають максимальний ефект) та максимальну швидкість роз'єданого дихання у кожному експерименті незалежно від концентрації FCCP.

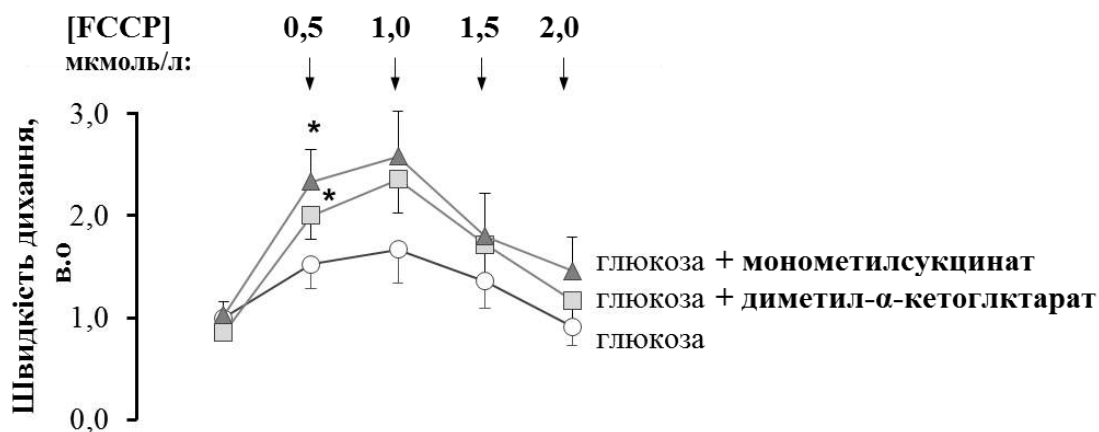


Рис. 3.4. Метильовані естери субстратів циклу Кребса підвищують швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів: [глюкоза] = 10 ммоль/л, [монометилсукцинат], [диметил- α -кетоглутарат] = 2 ммоль/л; дані нормалізовані до базальної швидкості дихання без додавання FCCP за окиснення глюкози; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно швидкості дихання за окиснення лише глюкози; $n = 6$; $M \pm m$.

Так, у разі використання лише ендogenous субстратів значення оптимальної концентрації протонофора та максимальної швидкості дихання панкреатичних ацинусів були найнижчими порівняно з отриманими результатами за окиснення решти субстратів (табл. 3.1). У інших випадках ці показники були більшими і залежали від того, який екзогенний субстрат окиснення додавали у середовище інкубації. Загалом можна виділити два варіанти (табл. 3.1): 1) низьке значення оптимальної концентрації FCCP і, водночас, висока максимальна швидкість роз'єданого дихання (за окиснення глутамату, ізоцитрату, малату, сукцинату, α -кетоглутарату); 2) високе значення обох показників (за окиснення глюкози, пірувату, глутаміну, монометилсукцинату, диметил- α -кетоглутарату або їх поєднання). Обидва параметри були найвищими, коли у середовищі одночасно були наявні такі субстрати, як глюкоза, глутамін і піруват (табл.3.1). Цікаво, що внаслідок додавання до глюкозовмісного середовища мембранопроникних похідних сукцинату та α -кетоглутарату оптимальна концентрація FCCP не зменшилася,

а максимальна швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози навіть дещо зростає.

Таблиця 3.1.

Оптимальна концентрація FCCP та максимальна швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози

Умови досліджу	Оптимальна [FCCP], мкмоль/л	Максимальна швидкість дихання, в.о.	n
Без субстратів (<i>контроль</i>)	0,50 ± 0,00	1,76 ± 0,33	5
Глюкоза	0,80 ± 0,11	1,91 ± 0,33	
Піруват	0,90 ± 0,10	2,12 ± 0,21 *	
Глутамат	0,50 ± 0,00	2,17 ± 0,33 *	
Глутамін	1,00 ± 0,00	2,12 ± 0,26 *	
Глюкоза (<i>контроль</i>)	0,80 ± 0,11	2,02 ± 0,35	6
+ Піруват	1,10 ± 0,08	2,03 ± 0,29	
+ Глутамін	1,40 ± 0,08	3,03 ± 0,54 *	
+ Піруват + Глутамін	1,75 ± 0,11	2,82 ± 0,51 *	
Глюкоза (<i>контроль</i>)	0,75 ± 0,13	1,91 ± 0,20	8
+ Ізоцитрат	0,50 ± 0,00	2,71 ± 0,33 *	
+ Малат	0,50 ± 0,00	2,75 ± 0,38 *	
+ α-кетоглутарат	0,50 ± 0,00	2,14 ± 0,22	
+ Сукцинат	0,50 ± 0,00	2,35 ± 0,25	
Глюкоза (<i>контроль</i>)	0,92 ± 0,08	1,73 ± 0,29	6
+ Диметил-α-кетоглутарат	1,00 ± 0,00	2,36 ± 0,33 *	
+ Монометил-сукцинат	0,83 ± 0,11	2,64 ± 0,42 *	

Дані нормалізовані до базальної швидкості дихання за окиснення глюкози; n – кількість досліджень; * - статистично вірогідна різниця $P < 0,05$ порівняно з контролем; $M \pm m$.

Так, наприклад, максимальна швидкість роз'єданого дихання збільшилася внаслідок додавання до глюкозовмісного середовища субстратів циклу Кребса, а оптимальна концентрація FCCP, навпаки, знизилася. Сам по собі цей ефект є парадоксальним, і нашоєхує на думку про наявність процесу сповільнення дихання з часом.

Таким чином, ми припустили, що є щонайменше два фактори, які визначають швидкість FCCP-роз'єданого дихання у ацинарних клітинах підшлункової залози, а саме: концентрація протонофору та час. Після ретельного аналізу стало очевидним, що зниження швидкості дихання не є

наслідком внесення оптимальної концентрації FCCP, а швидше за все розвивається з часом. Коли до полярографічної комірки додавали FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л у разі використання глюкози та малату швидкість дихання стабільно зменшувалась, але подальше внесення вищих концентрацій FCCP не викликало інгібування швидкості дихання (рис. 3.3). Тому у наступному досліді ми використали одноразове додавання FCCP у концентрацій 0,5 або 1,5 мкмоль/л. Після внесення FCCP можна виокремити три фази дихання (рис. 3.5):

- 1) зростання швидкості дихання (фаза прискорення),
- 2) пік швидкості дихання (фаза максимальної швидкості дихання),
- 3) зниження швидкості дихання (фаза сповільнення).

Зміну швидкості дихання у 1 та 3 фазі можна описати лінійною функцією. Тому, коефіцієнт прискорення (a) або сповільнення (d) описується наступним рівнянням $v(t) = at + v_0$ або $v(t) = dt + v_0$. Для зручності ми використали абсолютні значення a та d (див. розділ 2.9).

З'ясувалося, що часові параметри цих фаз залежать від концентрації протонофора та субстрату окиснення. Для більшості субстратів (окрім глутаміну) найвищі показники прискорення дихання реєстрували після внесення 1,5 мкмоль/л FCCP (табл. 3.2). За внесення 0,5 мкмоль/л FCCP показники прискорення дихання були значно вищими у разі використання малату у порівнянні з показниками за окиснення глюкози за тих самих умов, 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. Найнижчі показники прискорення дихання зареєстровані за окиснення глутаміну після додавання 0,5 мкмоль/л FCCP. Найнижчі показники прискорення дихання зареєстровані за окиснення глутаміну. Що очевидно, адже два додаткові ферменти, глутаміназа та глутаматдегідрогеназа, беруть участь у катаболізмі глутаміну. 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. 3.5 А, Б). Потім реєстрували

зниження швидкості роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів (фаза 3). За окиснення лише глутаміну або диметил- α -кетоглутарату не спостерігали збільшення сповільнення FCCP-стимульованого дихання (*d*) порівняно з базальними значеннями.

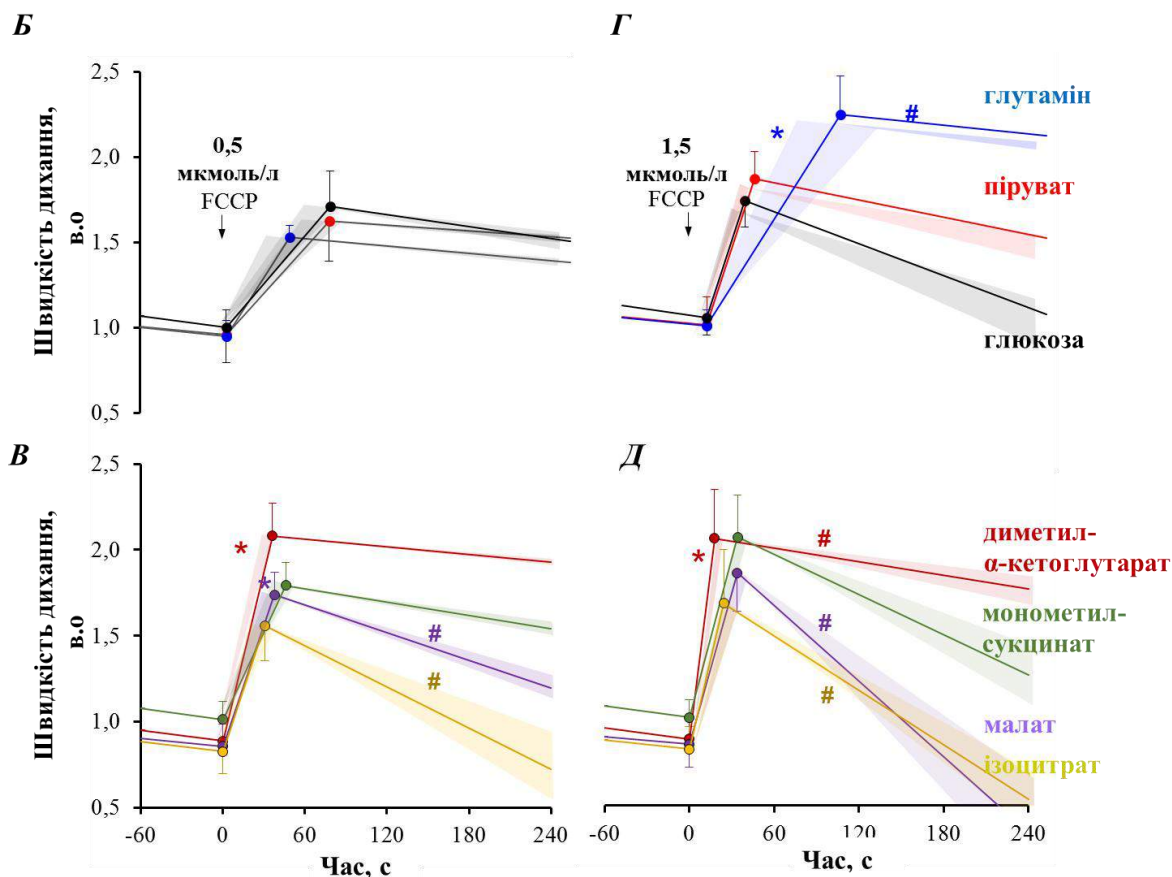


Рис. 3.5. Трифазна відповідь FCCP-стимульованого дихання за окиснення різних субстратів: *A, B* – вплив субстратів окиснення на швидкість FCCP-стимульованого споживання кисню; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін], [диметил- α -кетоглутарат], [монометил-сукцинат], [ізоцитрат], [малат] = 2 ммоль/л; 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 з сповільненням швидкості дихання за окиснення глюкози; $n = 5$; $M \pm m$.

За внесення 1,5 мкмоль/л FCCP спостерігали статистично вірогідне збільшення сповільнення дихання у разі використання глюкози, пірувату чи монometил-сукцинату (рис. 3.5 *A, B*). І цілком очевидно, що найбільші показники сповільнення були зареєстровані за внесення 0,5 мкмоль/л FCCP у

разі окиснення малату або ізоцитрату дихання (рис. 3.5 Б). Отримані дані корелюють із раніше встановленими значеннями оптимальних концентрацій FCCP для різних субстратів (табл. 3.1). Очевидно, FCCP у концентрації, що перевищує оптимальну, не знижує швидкість дихання миттєво, а лише сповільнює і залежить від часу.

Таблиця 3.2

Прискорення FCCP-стимульованого дихання

Субстрат окиснення	Концентрація FCCP	
	0,5 мкмоль/л	1,5 мкмоль/л
Глюкоза	0,59 ± 0,11	1,51 ± 0,16
Піруват	0,56 ± 0,11	1,51 ± 0,15
Глутамін	0,79 ± 0,22	0,78 ± 0,23*
Диметил- α -кетоглутарат	1,97 ± 0,19*	3,89 ± 0,46*
Монометил-сукцинат	1,02 ± 0,17	1,83 ± 0,19
Малат	1,40 ± 0,23*	1,76 ± 0,24
Ізоцитрат	1,43 ± 0,42*	2,08 ± 0,53

* – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно зі швидкістю дихання за окиснення глюкози; $n = 5$ або 4 (ізоцитрат); $M \pm m$.

Базальна швидкість дихання дещо зменшувалася з часом, але була приблизно однаковою у всіх експериментах. Це, мабуть, був артефакт, спричинений дифузією кисню в камеру або / і постійним зниженням життєздатності клітин.

Підсумок. Описані нові параметри адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози (максимальна швидкість роз'єданого дихання та оптимальна концентрація протонофора, прискорення та сповільнення дихання) залежать від субстратного забезпечення [Manko B.O., Vilonoha O.O., Manko V.V.] Поєднання глутаміну, пірувату та глюкози підтримує високу швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози.

1. Manko B.O., **Bilonoha O.O.**, Manko V.V. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization. Ukr. Biochem. J. 2019; 91 (3): 34–45.
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. Луцьк – Світязь, 2015; 27
3. **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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

3.2. Залежність швидкості дихання від мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози

Швидкість дихання обмежується багатьма факторами, в тому числі й мембранним потенціалом мітохондрій. Відомо, що протоніофор зменшує мембранний потенціал, тим самим нівелює зворотній механізм інгібування швидкості дихання. Ми припустили, що субстрат-специфічні відмінності швидкості дихання панкреатичних ацинусів у відповідь на дію FCCP може визначатися змінами у зниженні мембранного потенціалу мітохондрій за внесення FCCP.

У стані спокою інтенсивність флуоресценції ізолюваних панкреатичних ацинусів не залежала від субстрату окиснення (див. рис. 3.6 та рис. 3.7).

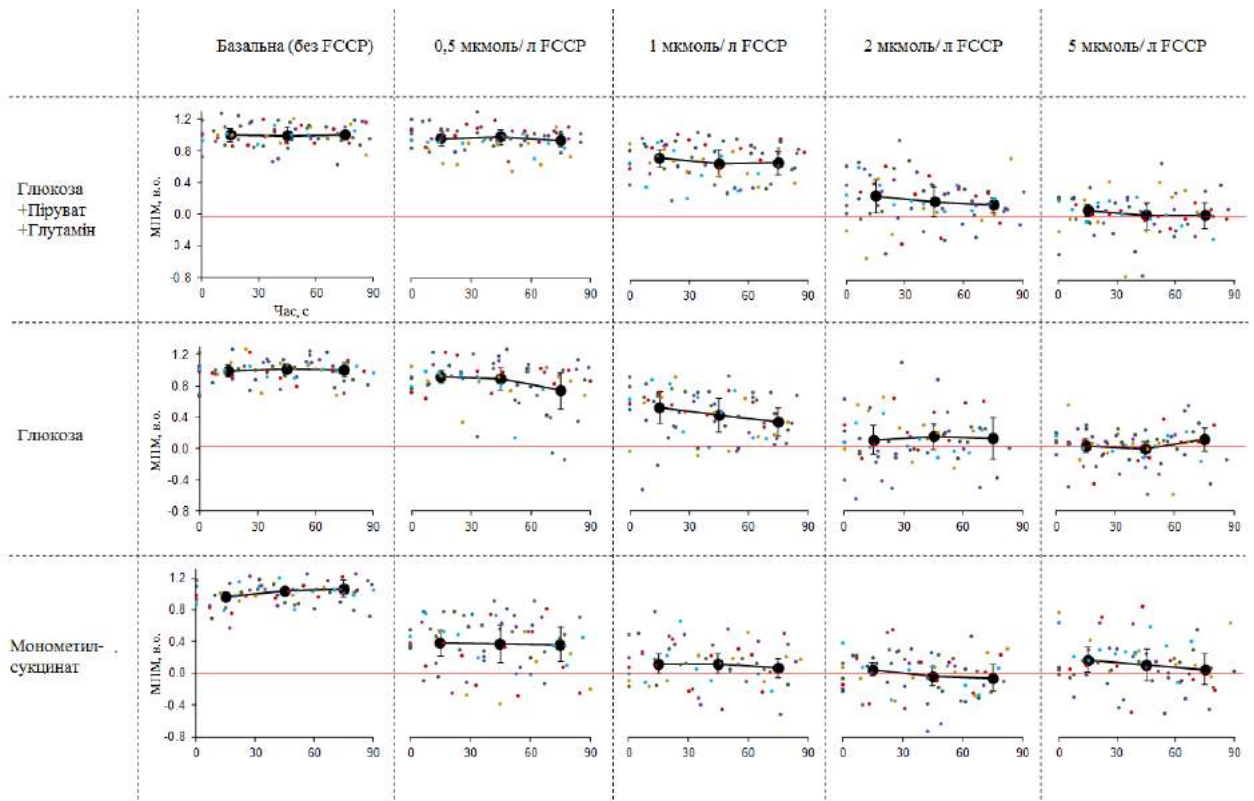


Рис. 3.6. Час не впливав на мембранний потенціал мітохондрій панкреатичних ацинусів, які попередньо були проінкубовані з FCCP ($t = 60$ с.): маленькі кольорові маркери представляють середню флуоресценцію кожної фотографії, великі чорні маркери – $M \pm m$ значення для трьох періодів часу (0–30 с, 31–60 с, 61–90 с); дані, нормалізовані як до базових значень, так і до значень після попередньої інкубації з 5 мкмоль/л FCCP; [родамін123] = 10 мкг / мл; $n = 6$.

Після 60 с. інкубації з FCCP, інтенсивність флуоресценції ацинарних клітин підшлункової залози була відносно стабільна протягом 90 с. (рис. 3.6). Встановлено, що інтенсивність флуоресценції збільшувалась пропорційно до концентрації FCCP і за внесення 2 мкмоль/л FCCP досягала 90 — 100 % від рівня флуоресценції зареєстрованого за внесення 5 мкмоль/л FCCP (рис. 3.7).

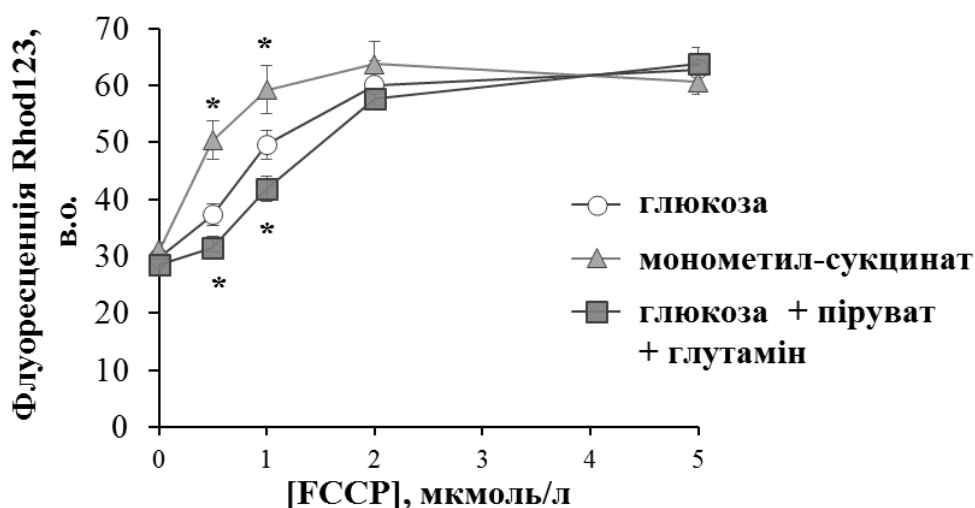


Рис. 3.7. Вплив субстратів окиснення на інтенсивність флуоресценції з родаміном 123 ацинарних клітин підшлункової залози: панкреатичні ацинуси інкубовані з FCCP протягом 60 с. і флуоресценція вимірювали протягом 90 с.; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін], [монометил-сукцинат] = 2 ммоль/л; [родамін 123] = 10 мг/мл, * – статистично достовірною різниця $P < 0,05$ у порівнянні з інтенсивністю флуоресценції за використання лише глюкози, $n = 6$; $M \pm m$.

Флуоресцентний сигнал зареєстрований за цієї концентрації протонатора розглядали як повну деполяризацію мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Максимальна інтенсивність флуоресценції була приблизно в 2 рази вища, а ніж базальна (без додавання FCCP) та не залежала від субстрату окиснення. Тому отримані дані флуоресценції були нормалізовані і за базальний рівень флуоресценції ацинарних клітин підшлункової залози приймали значення максимального мембранного потенціалу мітохондрій (1 в.о.), а за максимальний рівень

флуоресценції – нульовий мембранний потенціал або його повну деполяризацію (0 в. о.). Зниження мембранного потенціалу мітохондрій панкреатичних ацинусів під впливом FCCP залежало від субстрату окиснення, що знаходився в середовищі. Після інкубації панкреатичних ацинусів з 0,5 – 1 мкмоль/л FCCP у разі використання глюкози, пірувату та глутаміну мембранний потенціал мітохондрій статистично вірогідно збільшився порівняно з мембранним потенціалом за окиснення глюкози (рис. 3.8 А). І навпаки, за окиснення монометил-сукцинату додавання протонифору спричиняло значне розсіювання мітохондріального потенціалу (рис. 3.8 Г). Зростання швидкості дихання було пропорційним до зниження мембранного потенціалу, але швидкість FCCP-стимульованого дихання залежала від субстрату окиснення, що знаходився у середовищі (рис. 3.8). У цьому експерименті ми реєстрували дихання панкреатичних ацинусів протягом короткого періоду (< 1 хв) для кожної концентрації FCCP, щоб краще відповідати термінам експерименту з паралельним реєструванням мембранного потенціалу мітохондрій. Тому високі концентрації протонифору не викликали значного пригнічення швидкості дихання за окиснення монометил-сукцинату. Для оцінки залежності швидкості дихання від потенціалу мембрани мітохондрій одержали коефіцієнти еластичності, що розраховувались за наступним рівнянням для початкових змін за 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, що не була заінгібована олігомціном,
 $\Delta\Psi_m$ – максимальний потенціал мембрани мітохондрій без додавання FCCP;
 диференціали, обчислені після додавання 0,5 мкмоль/л FCCP.

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

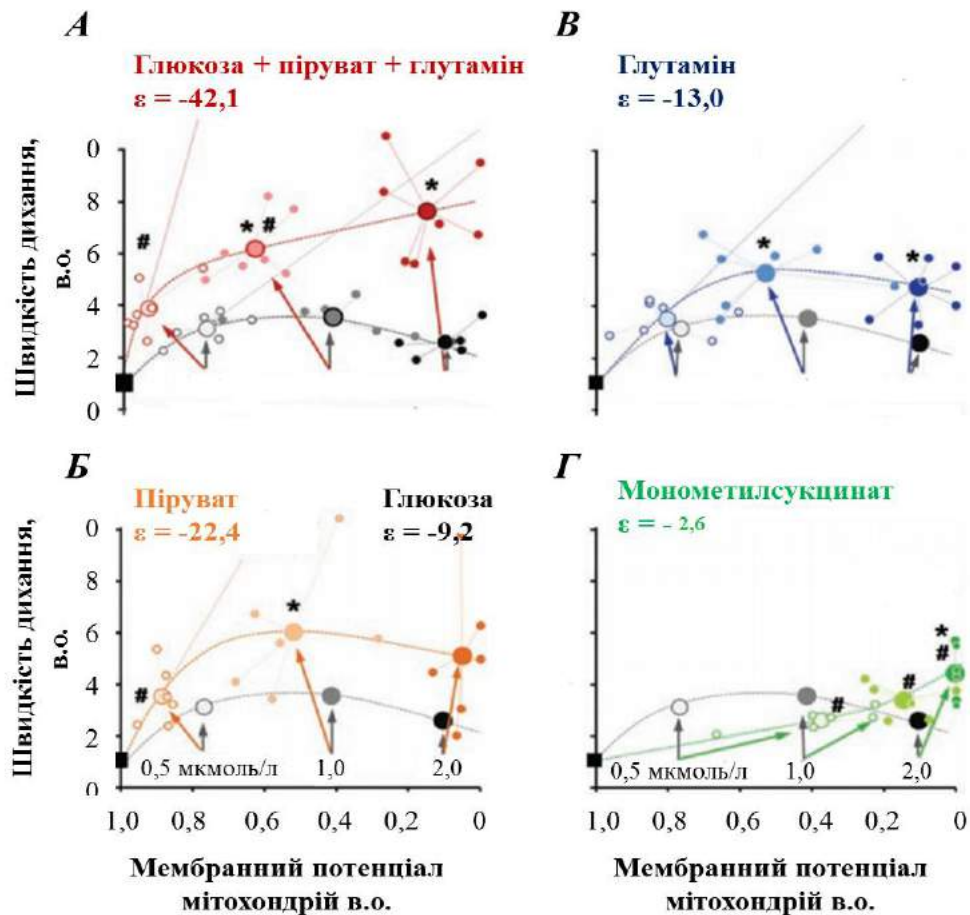


Рис. 3.8. Здатність FCCP знижувати мембранний потенціал мітохондрій та стимулювати адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози залежить від субстрату окиснення: *A–Г* – залежність швидкості дихання та мембранного потенціалу мітохондрій від субстрату окиснення та концентрації FCCP; 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); концентрація FCCP вказана на рисунку у відповідних ділянках; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін], [монометил-сукцинат] = 2 ммоль/л; статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ відносно швидкості дихання (*) або мембранного потенціалу мітохондрій (#) за окиснення глюкози (сірі кола).

Залежність дихання від потенціалу мембрани мітохондрій у разі окиснення глюкози або глюкози + глутаміну + пірувату, схоже, добре узгоджується із встановленими кінетичними моделями, а коефіцієнти

еластичності подібні до тих, що отримані для ізольованих мітохондрій [102]. Однак, за окиснення монометил-сукцинату, дихальна реакція «затримувалася» і суттєво посилювалася лише тоді, коли мембранний потенціал повністю розсіявся. Ми припускаємо, що саме дихальний комплекс I, але не комплекс II, є чутливим до деполяризації мембран та контролює швидкість дихання у живих ацинарних клітинах підшлункової залози.

Підсумок. Поєднання глутаміну, пірувату та глюкози підтримує високу швидкість дихання та забезпечує найбільший рівень відновлювальних еквівалентів дихального ланцюга потрібних для підтримки найвищих рівнів мембранного потенціалу за навантаження FCCP [Manko V.O., Bilonoha O.O., Manko V.V.] Отже, використання цих субстратів може нівелювати дію багатьох патологічних факторів і можуть мати цитопротекторну дію.

1. 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.
2. Manko V. 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.
3. 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.
4. 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.

5. Манько В.В. Білонога О.О., Манько Б.О., Максимальна адапційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Матеріали Тематичного VII з'їзду УБФТ. Київ, 2018; 9.

3.3. 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 ацинарних клітин підшлункової залози відбувається деполяризація мембрани мітохондрій [197], що призводить до збільшення синтезу АТФ [199] та роз'єданого дихання [140]. Проте чи змінюється адаптаційна здатність мітохондрій панкреатичних ацинусів за активації секреції не відомо. Тому метою роботи було встановити, як змінюються адаптаційна здатність мітохондрій (максимальна швидкість роз'єданого дихання та оптимальна концентрація FCCP) під впливом дії секретогогів та інсуліну за окиснення різних субстратів.

З'ясувалося, що швидкість базального дихання у контролі не залежала від субстрату окиснення і була у межах від $0,85 \pm 0,09$ до $1,0 \pm 0,14$ в.о. (рис. 3.9) [1]. Під впливом холецистокініну чи ацетилхоліну спостерігали збільшення базальної швидкості дихання, але ступінь збільшення залежав від субстрату, що знаходився у середовищі. Встановлено, що за окиснення глюкози базальна швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози збільшилась у порівнянні з контролем на 16 і 25 % відповідно, а за окиснення глюкози та пірувату – на 36 і 37 % та за окиснення глюкози та глутаміну – на 21 і 29 % (рис. 3.9 А–В). Швидкість дихання ацинарних клітин статистично вірогідно збільшувалася за внесення FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л у разі використання глюкози до $1,82 \pm 0,30$ в.о. Подальше підвищення концентрації FCCP до 1 мкмоль/л лише незначно збільшило швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози (до $1,86 \pm 0,37$ в.о.). За вищих концентрацій FCCP спостерігали зменшення швидкості дихання щодо попередніх значень [1].

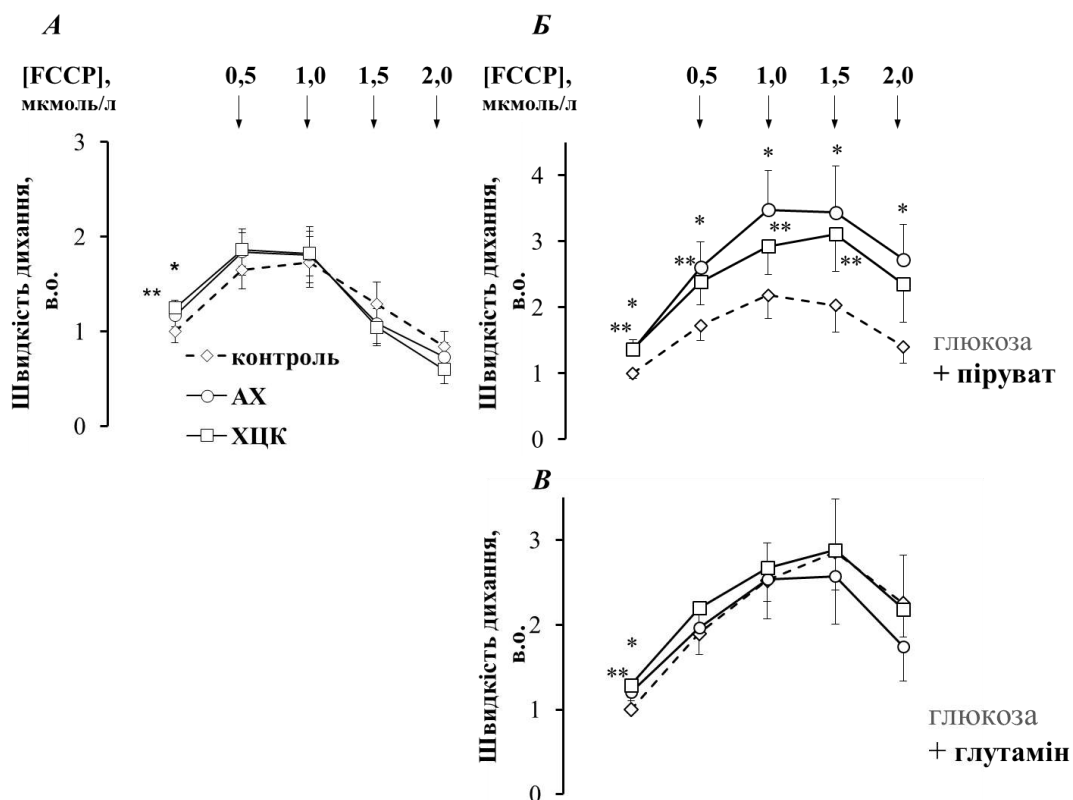


Рис. 3.9. Вплив первинних агоністів-активаторів секреції на швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози залежить від субстрату окиснення: А–В – швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів за впливу ацетилхоліну (АХ, 4,5 мкмоль/л) та холецистокініну (ХЦК, 0,5 нмоль/л) та окиснення різних субстратів; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] і [глутамін] = 2 ммоль/л; дані нормалізовані до швидкості дихання за окиснення лише глюкози без додавання FCCP; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ між швидкостями дихання у контролі та за впливу ацетилхоліну, # – за впливу холецистокініну; $n = 11$ (А) або 5–6 (Б, В).

Для оцінки адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози у наведених вище дослідженнях ми використали два параметри – оптимальну концентрацію FCCP, що встановлювали, як і у попередньому експерименті (див. розділ 3.1) та власне максимальну швидкість роз'єданого дихання у кожному експерименті, незалежно від концентрації FCCP [1].

Так, за використання глюкози оптимальна концентрація FCCP становила у стані спокою $0,82 \pm 0,08$ мкмоль/л, а максимальна швидкість дихання – 1,85

$\pm 0,35$ в.о. (табл. 3.3) [1]. Коли у середовищі з глюкозою знаходились секретогоги, то оптимальна концентрація FCCP та максимальна швидкість роз'єданого дихання статистично вірогідно не відрізнялася від контрольних значень (табл. 3.3) [1].

Таблиця 3.3.

Оптимальна концентрація FCCP та максимальна швидкість роз'єданого дихання за різних екзогенних субстратів окиснення у спокої та під час активації секреції

Умови визначення	Оптимальна [FCCP], мкмоль/л	Максимальна швидкість роз'єданого дихання, в.о.	n
Глюкоза			
контроль	0,82 \pm 0,08	1,85 \pm 0,35	11
АХ	0,73 \pm 0,08	1,95 \pm 0,27	11
ХЦК	0,73 \pm 0,08	1,96 \pm 0,21	11
Глюкоза + піруват			
контроль	1,17 \pm 0,10	2,32 \pm 0,45	6
АХ	1,10 \pm 0,19	3,62 \pm 0,64*	5
ХЦК	1,33 \pm 0,10	3,19 \pm 0,53*	6
Глюкоза + глютамін			
контроль	1,42 \pm 0,08	2,89 \pm 0,60	6
АХ	1,30 \pm 0,12	2,76 \pm 0,49	5
ХЦК	1,42 \pm 0,08	2,91 \pm 0,46	6
Глюкоза + монометилсукцинат			
контроль	0,83 \pm 0,11	2,64 \pm 0,42	6
АХ	0,92 \pm 0,08	2,25 \pm 0,35	6
ХЦК	1,00 \pm 0,00	2,70 \pm 0,29	6
Глюкоза + диметил- α -кетоглутарат			
контроль	1,00 \pm 0,00	2,36 \pm 0,33	6
АХ	1,00 \pm 0,00	2,54 \pm 0,35	6
ХЦК	0,92 \pm 0,08	2,72 \pm 0,46	6

* - статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно з контролем; $M \pm m$.

Після додавання до середовища інкубації холецистокініну чи ацетилхоліну швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози інтенсифікувалося лише за окиснення суміші глюкози і пірувату (рис. 3.9, Б). За цих умов, максимальна швидкість роз'єданого дихання під впливом ацетилхоліну збільшилася на 56 % порівняно з контролем, а за впливу холецистокініну – на 37,5% (табл. 3.3). Збільшення оптимальної концентрації FCCP спостерігали лише за умов дії холецистокініну. Швидкість FCCP-стимульованого дихання не змінювалася за дії первинних агоністів у разі використання глюкози та глютаміну (рис. 3.9, В).

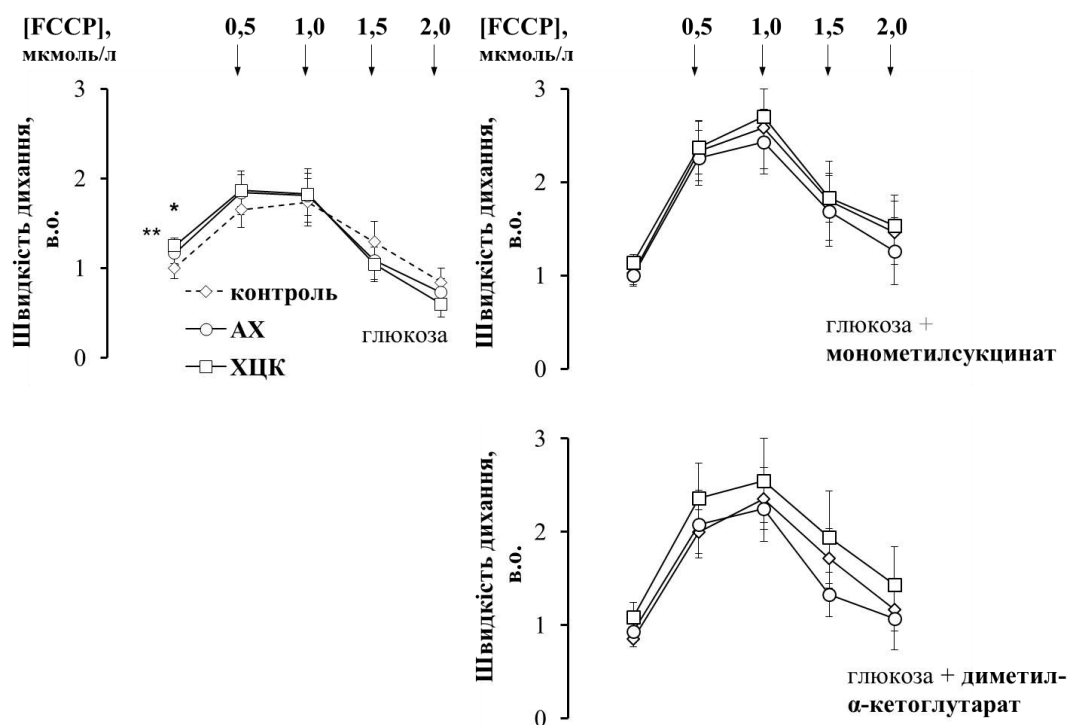


Рис. 3.10. Первинні агоністи не впливають на швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення сукцинату та α -кетоглутарату: А–В – вплив на швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів ацетилхоліну (4,5 мкмоль/л) та холецистокініну (0,5 нмоль/л) за окиснення різних субстратів; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [монометилсукцинат] і [диметил- α -кетоглутарату] = 2 ммоль/л; дані нормалізовані до швидкості дихання за окиснення лише глюкози без додавання FCCP; n = 6.

Також не відрізнялась від контролю й максимальна швидкість роз'єданого дихання та оптимальна концентрація FCCP за дії секретогогів також (табл. 3.3) [1].

На наступному етапі експерименту ми з'ясували, чи змінюється максимальна адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози внаслідок дії секретогогів за окиснення метильованих форм α -кетоглутарату та сукцинату.

Досліджено, що швидкість базального чи FCCP-стимульованого дихання ацинарних клітин підшлункової залози за дії секретогогів не відрізнялась від контролю у разі використання глюкози та монометилсукцинату (рис. 3.10, Б). Максимальна швидкість роз'єданого дихання та оптимальна концентрація теж не відрізнялась від контролю за впливу холецистокініну та ацетилхоліну (табл. 3.3). Це ж повторилося і для α -кетоглутарату (рис. 3.10, В і табл. 3.3) [Білонога, 2019].

Для формалізації оцінки адаптаційної здатності мітохондрій, було розраховано площу під кривими залежності швидкості дихання у діапазоні досліджуваних концентрацій FCCP [Білонога, 2019]:

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

де v_i – швидкість дихання за певної концентрації FCCP, C – концентрація FCCP. Такий підхід дає змогу отримати інтегративну оцінку адаптаційної здатності мітохондрій, яка враховує як максимальну швидкість роз'єданого дихання, так і оптимальну концентрацію FCCP [Білонога, 2019].

З'ясувалося, що адаптаційна здатність мітохондрій ацинарних клітин у контролі (на тлі глюкози) зменшується у такій послідовності: глутамін (4,46 у.о. \times мкмоль/л) : сукцинат (3,98 у.о. \times мкмоль/л) : піруват (3,57 у.о. \times мкмоль/л) : α -кетоглутарат (3,54 у.о. \times мкмоль/л) : глюкоза (2,88 у.о. \times мкмоль/л). Коли діють секретогоги, площа під кривою залежності швидкості дихання від концентрації FCCP збільшується тільки за окиснення суміші

глюкози та пірувату – до 5,78 та 5,14 у.о. \times мкмоль/л для ацетилхоліну та холецистокініну відповідно [1].

В основі механізмів внутрішньоклітинної трансдукції сигналу від ацетилхоліну чи холецистокініну лежить активація $G_{q/11}$ -білків та вивільнення депонованого Ca^{2+} [141]. Власне, генерація Ca^{2+} -сигналу і спричиняє активацію секреторної відповіді клітини і, очевидно, інтенсифікацію енергопродукції опосередковано через активацію у матриксі мітохондрій НАДН-залежних дегідрогеназ. Відомо, що піруватдегідрогеназа, є Ca^{2+} -залежними ферментом [52]. Тому слід очікувати, що в основі випереджувального зв'язку за активації секреції в ацинарних клітинах підшлункової залози лежить активація цього комплексу [1].

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 [175].

З'ясувалося, що вплив інсуліну на базальну швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози залежала від того, який екзогенний субстрат був у позаклітинному середовищі. За використання глюкози спостерігали статистично вірогідне збільшення базальної швидкості дихання до $1,28 \pm 0,12$ в.о. порівняно з контролем (рис. 3.11 А, Б), але коли у середовищі інкубацій був лише піруват, швидкість дихання не відрізнялась від контрольних значень (рис. 3.11 В), що узгоджується з даними літератури про активацію інсуліном секреції екзокринною частиною підшлункової залози [66]. Але коли у середовищі інкубацій був лише піруват, швидкість дихання панкреатичних ацинусів не відрізнялась від контрольних значень (рис. 3.11 В).

У контролі швидкість FCCP-стимульованого дихання ацинарних клітин підшлункової залози також залежала від субстрату окиснення. За використання глюкози внаслідок додавання у полярографічну комірку 0,5 мкмоль/л FCCP швидкість дихання збільшилась до $1,95 \pm 0,44$ в.о. За дії вищих

концентрацій FCCP швидкість дихання ацинарних клітин зменшувалася відносно попередніх значень (рис. 3.11 А).

Коли ж використовували піруват, то внесення 0,5 мкмоль/л FCCP спричиняло збільшення швидкості дихання до $1,89 \pm 0,16$ в.о. Під впливом FCCP у вищих концентраціях – 1 і 1,5 мкмоль/л – швидкість дихання збільшувалася до $2,52 \pm 0,24$ та $2,56 \pm 0,38$ в.о. Лише за 1,5 мкмоль/л FCCP спостерігали відносне зменшення інтенсивності дихання панкреатичних ацинусів (рис. 3.11 В).

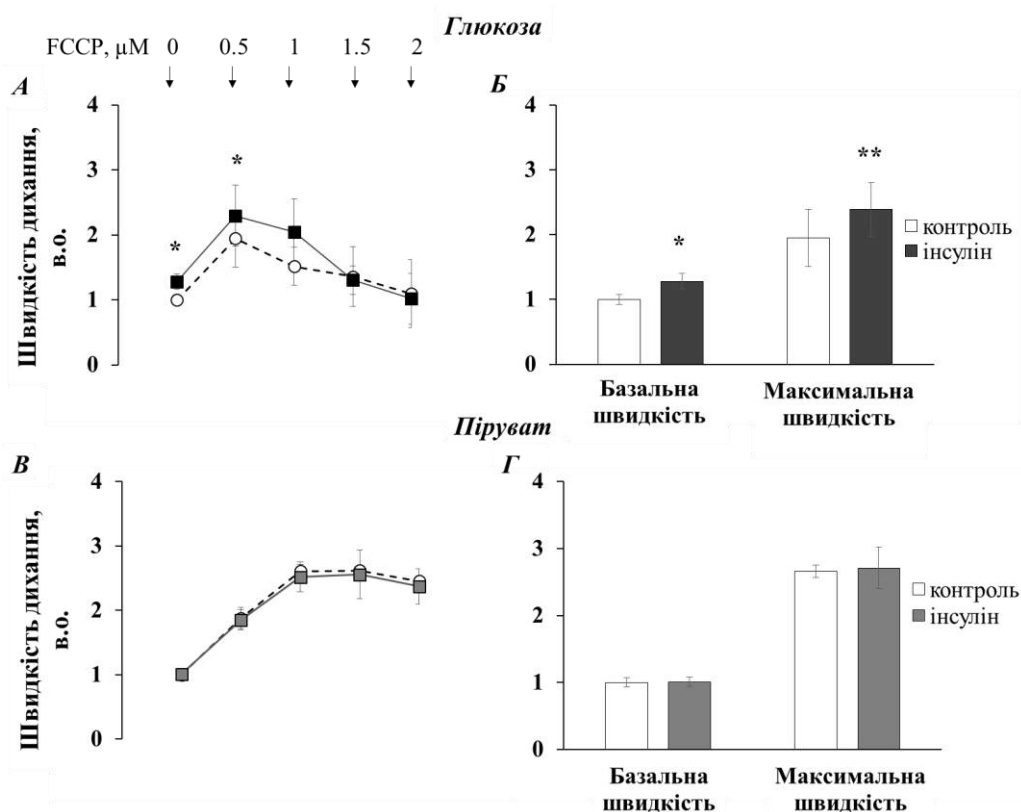


Рис. 3.11. Вплив інсуліну на швидкість дихання панкреатичних ацинусів залежить від субстрату окиснення: А і В – швидкість FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів за дії інсуліну (100 нмоль/л) за окиснення глюкози і пірувату; Б і Г – швидкість базального дихання та максимальна швидкість роз’єданого дихання за окиснення цих субстратів; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л; дані нормалізовані до швидкості базального дихання за окиснення глюкози; * – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P < 0,05$, ** – з $P < 0,01$; $n = 4$.

Після інкубації з інсуліном за окиснення глюкози швидкість дихання за дії FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л статистично вірогідно збільшилась на 18% у порівнянні з контролем (рис. 3.11 А, Б). У випадку використання пірувату інсулін не стимулював швидкості дихання ацинарних клітин підшлункової залози за жодних концентрацій FCCP (рис. 3.11 В, Г).

Виявлені нами зміни дихання вказують на те, що у ацинарних клітинах підшлункової залози, як і у класичних інсулін-чутливих тканинах, інсулін стимулює поглинання та катаболізм глюкози [116]. Зростання базального рівня дихання за дії інсуліну за окиснення глюкози у нашому дослідженні вказує також і на інтенсифікацію інсуліном мітохондріального окиснення, яке, однак, не пов'язане із окисненням пірувату.

Деякі автори показали, що фізіологічна концентрація глюкози та екзогенний інсулін не впливають на секрецію базальної рідини та білків, але можуть підсилювати секреторну дію холецистокініну та ацетилхоліну [76; Juma, 1997; 107, 108 129; 173]. Однак більшість досліджень, все таки повідомляють про стимулюючий вплив інсуліну на базальну та стимульовану агоністами секреторну відповідь ацинарних клітин підшлункової залози [21, 129; 107, 108; 112; 98; 159; 64; 15].

У наступному експерименті ми перевірили чи впливає інсулін на дихання ацинарних клітин підшлункової залози за стимуляції секреції холецистокініном. Для цього суспензію ізольованих ацинусів клітин підшлункової залози преінкубували впродовж 30 хв у середовищі з вмістом пірувату (2 ммоль/л) та стимулювали холецистокініном (0,1 нмоль/л) і/або інсуліном (100 нмоль/л).

У цій серії дослідів (як і в попередній) інсулін теж не змінював базальне та FCCP-стимульоване дихання ацинарних клітин за окиснення пірувату. Водночас холецистокінін збільшував швидкість базального та максимального роз'єданого дихання ацинарних клітин – на 64 та 35 % відповідно порівняно з контролем (рис. 3.12). Присутність інсуліну повністю нівелювала ефекти холецистокініну на базальне та максимальне дихання ацинарних клітин (рис.

3.12). Результати двофакторного статистичного аналізу ANOVA підтверджують наявність взаємодії двох факторів – холецистокініну та інсуліну. Ми встановили, що інсулін стимулює базальну і максимальну швидкість дихання ацинарними клітинами підшлункової залози за наявності глюкози, але не пірувату, а також усуває стимулюючий ефект холецистокініну на швидкість дихання за наявності пірувату.

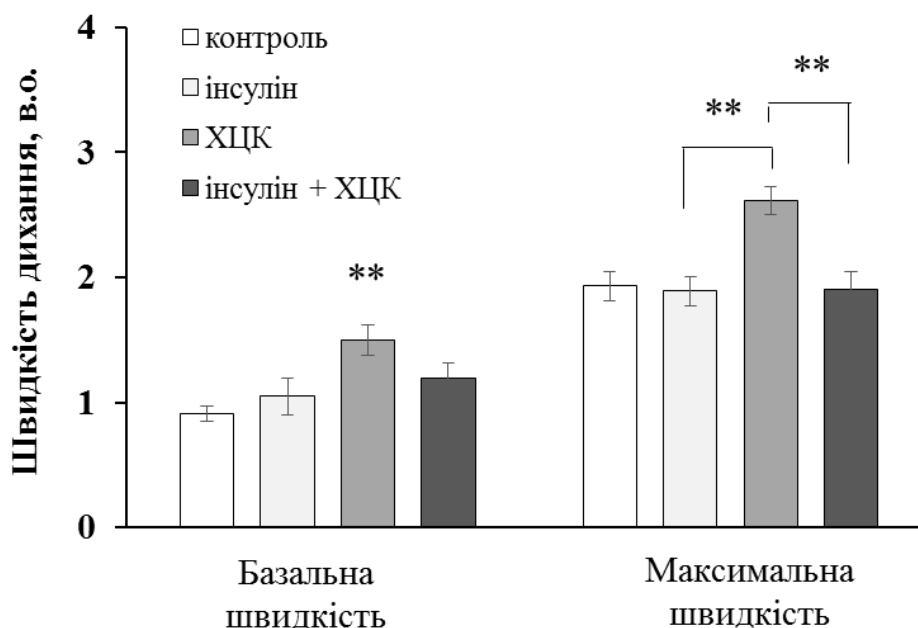


Рис. 3.12. Інсулін усуває ефект холецистокініну на базальне та FCCP-стимульоване дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення пірувату: [ХЦК] – 0,1 нмоль/л, [інсулін] – 100 нмоль/л, [піруват] – 2 ммоль/л, [FCCP] – 0,5–2 мкмоль/л; дані нормалізовані до швидкості базального дихання за окиснення глюкози, ** - статистично вірогідна різниця з $P \leq 0,01$ між позначеними вибірками оцінена за допомогою дисперсного двофакторного аналізу ANOVA, $n = 6-7$.

Очевидно, що інсулін не здійснює прямого впливу на піруватдегідрогеназний комплекс ацинарних клітин підшлункової залози, адже інсулін не впливав на базальну швидкість дихання (без стимуляції холецистокініном) за окиснення пірувату. Зокрема, повідомляється, що інсулін активує піруватдегідрогеназу у ізольованих мітохондріях печінки [158] та жировій тканині [51].

Підсумок. Секретагоги не просто стимулюють швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення пірувату, а збільшують адаптаційну здатність мітохондрій, і це лежить в основі реалізації випереджувального зв'язку в узгодженості енерговитрат і енергопродукції цих клітин [Білонога О.О., Манько Б.О., Манько В.В., 2019]. Визначальною подією у збільшенні адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози є активація піруватдегідрогеназного комплексу [Білонога О.О., Манько Б.О., Манько В.В., 2019]. А інсулін стимулює базальну і максимальну швидкість дихання ацинарними клітинами підшлункової залози за наявності лише глюкози, але не пірувату. Інсулін повністю нівелював стимулюючий ефект ХЦК на максимальну швидкість роз'єданого дихання за окиснення пірувату (двофакторний аналіз ANOVA).

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

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.
2. **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.
3. **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 глютаміну. *Молодь і поступ біології: збірник тез XI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів.* Львів, 2015; 496–497.

3.4. Механізми змін адаптаційної здатності мітохондрій за короткочасного впливу алкоголю та холецистокініну *in vitro* та *in vivo*

Один з можливих механізмів розвитку панкреатиту пов'язаний з дисфункцією мітохондрій. У дослідженнях на тваринних моделях було показано, що перевантаження мітохондрій Ca^{2+} може бути тригером, що запускає відкриття мітохондріальної пори тимчасової проникності. Вважають, що цей процес відбувається на ранніх стадіях розвитку панкреатиту [147]. Також показано, що етанол може викликати пошкодження мітохондрій, а саме деполяризацію мітохондріальної мембрани та зниження НАД^+ [180]. 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).

Встановлено, що швидкість базального дихання у контролі становила $1,00 \pm 0,12$ в.о., а після 30-хвилинної інкубації з фізіологічною концентрацією холецистокініну (0,1 нмоль/л) спостерігали типове зростання швидкості дихання у стані спокою на 33 %, що пригнічувалась внесенням етанолу до $1,02 \pm 0,09$ в.о. (рис. 3.13). За впливу холецистокініну швидкість FCCP-стимульованого дихання статистично вірогідно збільшилась до $2,75 \pm 0,2$ в.о., проте за інкубації у поєднанні з етанолом такого ефекту не спостерігалось (двофакторний аналіз ANOVA, рис. 3.13).

Подібні зміни швидкості дихання зареєстровані і протягом 60-хвилинної інкубації, проте етанол викликав статистично вірогідне збільшення швидкості базального дихання і нівелював стимулюючий ефект 0,1 нмоль/л холецистокініну на швидкість роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози (рис. 3.14).

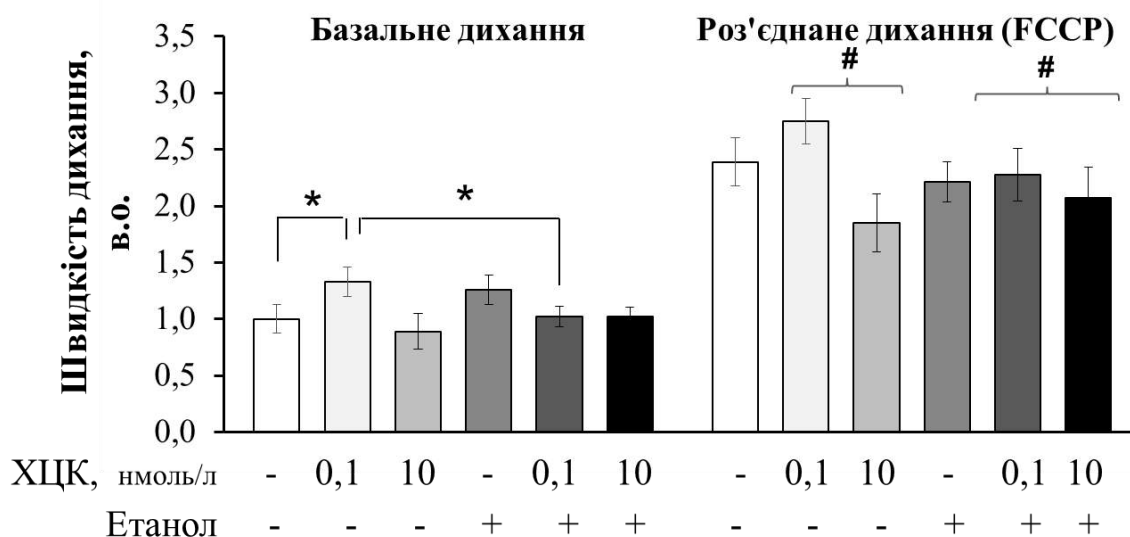


Рис. 3.13. Вплив інкубації етанолу та холецистокініну протягом 30 хв на швидкість дихання ізольованих панкреатичних ацинусах: [етанол] = 20 ммоль/л; [холецистокінін] = 0,1 або 10 нмоль/л; # - статистично вірогідний з $P < 0,05$ ефект ХЦК оцінений за допомогою дисперсного двофакторного аналізу ANOVA з повтореннями, * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ з корегуванням за допомогою post-hoc t-тестом методом Голма-Бонферроні; $M \pm m$, $n=7$.

Відомо, що холецистокінін у високих концентраціях руйнує ацинарні клітини у щурів *in vitro* [46, 190] та *in vivo* [157, 180], а також викликає деполаризацію мітохондріальної мембрани, що потенційно може бути причиною загибелі клітини.

Тому ми теж вирішили оцінити вплив надвисокої концентрації холецистокініну (10 нмоль/л) на дихання ацинарних клітин підшлункової залози. Після 30 та 60 хв інкубації з холецистокініном базальна швидкість дихання ацинарних клітин була такою ж, як і в контролі ($1,00 \pm 0,12$ та $1,3 \pm 0,2$ в.о. відповідно), але знижувалася швидкість FCCP-стимульованого дихання до $1,85 \pm 0,25$ та $2,05 \pm 0,17$ в.о. (див. рис. 3.13 та рис. 3.14). За інкубації з етанолом базальна та FCCP-стимульована швидкість дихання не відрізнялась від контрольних значень.



Рис.3.14. Вплив інкубації з холецистокініном та етанолом протягом 60 хв на швидкість дихання панкреатичних ацинусів; [етанол] = 20 ммоль/л, [холецистокінін] = 0,1 або 10 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця $P < 0,05$ підтверджена з корекцією за методом Голма-Бонферроні t-тестами між позначеними даними; $n=7$, $M \pm m$.

Отже, етанол пригнічує базальну та FCCP-стимульовану швидкість дихання на тлі дії холецистокініну. Такий ефект етанолу нівелюється пригніченням швидкості дихання за дії холецистокініну у надвисокій концентрації. Деякі автори повідомляють, що алкоголь у високих концентраціях інгібує секрецію амілази в ізольованих панкреатичних ацинусах мишей [82]. Ми припустили, що можливо таке пригнічення етанолом холецистокінін-стимульованої швидкості дихання пов'язане зі зниженням секреторної активності.

З'ясувалося, що базальна секреція амілази була низькою і становила $2,3 \pm 0,3\%$ та $3,9 \pm 0,5\%$ від загального вмісту амілази протягом 30 та 60 хв відповідно (рис. 3.15 та 3.16). Такий рівень базальної секреції відповідає даним літератури для суспензії ізольованих ацинусів [204]. За дії холецистокініну у фізіологічній концентрації реєстрували збільшення секреторної відповіді ($13,5 \pm 1,6\%$ загальної амілази протягом 30 хв і $16,7 \pm 1,5\%$ протягом 60 хв). Надвисока концентрація холецистокініну (10 нмоль/л)

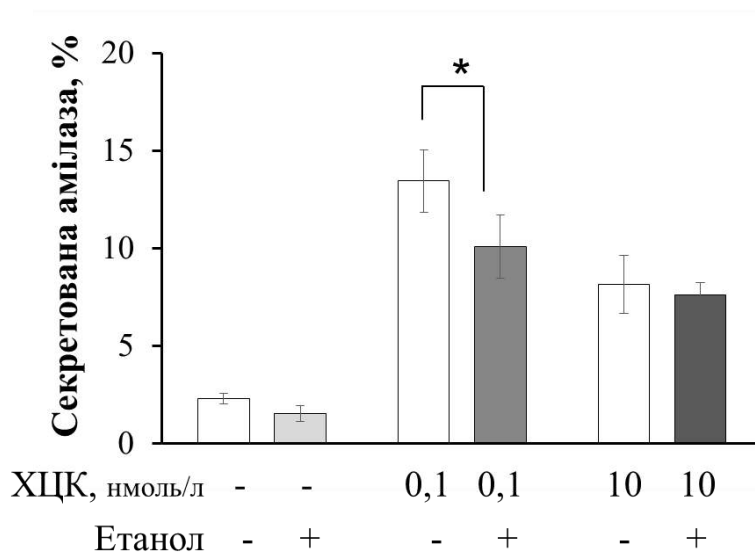


Рис. 3.15. Вплив етанолу та холецистокініну (інкубація протягом 30 хв) на секрецію амілази ізольованих панкреатичних ацинусів: [етанол] = 20 ммоль/л; [холецистокінін] = 0,1 або 10 нмоль/л; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ з корегуванням за допомогою post-hoc t-тестом методом Голма-Бонферроні; $M \pm m$, $n=7$.

викликала зменшення секреторної відповідь – лише $8,15 \pm 1,48$ і $12,47 \pm 1,4$ % відповідно (див. рис. 3.15 та 3.16). Встановлено, що етанол не впливав на базальну секрецію, але суттєво знижував холецистокінін-стимульовану секреторну відповідь через 30 хв (рис. 3.15), але не через 60 хв інкубації (рис. 3.16).

За дії етанолу усувався ефект холецистокініну у концентрації 10 нмоль/л на секрецію ацинарних клітин підшлункової залози, а саме викликав зменшення секреторної активності лише на 60 хв інкубації. Отже, етанол пригнічує холецистокінін-стимульовану секрецію панкреатичними ацинусами. Такий ефект підтверджується іншими авторами [164,165].

Стимуляція базального дихання етанолом або холецистокініном, очевидно, може бути спричинена деполяризацією мембрани мітохондрій, про яку раніше повідомляли в ацинарних клітинах підшлункової залози мишей за високих концентрацій (50-100 ммоль/л) етанолу [180]. Ми оцінили мембранний потенціал мітохондрій панкреатичних ацинусів за допомогою чутливого зонда –родаміну 123, що реєструє інтенсивність флуоресценції, яке

пов'язане із втратою потенціалу мітохондріальної мембрани через перерозподіл зонда з мітохондрій у цитоплазму клітин.

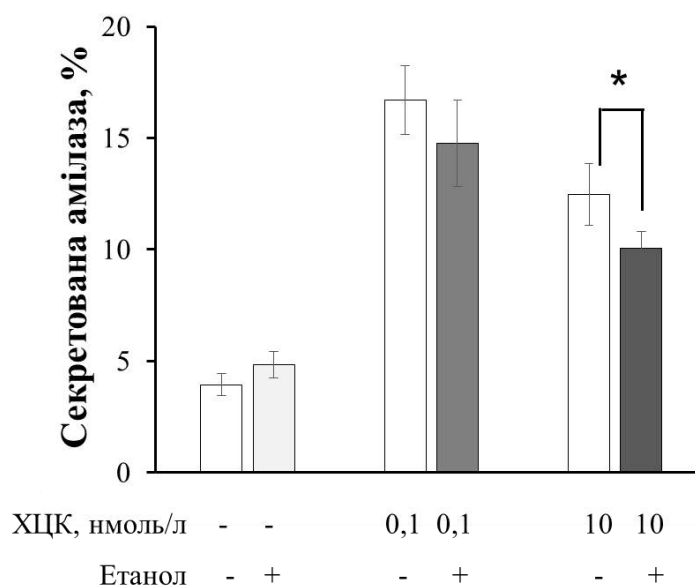


Рис. 3. 16. Вплив інкубації з холецистокініном та етанолом протягом 60 хв на секрецію амілази панкреатичних ацинусів; [етанол] = 20 ммоль/л, [холецистокінін] = 0,1 або 10 мкмоль/л; * – статистично вірогідна різниця $P < 0,05$ підтверджена з корекцією за методом Голма-Бонферроні t-тестами між позначеними даними; $n=7$, $M \pm m$.

Холецистокінін у концентрації 0,1 нмоль/л (2 год) не впливав на інтенсивність флуоресценції (рис. 3.17 А, Б), а за впливу етанолу спостерігалось лише часткове збільшення інтенсивності флуоресценції, що не досягала статистично достовірної різниці ($P = 0,0507$, рис. 3.17 Б). Повна деполяризація спостерігалася лише за внесення 2 мкмоль/л FCCP та 10 ммоль/л ротенону. За цих умов зареєстрували максимальне збільшення інтенсивності флуоресценції та рівномірний розподіл родамину 123 у цитоплазмі клітин (рис. 3.17 А, Б). Відомо, що накопичення родамину 123 залежать від ряду факторів, включаючи активність транспортерів плазматичної мембрани [71]. Таким чином, ми спектрофотометрично виміряли накопичення цього зонда у лізатах клітин. У цьому експерименті накопичення родамину 123 в ацинарних клітинах підшлункової залози не

залежало ні від впливу холецистокініну, ні від етанолу, ні від FCCP або ротенону.

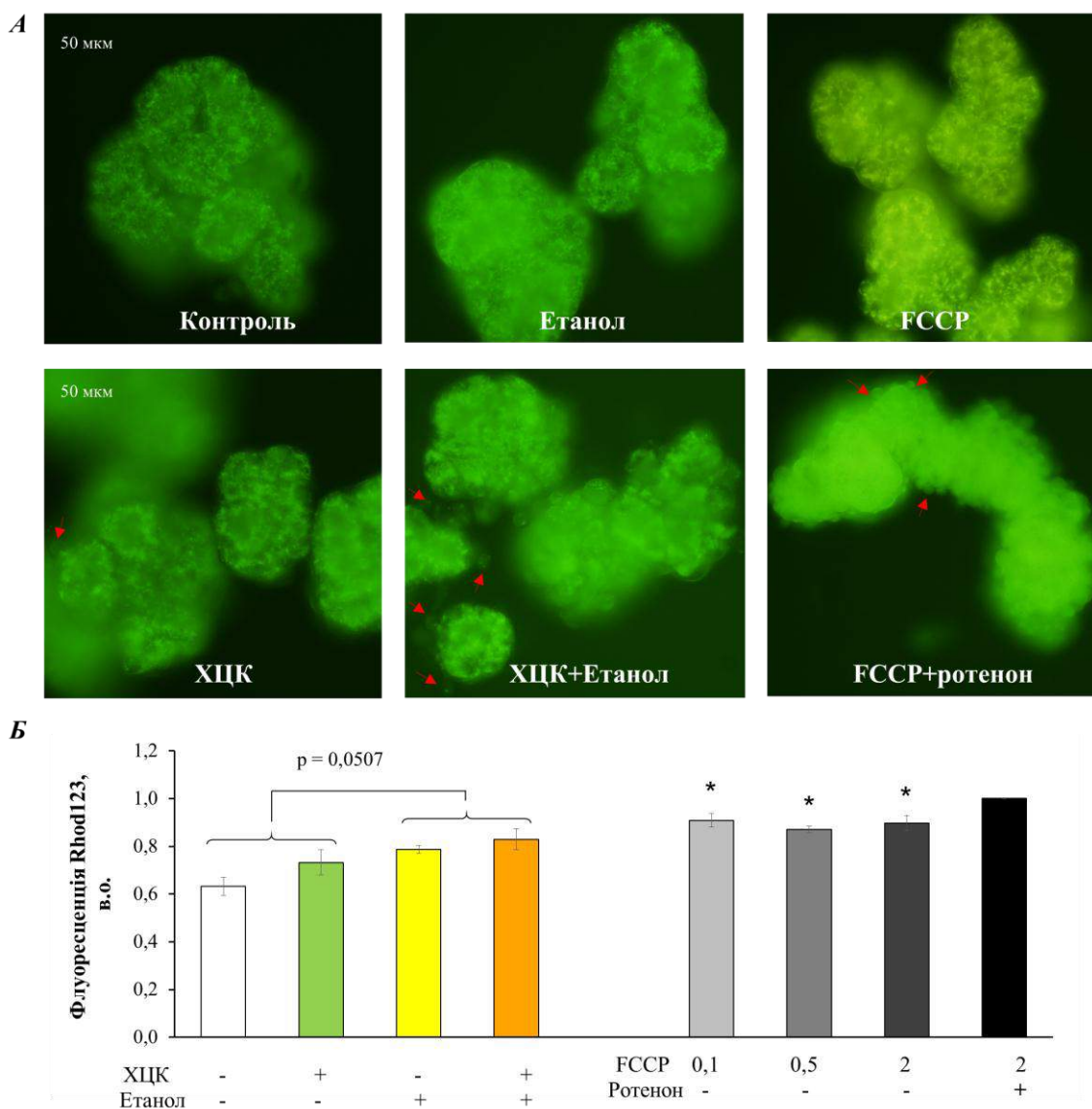


Рис. 3.17. Вплив етанолу та холецистокініну (інкубація протягом 2 год) на інтенсивність флуоресценції з родаміном 123 у ізольованих панкреатичних ацинусах: [етанол] = 20 ммоль/л; [холецистокінін] = 0,1 або 10 нмоль/л, [ротенон] = 10 мкмоль/л ; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ з корегуванням за допомогою post-hoc t-тестом методом Голма-Бонферроні; $n=4$; $M \pm m$.

Ще одним показником для діагностування розвитку панкреатиту *in vitro* є блебінг, явище «васкуляризації» мембран [122]. Ацинарні клітини з блебами на плазматичній мембрані були отримані за допомогою надвисоких доз секретогогів [3; 33; 153]. Вважають, що цитоплазматичний блебінг

характерний як для некротичних клітин, так і для апоптичних [111]. Клітинний блебінг та некроз досліджували після 2-годинної інкубації з 0,1 нмоль/л холецистокініном та 20 ммоль/л етанолом, таке поєднання викликало невелике, близько 5%, але статистично достовірне збільшення кількості некротичних клітин (рис. 3.18). У контролі та за впливу етанолу не спостерігали утворення блеб у панкреатичних ацинусах.

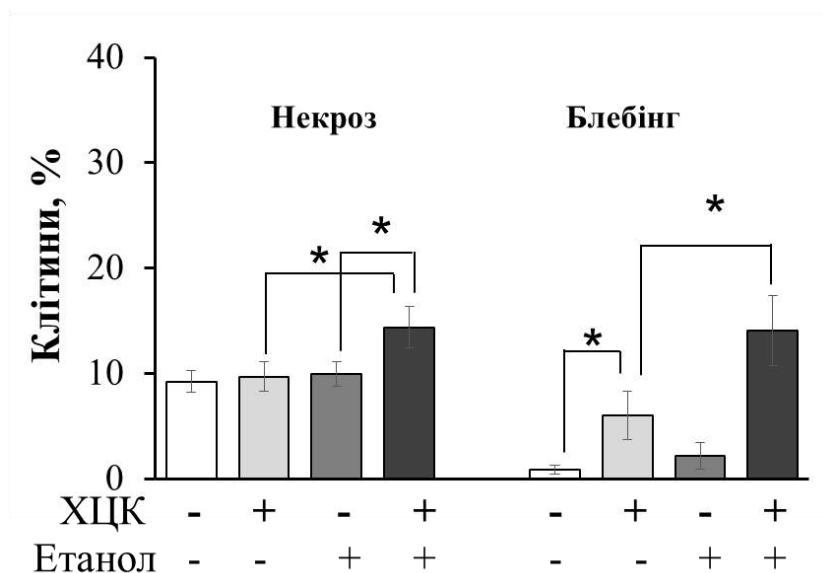


Рис. 3.18. Вплив етанолу та холецистокініну (інкубація протягом 2 год) на некроз та блебінг у ізольованих панкреатичних ацинусах; ацинуси інгібували протягом 2 год: [етанол] = 20 ммоль/л; [холецистокінін] = 0,1 або 10 нмоль/л; * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ з корегуванням за допомогою post-hoc t-тестом методом Голма-Бонферроні; $M \pm m$, $n=7$.

Поєднання холецистокініну та етанолу викликало збільшення утворення кількості блеб у плазматичній мембрані у 2 рази порівняно з даними отриманими за впливу лише холецистокініну. Цікаво, що блебінг спостерігали вже після 20-хвилинної інкубації з FCCP та ротеноном, а за дії лише FCCP такого ефекту не зареєстровано (рис. 3.18).

Для з'ясування механізмів зміни адаптаційної здатності мітохондрій за одночасної дії ХЦК та етанолу протокол дослідження ускладнили – спочатку протягом 30 хв з холецистокініном та етанолом або без нього у розчині з лише

глюкозою або у поєднанні з піруватом, глутаміном, незамінними амінокислотами або з усіма вище перерахованими субстратами окиснення. Після закінчення часу інкубації до середовища додавали відсутні компоненти та інкубували ще протягом 15 хв з подальшим дослідженням швидкості дихання ацинарних клітин підшлункової залози. Це було зроблено, оскільки швидкість роз'єданого дихання досягла свого максимуму за окиснення лише декількох субстратів (див. розділ 3.1).

Швидкість базального дихання не залежала ні від субстрату, ні від поєднання холецистокініну з етанолом (рис. 3.19 А). У контролі (без холецистокініну + етанолом, час інкубації 45 хв) FCCP-стимульоване дихання статистично вірогідно збільшилося за окиснення суміші субстратів глюкози, пірувату та глутаміну (рис. 3.19).

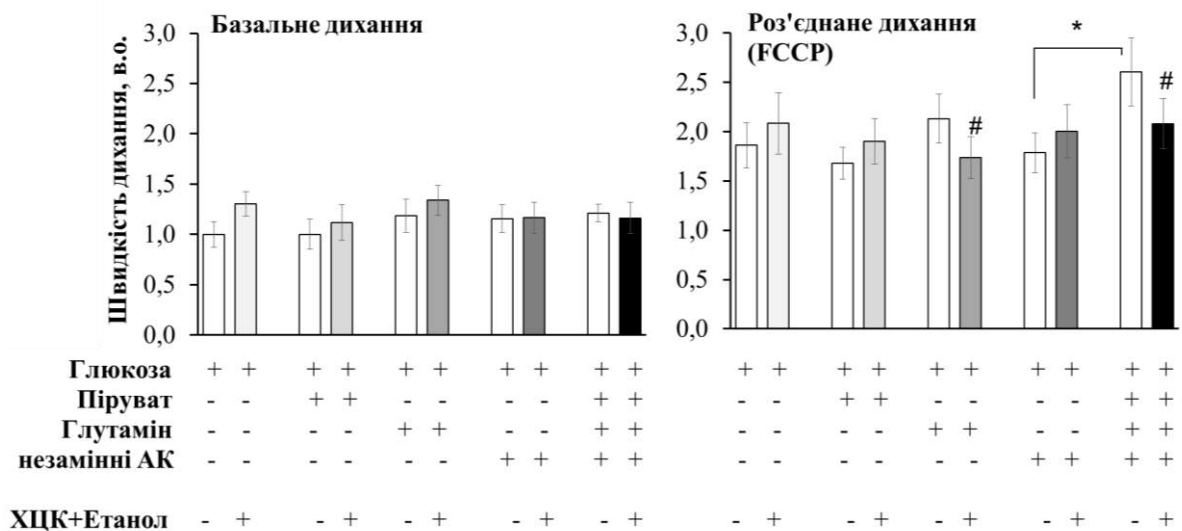


Рис. 3.19. Субстрати окиснення визначають вплив етанолу та холецистокініну на швидкість дихання панкреатичних ацинусів; в ацинусах інкубували протягом 30 хв з певним субстратом складом, а потім ще 15 хв у базальному зовнішньоклітинному середовищі; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] та [глутамін] = 2 ммоль/л, [ХЦК] = 0,1 нмоль/л, [етанол] = 20 ммоль/л; 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 (В).

Дивно, але інкубація з холецистокініном й етанолом викликала статистично вірогідне зменшення швидкості FCCP-стимулюючого дихання лише за умов, коли у середовищі був глютамін, незалежно від інших субстратів (рис. 3.19). Не виявлено жодного ефекту на швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення суміші амінокислот.

У наступному експерименті ми інкубували панкреатичні ацинуси з глюкозою, глютаміном та / або піруватом протягом 2 годин. Проведений двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA показав, що поєднання холецистокініну й етанолу впливало на інтенсивність флуоресценції з родаміном 123 та на його накопичення у ацинарних клітинах підшлункової залози залежно від субстрату окиснення (рис. 3.20).

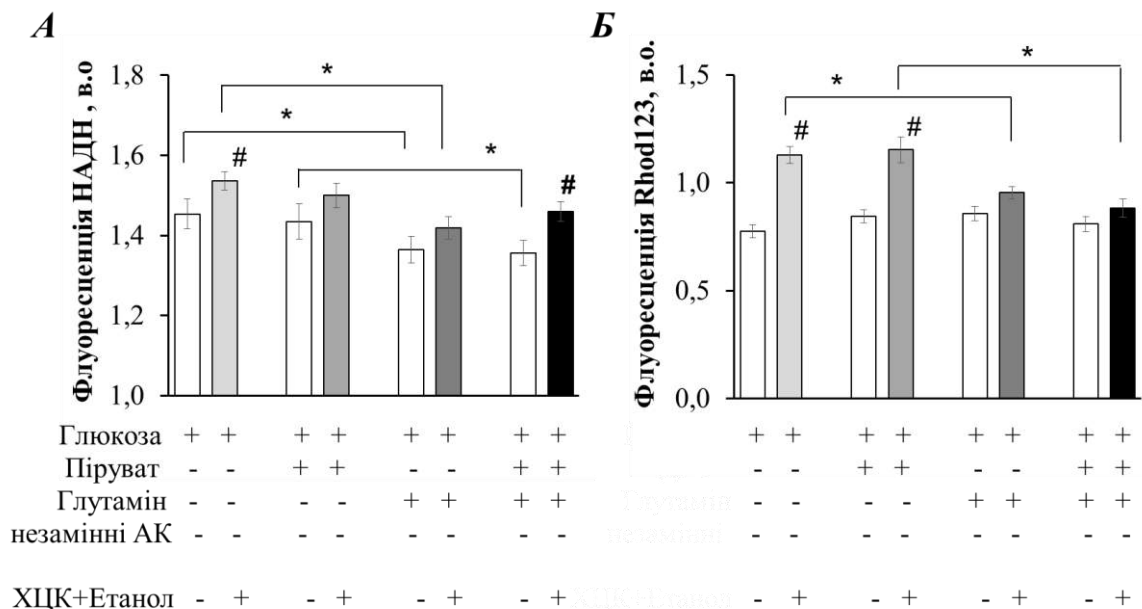


Рис. 3.20. Субстрати окиснення визначають вплив етанолу та холецистокініну на НАДН аутофлуоресценцію (А) та мембранний потенціал мітохондрій (Б) у панкреатичних ацинусах; ацинуси інкубували протягом 2 год в розчині зі субстратами; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] та [глютамін] = 2 ммоль/л, [ХЦК] = 0,1 нмоль/л, [етанол] = 20 ммоль/л; 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 того, щоб оцінити різне накопичення родаміну 123 у панкреатичних ацинусах для реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій, то інтенсивність флуоресценції родаміну 123 було нормалізовано до нагромадження його в клітинах (рис. 3.21). Поєднання холецистокініну та етанолу статистично вірогідно збільшило інтенсивність флуоресценції родаміну 123 за окиснення глюкози або глюкози та пірувату (рис. 3.20 Б), проте такого ефекту не спостерігали, коли у розчин додавали ще й глютамін.

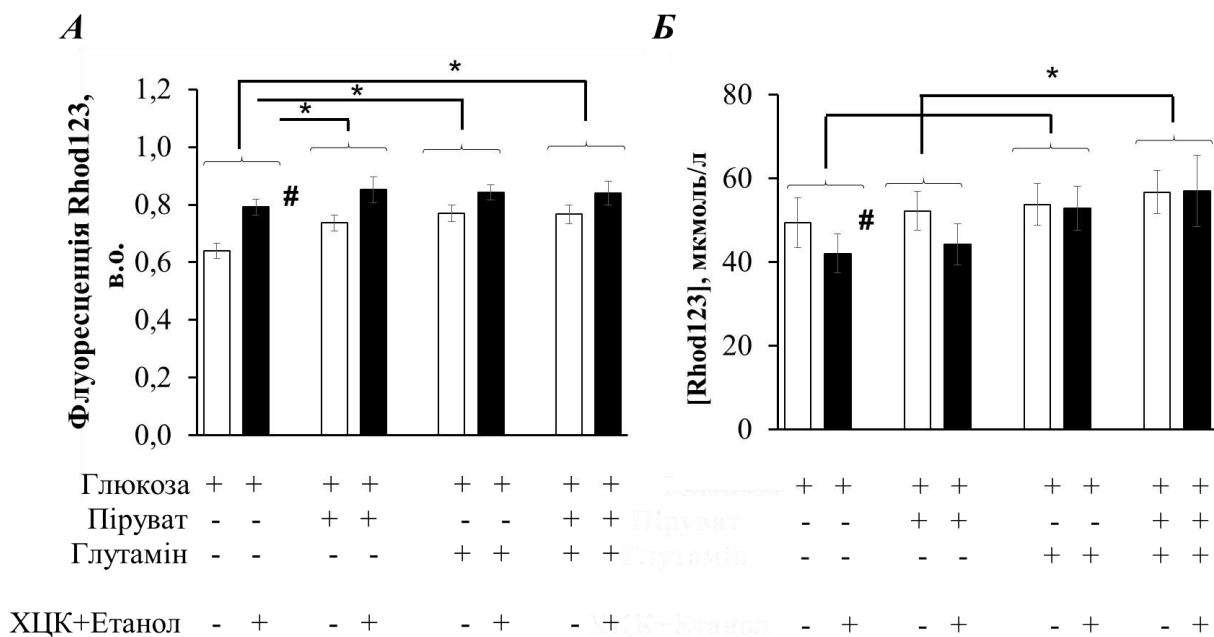


Рис. 3.21. Вплив етанолу та холецистокініну на інтенсивність флуоресценції з родаміном 123 (А) та його нагромадження (Б) в панкреатичних ацинусах залежить від субстратів окиснення; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] та [глютамін] = 2 ммоль/л, [холецистокінін] = 0,1 нмоль/л, [етанол] = 20 ммоль/л; статистичну 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 холецистокініну та етанолу); $M \pm m$, $n = 6$.

За окиснення лише глютаміну спостерігали статистично вірогідне зниження автофлюоресценції НАДН як у контролі, так і за впливу холецистокініну та етанолу (рис. 3.20 А). Комбінація холецистокініну та

етанолу статистично вірогідно збільшила інтенсивність автофлюоресценції НАДН у розчині з глюкозою або глюкозою, глютаміном та піруватом.

У цьому експерименті ми також досліджували вплив 2-годинної інкубації з холецистокініном та етанолом на некроз клітин та утворення блеб на плазматичній мембрані ацинарних клітин підшлункової залози. Проведений дисперсійний аналіз ANOVA показав взаємодію двох факторів, а саме холецистокініну у поєднанні з етанолом та субстрату окиснення.

Зокрема, за використання глюкози зареєстровано статистично достовірне збільшення некрозу (35% клітин) у панкреатичних ацинусах за дії холецистокініну та етанолу, а за внесення глютаміну чи пірувату такого ефекту не спостерігали (рис. 3.22 А).

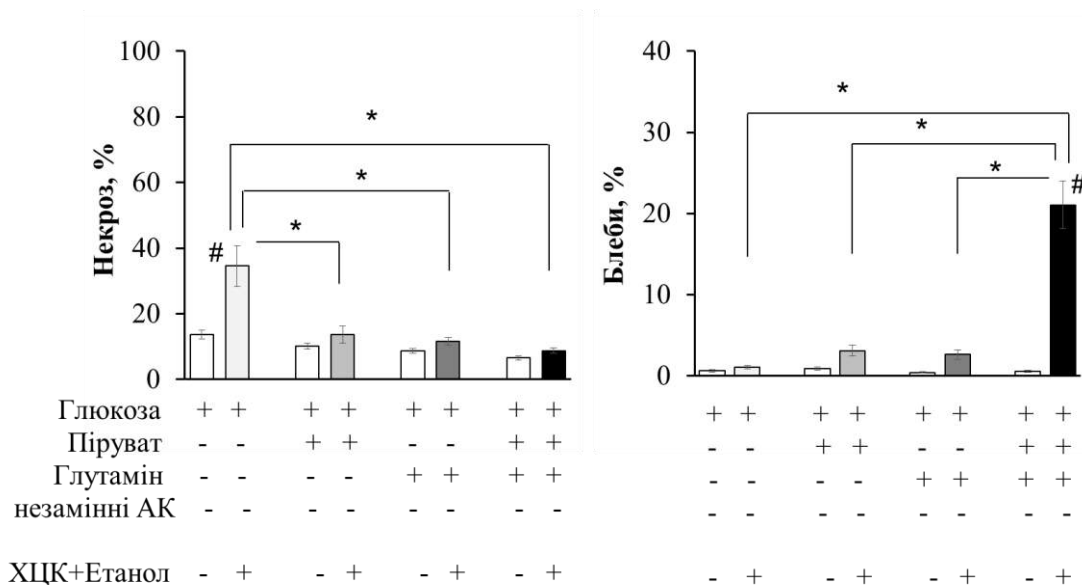


Рис. 3.22. Субстрати окиснення визначають вплив етанолу та холецистокініну на некроз (А) та блебінг (Б) у панкреатичних ацинусах; ацинуси інкубували протягом 2 год в розчині зі субстратами; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] та [глутамін] = 2 ммоль/л, [ХЦК] = 0,1 нмоль/л, [етанол] = 20 ммоль/л; статистичну 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 (А).

Статистично достовірне збільшення кількості блеб на плазматичній мембрані ацинарних клітин підшлункової залози виявлено під впливом холецистокініну й етанолу лише за інкубації з сумішшю глюкози, глютаміну, пірувату (рис. 3.22 Б).

Для перевірки, чи реалізуються отримані результати на тваринних моделях, провели дослідження впливу одноразового введення етанолу та холецистокініну *in vivo*. Для цього тварин розділили на чотири групи, яким одноразово перорально вводили 40% розчин етанолу (4 г/кг) або робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію холецистокініну (10 нмоль/л) або їхнє поєднання, контрольним тваринам водили воду та робили ін'єкцію фізіологічного розчину (див розділ 2.1). Рівень етанолу в плазмі, який досліджували оксидазно-пероксидазним методом, 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 і холецистокінін, і розчин етанолу (рис. 3.23 А). Ці результати також були підтверджені й іншим методом, а саме газовою хроматографією ($28,4 \pm 3,3$ та $21,9 \pm 10,5$ ммоль/л відповідно).

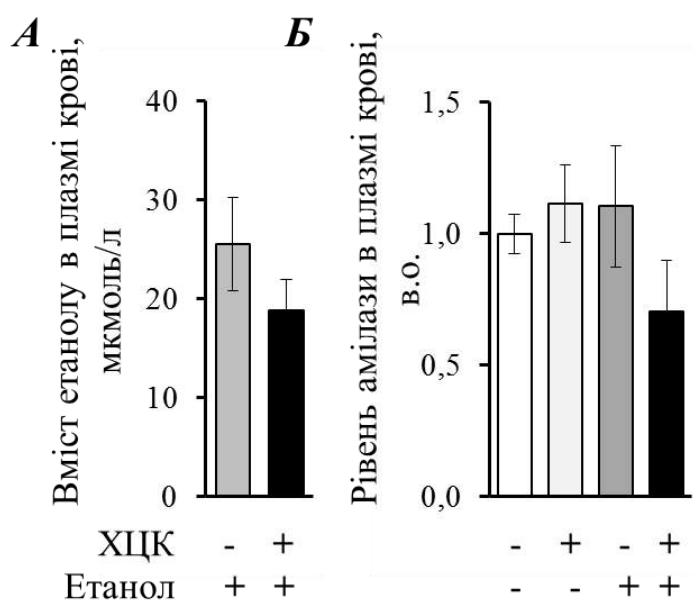


Рис. 3. 23. Вплив *in vivo* введення етанолу (2 год) та холецистокініну (1 год) на вміст етанолу (А) та амілази в плазмі крові (Б); $M \pm m$, $n=7$.

У клініці рівень панкреатичної амілази в плазмі крові використовують для діагностування панкреатиту. Для того, щоб з'ясувати чи є ушкодження

тканини у дослідних групах тварин, ми також поміряли цей показник. З'ясували, що рівень амілази в плазмі не збільшувався у жодній із дослідних груп тварин, що свідчить про відсутність пошкодження підшлункової залози (рис. 3.23 Б). Після проведення дисперсійного аналізу (ANOVA) виявилось, що у групі тварин, яким вводили розчин етанолу спостерігали статистично вірогідне зниження базальної швидкості дихання незалежно від субстрату окиснення (рис. 3.24), на відміну від швидкості роз'єданого дихання, що залежала від субстрату.

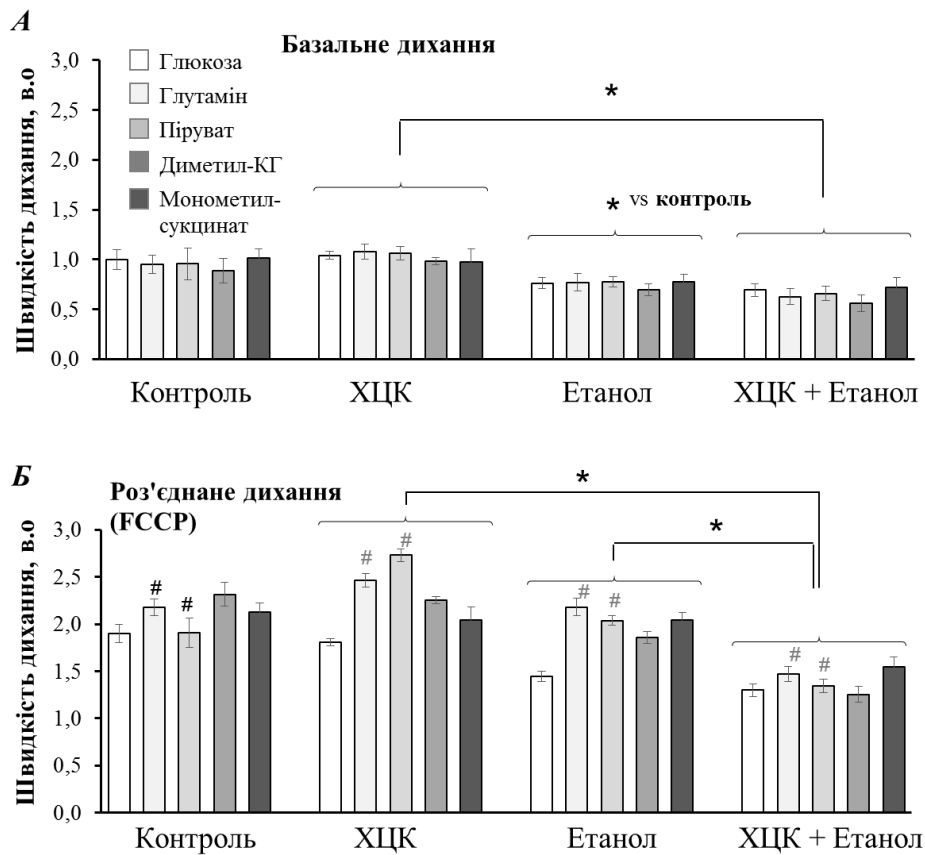


Рис.3.24. Вплив *in vivo* введення етанолу (2 год) та холецистокініну (1 год) на базальне (А) та максимальну швидкість роз'єданого дихання (Б), ізольованих панкреатичних ацинусах; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін], [монометил-сукцинат], [диметил- α -КГ] = 2 ммоль/л; статистичну різницю оцінювали за допомогою двофакторного аналізу ANOVA з повтореннями та *post-hoc* t-тестами з корекцією за методом Голма-Бонферроні: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно з контролем або між позначеними даними, # - статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ для швидкості дихання за окиснення пірувату та глутаміну, $M \pm m$, $n=7$.

Встановлено, що у групі тварин, яким вводили розчин етанолу та робили ін'єкцію холецистокініну, базальна швидкість дихання ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози була найнижчою за окиснення глутаміну або α -кетоглутарату і становила $0,58 \pm 0,14$ та $0,61 \pm 0,08$ в.о. відповідно. Проте після проведення двофакторного аналізу ANOVA не було доведено взаємодії між цими факторами (рис. 3.24). З'ясувалося, що сам по собі етанол або холецистокінін не впливали на швидкість роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів, але їх поєднання спричинило статистично достовірне зниження максимальної швидкості на ~ 25 -50% (рис. 3.24).

Відсоток некротичних клітин в ізольованих ацинусах також не збільшувався (рис. 3.25). Однак кількість клітин з утворенням блеб на плазматичній мембрані клітин суттєво збільшилась у групі тварин, які отримували розчин етанолу та холецистокінін – 30% від загальної кількості клітин в ацинусах (рис. 3.25).

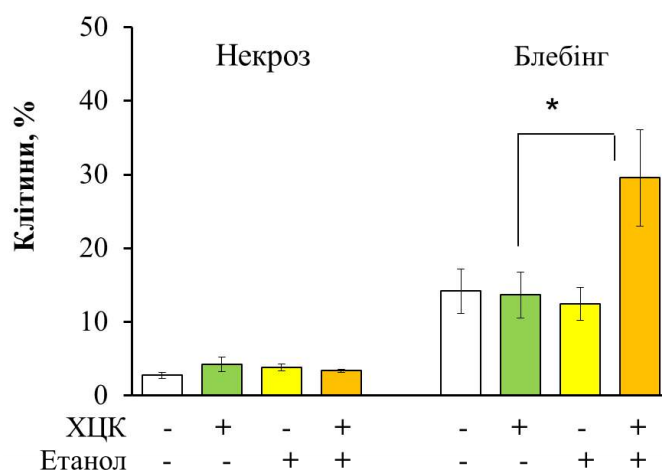


Рис.3.25. Вплив *in vivo* введення етанол (2 год) та холецистокініну (1 год) на некроз та блебінг у ізольованих панкреатичних ацинусах; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват], [глутамін], [монометил-сукцинат, М-сукцинат], [диметил- α -кетоглутарат, ДМ-КГ] = 2 ммоль/л; статистичну різницю оцінювали за допомогою двофакторного аналізу ANOVA з повтореннями та post-hoc t-тестами з корекцією за методом Голма-Бонферроні: * – статистично вірогідна різниця з $P < 0,05$ порівняно з контролем або між позначеними даними, $M \pm m$, $n=7$.

Такого збільшення не спостерігалось у тварин, яким вводили тільки холецистокінін або розчин етанолу. Високий рівень розвитку блеб у плазматичній мембрані панкреатичних ацинусів в контролі є типовим для свіжоізольованих ацинусів і зазвичай зникає протягом години після виділення.

Зниження швидкості роз'єданого дихання спостерігали на моделях гострого панкреатиту [Shulz et al., 1995] і може свідчити про пошкодження мітохондрій через активацію мітохондріальна пори тимчасової проникності [147].

Підсумок. Зниження швидкості роз'єданого дихання ми спостерігали в наступних випадках: 1) за фізіологічної стимуляції холецистокініном, коли у розчині інкубації був лише глутамін і не було глюкози, 2) за умов гіперстимуляції холецистокініном за окиснення глюкози, пірувату та глутаміну, 3) за фізіологічної стимуляції холецистокініном у поєднанні з етанолом за окиснення глутаміну з глюкозою та піруватом або без нього. За впливу етанолу та холецистокініну спостерігали зростання кількості некротичних клітин у панкреатичних ацинусах за окиснення глюкози, цей ефект нівелювався за додавання до розчину пірувату та / або глутаміну.

Гострий вплив клінічно значущої дози етанолу в поєднанні зі стимуляцією секреції *in vivo* викликає зменшення швидкості дихання ацинарних клітин підшлункової залози та сприяє утворенню блеб на плазматичній мембрані ацинарних клітин, але не є тригером для розвитку некрозу.

1. **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.
2. 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.

3. 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.

3.5. Вплив довготривалої дії алкоголю та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій підшлункової залози щурів 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 (див.розділ. 3.3). Тому у цьому експерименті ми хотіли перевірити іншу модель гострого панкреатиту, а саме поєднання етанолу та жирних кислот. Адже, відомо, що додавання пальмітоолеїнової кислоти до ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози спричинило велике, залежне від концентрації збільшення $[Ca^{2+}]$, що викликало дисфункцію мітохондрій та некроз [47].

Попередніми дослідженнями *in vitro* було підтверджено позитивну дію пірувату на максимальну швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози (див. розділ 3.2 та розділ 3.3). Також, відомо, що додавання пірувату та галактози спричинює зростання рівня АТФ [162] та зменшення некрозу у ацинарних клітин підшлункової залози [161]

Тому ми проаналізували вплив введення пірувату *in vivo* на адаптаційну здатність мітохондрій в ацинарних клітинах підшлункової залози щурів за умов короткотривалого хронічного введення етанолу на тлі високожирової дієти.

Усі тварини (незалежно контрольні чи дослідні тварини) знаходились на спеціальній дієті з високим вмістом жиру, а саме 35% калорій були отримані з жиру тваринного походження. Тварин було поділено на 4 групи: контроль, піруват, етанол, етанол+піруват. Тваринам в залежності від групи кожного вечора протягом 14 днів перорально через зонд вводили воду або етанол з розрахунком 6 грами на кг маси тварини. На 8-ий день та до кінця дослідження тваринам двічі на день робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію пірувату натрію (0,5 г на кг тварини) або таку ж фізіологічного розчину. Протягом 14

днів спостерігали за станом тварин та робили щоденне контрольне зважування (рис. 3.26).

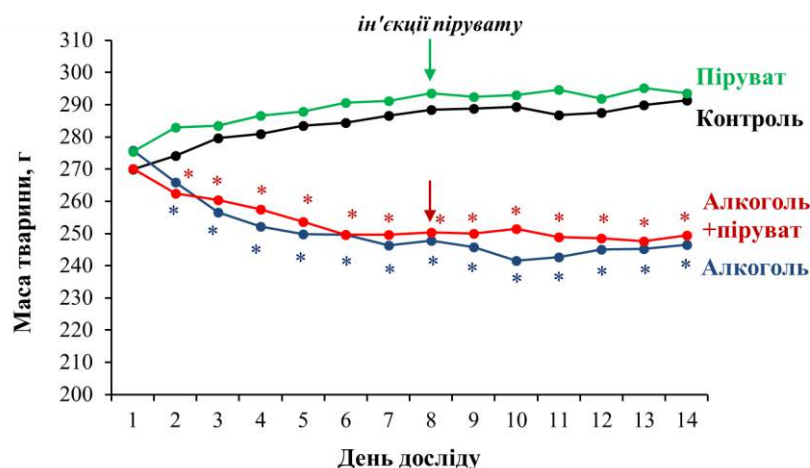


Рис. 3.26. Вплив хронічного введення етанолу та пірувату на тлі високожирової дієти на приріст маси тіла тварин: * – статистично вірогідний вплив введення пірувату за ANOVA та post-hoc тестом Голма-Борфферроні порівняно з контролем, $P < 0,05$;

Три тварини з групи етанол + піруват загинули за умов проведення експерименту. Одна тварина загинула на 4 день дослідження, а решта – на 7-ий день, ще до моменту введення розчину пірувату тваринам. Тому, очевидно, що загибель тварин, пов'язана з гострою алкогольною інтоксикацією та стрімким зниженням ваги тварин, адже ми спостерігали значну втрату ваги протягом перших 4 днів введення етанолу піддослідним тваринам. Вага стабілізувалася після 7 дня проведення експерименту у групі тварин (рис. 3. 26). Введення пірувату викликало позитивну динаміку у збільшенні маси тіла у тварин, що підтверджується двофакторним аналізом ANOVA.

Встановлено, що кількість некротичних клітин після їх виділення статистично вірогідно зростала у групі тварин, яким вводили етанол і становила $9,6 \pm 0,9$ % порівняно з контролем – $6,7 \pm 0,4$ % (рис. 3. 27). Однак етанол не знижував життєздатності клітин у групі тварин, яким також вводили і піруват ($7,5 \pm 0,6$) (рис. 3. 27).

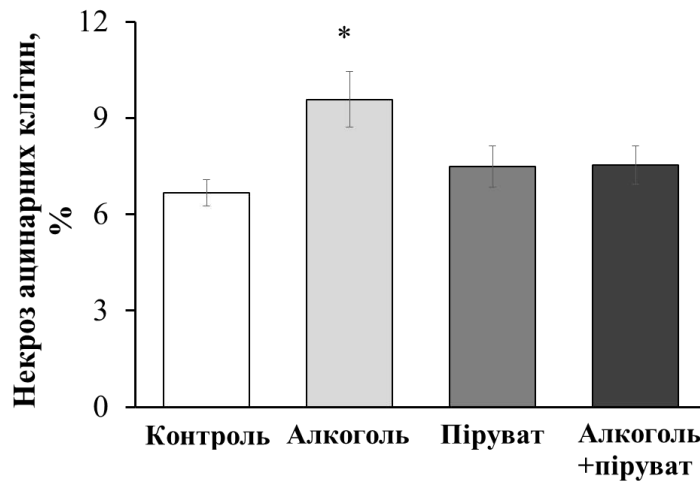


Рис. 3. 27. Вплив етанолу та пірувату *in vivo* на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози: * – статистично вірогідний вплив введення пірувату або статистично вірогідна різниця за ANOVA та post-hoc тестом Голма-Борферроні порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – статистично вірогідний вплив введення пірувату, згідно ANOVA, $P < 0,05$ $n = 7-8$.

Також досліджували вміст амілази в плазмі крові тварин. З'ясувалося, що рівень амілази у групах тварин, яким вводили етанол не відрізнявся від контрольних значень (рис. 3. 28).

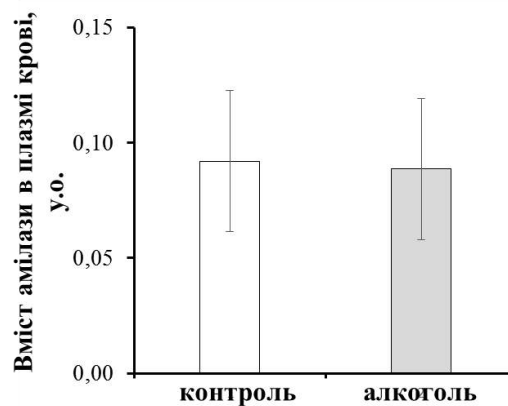


Рис. 3. 28. Вплив хронічного введення етанолу на тлі високожирової дієти на вміст амілази в плазмі крові тварин.

Виявлено, що у тварин, яким вводили етанол (незалежно від введення пірувату) загальний вміст амілази у ацинарних клітинах статистично вірогідно зростав (рис. 3.29 Б). Базальна секреція впродовж 30 хв була незначною, проте

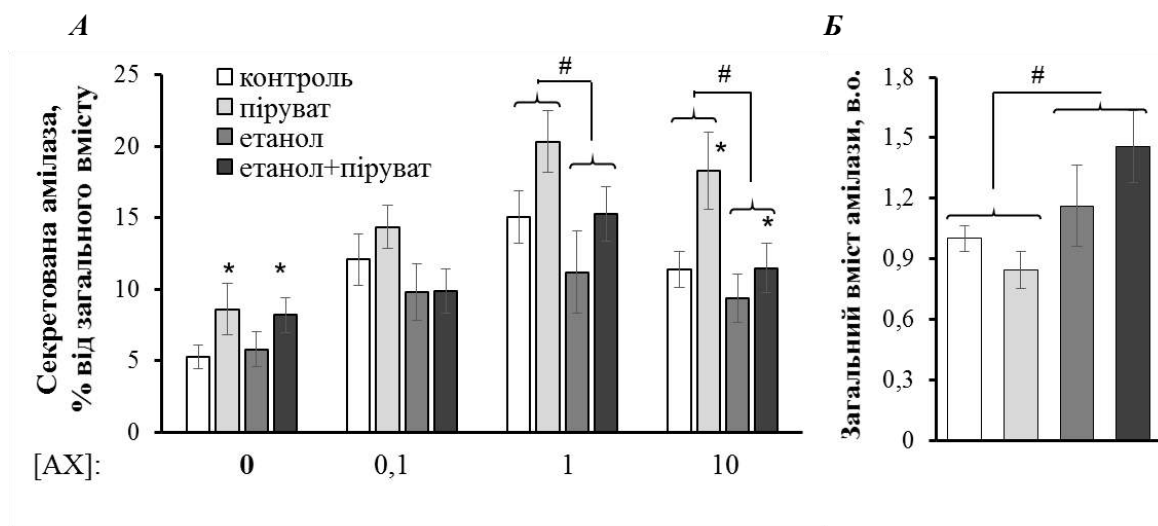


Рис. 3.29. Вплив етанолу та пірувату *in vivo* на секреторну активність ацинарних клітин підшлункової залози: * – статистично вірогідний вплив введення пірувату або статистично вірогідна різниця за ANOVA та post-hoc тестом Голма-Борферроні порівняно з контролем, $P < 0,05$; # – статистично вірогідний вплив введення пірувату, згідно ANOVA, $P < 0,05$ $n = 7-8$.

зростала у тварин, яким вводили піруват. Найбільшу стимуляцію секреції спричиняв ацетилхолін у концентрації 1 мкмоль/л. Введення етанолу пригнічувало стимульовану ацетилхоліном (1 та 10 мкмоль/л) секрецію, а введення пірувату, навпаки, збільшувало секреторну відповідь на 10 мкмоль/л ацетилхоліну (рис. 3. 29 А).

Функціональну активність ізольованих ацинусів було оцінено за секрецією амілази ізольованими ацинусами підшлункової залози. Секрецію стимулювали ацетилхоліном (0,1, 1 та 10 мкмоль/л, рис. 3.29 А).

Додатково ми досліджували морфологічний стан ацинарних клітин підшлункової залози за допомогою електронної мікроскопії (див. розділ 2.8.).

Видимих змін компонентів клітини не спостерігали, окрім зменшення щільності ЕПР у групі тварин, яким вводили етанол. У контролі такого патологічного процесу не спостерігали (рис. 3. 30). Отриманий ефект етанолу узгоджуються з даними інших авторів [201].

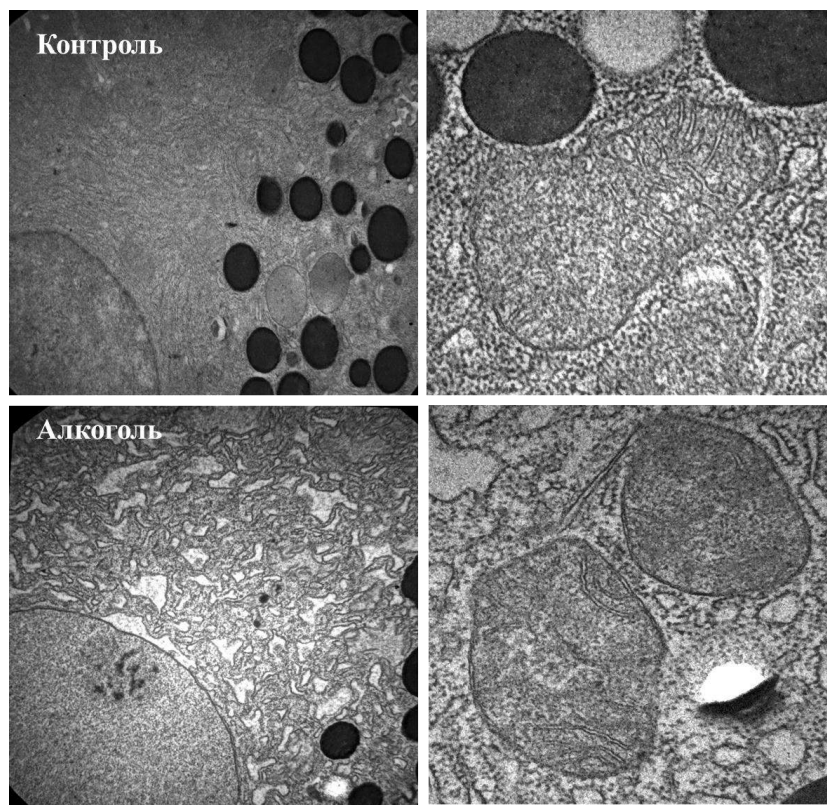


Рис. 3. 30. Електронно-мікроскопічна фотографії ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози отриманих у хронічній серії дослідів за введення етанолу на тлі високожирової дієти.

Дослідження мітохондріального окиснення ми проводили за двох умов: наявності лише глюкози (підтримка гліколізу та середнє залучення окисного фосфорилування) або додаткової наявності мітохондріальних субстратів глютаміну та пірувату для максимального прояву адапційного потенціалу мітохондрій. Хронічне введення етанолу та пірувату не впливало на базальне дихання ацинарних клітин ні за окиснення глюкози, ні суміші глюкози, глютаміну та пірувату і становило $0,21 \pm 0,01$ та $0,22 \pm 0,01$ нмоль $O_2 / c \times$ млн. клітин відповідно (рис. 3.31 А). Введення етанолу чи пірувату також не впливало на базальну швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози.

Для оцінки адапційної здатності мітохондрій панкреатичних ацинусів використали показники максимальної швидкості дихання, що реєстрували за дії протонофору FCCP.

Встановлено, що FCCP-стимульована швидкість дихання була значно вищою за наявності у середовищі пірувату та глютаміну у всіх дослідних групах (рис. 3.31 Б). Хронічне введення етанолу статистично вірогідно підвищувало FCCP-стимульоване дихання за окиснення глюкози і становило $2,0 \pm 0,1$ нмоль O_2 / с \times млн. клітин порівняно з контролем $1,6 \pm 0,1$ нмоль O_2 / с \times млн. клітин. Однак цей ефект етанолу був відсутнім у групі тварин, яким також вводили піруват (рис. 3.31 Б). Введення етанолу чи пірувату статистично вірогідно не впливало на роз'єднане дихання за окиснення глюкози, глютаміну та пірувату.

Для дослідження спряження між диханням та окисним фосфорилуванням використовували олігоміцин. Виявилось, що хронічне введення розчину етанолу статистично вірогідно підвищувало олігоміцин-нечутливе дихання ацинарних клітин підшлункової залози і становило $0,67 \pm 0,06$ в.о. за окиснення глюкози та $0,61 \pm 0,03$ в.о. за окиснення суміші глюкози + пірувату + глютаміну. Це, очевидно, свідчить про порушення функціонування мітохондрій та зменшення їх АТФ-синтетичної здатності (рис. 3.31 В). Введення пірувату повністю нівелювало негативний вплив етанолу та зменшило олігоміцин-нечутливе дихання ацинарних клітин підшлункової залози $0,43 \pm 0,04$ в.о. за окиснення глюкози та $0,44 \pm 0,04$ в.о. для суміші субстратів (рис. 3.31 В).

Так, як у попередніх дослідженнях було встановлено, що швидкість дихання залежить від мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози (див. розділ 3.1 та 3.3). Тому, у цьому експерименті ми теж досліджували мембранний потенціал мітохондрій. Виявилось, що у тварин, яким вводили етанол, знижувалась концентрація FCCP, необхідна для зниження мітохондріального мембранного потенціалу на 59% (IC50) – за окиснення глюкози, глютаміну та пірувату (рис. 3.31 Г). Цей ефект не було

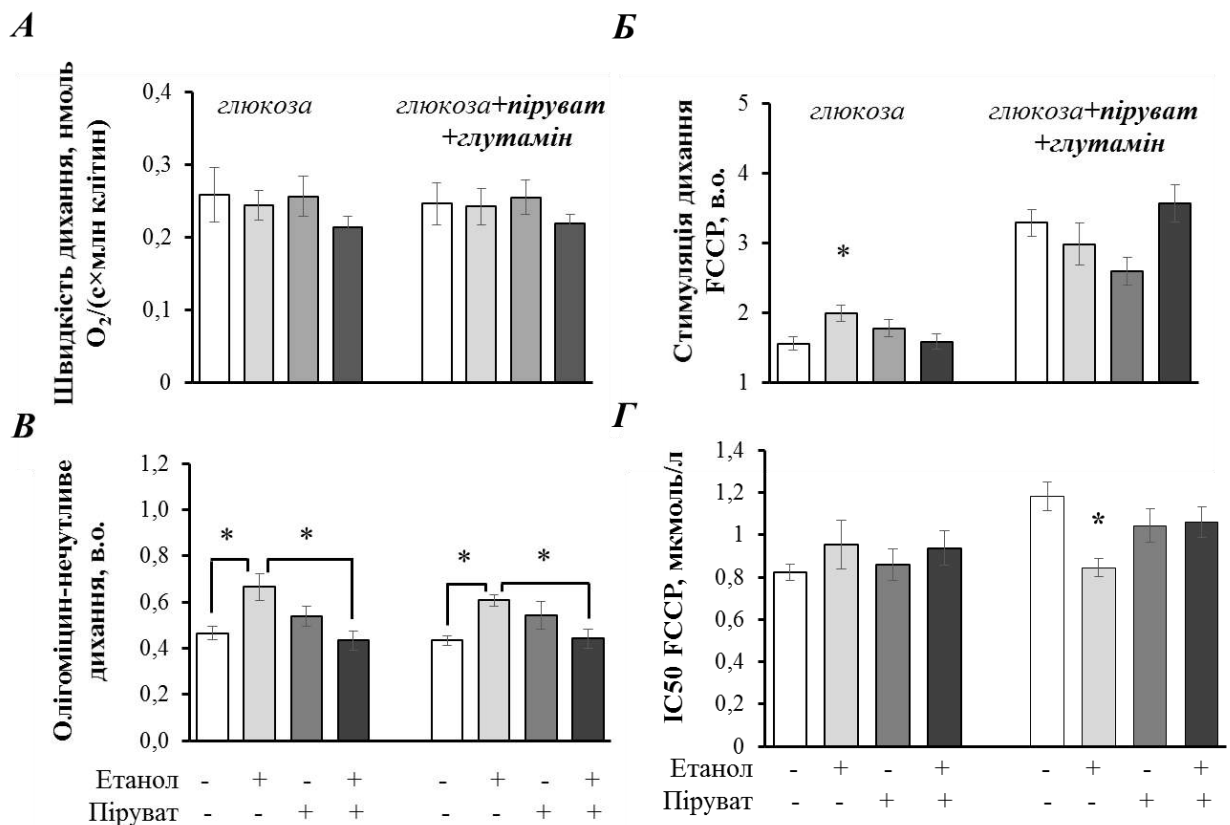


Рис. 3.31. Вплив етанолу та пірувату *in vivo* на дихання та на мітохондріальний мембранний потенціал ацинарних клітин підшлункової залози: [глюкоза]=10 ммоль/л, [піруват], [глутамін] = 2 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця щодо контролю за ANOVA та *post-hoc* тестом Голма-Борферроні; $P < 0,05$; $n = 7-8$.

виявлено, якщо тваринам вводили також піруват. За окиснення лише глюкози IC50 було загалом нижчим у всіх групах тварин і не змінювалось під впливом етанолу чи пірувату (рис. 3.31 Г).

Отже, введення пірувату нівелює негативний вплив хронічного введення етанолу щурам на функціонування мітохондрій. Позитивний вплив пірувату підтверджується і для інших моделей гострого панкреатиту, а саме аспарагін-індукованого некрозу ацинарних клітин підшлункової залози [162].

Очевидно, що внесення достатньої кількості субстратів окиснення потенційно може генерувати додаткову кількість молекул АТФ, що забезпечить стійкість мітохондрій та клітин в цілому до дії патогенних чинників. Це припущення підтверджують й отримані нами дані максимальної швидкості дихання, які були вищими за окиснення суміші субстратів

(глюкози+пірувату+глутаміну), а не за окиснення лише глюкози. Роботи інших авторів повідомляють, що внесення внутрішньоклітинних добавок АТФ нівелювали згубний вплив етилових ефірів жирних кислот на ізольовані ацинарні клітини підшлункової залози. За рахунок додаткової концентрації АТФ у клітинах залишалися активними АТФ-залежні Ca^{2+} -помпи, що зменшували $[\text{Ca}^{2+}]_v$ у цитозолі і підтримували кальцієвий гомеостаз [44; 147; 24]. Тому, можливо, піруват слугує найкращим джерелом енергії для ацинарних клітин підшлункової залози та нівелює негативний вплив хронічного введення етанолу на ацинарні клітини підшлункової залози.

Підсумок. Хронічне введення етанолу щурам негативно впливає на функціонування мітохондрій, секреторну відповідь та життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози, а введення пірувату нівелює цей вплив. Тому, очевидно, піруват підвищує адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів за дії етанолу на тлі високожирової дієти *in vivo*. Отже, дослідження роз'єднанного дихання є чутливим інструментом для оцінки адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози не лише за патології, а й при корекції захворювань.

1. Манько В.В., Манько Б.О., Сідорова О., Мазур Г.М., Манько Б.В. Алкоголь за хронічного введення на тлі високо жирної дієти порушує мітохондріальні 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.
2. 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.

3. 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.

4. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

У цій дисертаційній роботі описано та охарактеризовано нові підходи для визначення адаптаційної здатності мітохондрій. На основі отриманих результатів та даних літератури запропонована схема впливу різних функціональних станів: спокою, за активації секреції та за впливу патологічних факторів (рис. 4.32). Описана типова реакція на одноразове внесення FCCP до суспензії ацинусів характеризується:

- 1) прискоренням дихання,
- 2) пік швидкості дихання
- 3) сповільнення дихання.

Після титрування за допомогою кількох концентрацій FCCP отримано два інших параметри – максимальну швидкість роз'єданого дихання та оптимальну концентрацію протонофора. Крім того, в поєднанні з напівкількісним вимірюванням мембранного потенціалу мітохондрій можна отримати коефіцієнти еластичності для швидкості дихання. З'ясувалося, що отримані нові параметри залежать від зміни субстратного забезпечення та від функціонального стану клітини.

Так, прискорення дихання потенційно може оцінити наскільки швидко окислювальні системи мітохондрій можуть пристосуватись до деполяризації мембрани мітохондрій. Для ацинарних клітин підшлункової залози було встановлено, що найшвидший показник прискорення дихання зареєстровано за окислення диметил- α -кетоглутарату.

На прикінці фази прискорення дихання можна спостерігати пік швидкості дихання, за умов, що не розвивається значне сповільнення дихання від часу. В ацинарних клітинах підшлункової залози лише глютамін та диметила- α -кетоглутарат здатні підтримувати стаціонарний дихальний стан за дії високої концентрація FCCP (1,5 мкмоль/л).

Є декілька причин розвитку сповільнення дихання – зміни рН цитоплазми, внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} та кількості АТФ.

Очевидно, що зміна цитозольного рН, не відіграє важливої ролі у сповільненні дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози, адже за дії FCCP у концентрації 0,5 та 1,5 мкмоль/л не спостерігали сповільнення дихання за окиснення глутаміну та диметил- α -кетоглутарату. Відомо, що рівень АТФ у клітині, за умов дефіциту окисного фосфорилування, підтримується гліколізом [199]. Таким чином, швидкість сповільнення не залежить від рівня цитозольного АТФ, адже за окиснення пірувату та глюкози сповільнення дихання ізольованих панкреатичних ацинусів було подібним. Встановлено, що показники сповільнення дихання були найвищими для наступних субстратів: малату та ізоцитрату. Це може бути пов'язано з обмеженою проникністю плазматичної мембрани ацинарних клітин підшлункової залози.

Сповільнення дихання, очевидно, викликане сильною деполяризацією мембрани мітохондрій, а не повільною втратою потенціалу мембрани. По-перше, потенціал мітохондріальної мембрани був відносно стабільним після початкового падіння після інкубації з FCCP, тобто мітохондрії перебували в стаціонарних метаболічних станах, коли відбувалося сповільнення дихання. По-друге, сповільнення дихання розвивалося в умовах, коли мембранний потенціал мітохондрій був близький до 0 (принаймні у випадках глюкози та монометилсукцинату на 1,5 мкМ FCCP). У інших випадках, коли мембранний потенціал все ще підтримувався на певному рівні (навіть при 2 мкмоль/л FCCP за окислення суміші субстратів глюкози, пірувату та глутаміну), ми не спостерігали значного сповільнення дихання у панкреатичних ацинусах. Таким чином, ми можемо зробити висновок, що недостатня здатність клітин транспортувати та / або окислювати субстрати, щоб мати можливість відповідати на дію протонофора, викликає повне розсіювання потенціалу мембрани, що є загальною причиною сповільнення дихання, яке залежить від часу. Молекулярні механізми цих процесів ще не з'ясовані.

Оптимальна концентрація протонофору, отримана після титрування за допомогою кількох концентрацій FCCP, є інтегративним параметром, який визначається максимальною швидкістю роз'єданого диханням та сильно

варіюється в залежності від субстрату окиснення. А “максимальна” частота дихання ацинарних клітин підшлункової залози, не пов’язана з FCCP та була різною для кожного субстрату або комбінації, і додатково підсилювалася ацетилхоліном або холецистокініном за окиснення пірувату та інсуліном за окиснення глюкози.

На основі отриманих даних, можна стверджувати, що максимальна швидкість роз’єданого дихання відображає здатність клітин до метаболізму субстратів у відповідь на дію протонофору, а не є абсолютною максимальною ємністю електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, як це вважалося раніше.

Тому, важливо не просто досліджувати максимальну окисну здатність за використання протонофору. Адже, такий спосіб, не враховує залежності максимальної окисної здатності мітохондрій від концентрації і тривалості дії протонофору та динаміки зниження швидкості FCCP-стимульованого дихання, яке спостерігається у другій фазі дії протонофору – після досягнення максимальної швидкості дихання.

Залежне від часу сповільнення роз’єданого дихання не обмежується лише моделлю інтактних клітин, це також було продемонстровано для ізольованих мітохондрій підшлункової залози за окиснення сукцинату [147] та для ізольованих мітохондрій печінки щурів лише тоді, коли був присутній α -кетоглутарат [114], але не у випадку окиснення інших субстратів.

Також той факт, що оптимальна концентрація протонофору може сильно змінюватися залежно від складу субстрату та фізіологічного стану, означає, що для кожного субстрату слід проводити новий експеримент з титрування, яким в даний час нехтують у багатьох дослідженнях. У цій роботі мінімальна досліджувальна концентрація FCCP становила 0,5 мкмоль/л та виявилася "оптимальною" для ряду субстратів, але насправді вона, ймовірно, набагато нижча. Тому, оцінка вище описаних параметрів дає ширше уявлення про адаптаційну здатність мітохондрій і вони є корисними для оцінки функції чи дисфункції мітохондрій у цілісних клітинах.

Також зареєстровано, що зміни функціонального стану клітини, а саме фізіологічна стимуляція секреції впливають на параметри адаптаційної здатності.

Цікаво, що вже базальна швидкість дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози під впливом ацетилхоліну і холецистокініну статистично достовірно збільшилася за окиснення глюкози, суміші глюкози і глютаміну чи, найсуттєвіше, глюкози і пірувату. Але, парадоксально, за наявності суміші глюкози і α -кетоглутарату (субстрат Ca^{2+} -залежного фермента) статистично вірогідні зміни під впливом агоністів не були зареєстровані.

Очевидно, що немає потреб підтримувати високий рівень окисного фосфорилування у мітохондріях постійно, коли, зокрема, ацинарні клітини перебувають у стані фізіологічного спокою. Але із переходом клітин у активний стан енергопродукція повинна зростати паралельно енерговитратам. Це підтверджено іншими авторами: стимуляція ацинарних клітин підшлункової залози холецистокініном спричиняє дозозалежну, але нетривалу деполяризацію мітохондрій [197]. Одночасно холецистокініну та ацетилхолін індукує стійке збільшення рівня АТФ у цитозолі, яке усувається інгібіторами електрон-транспортного ланцюга мітохондрій [199]. Зростає також і швидкість дихання за стимуляції первинними агоністами, як це було показано для аналога іншого первинного агоніста цих клітин – карбахоліну [140]. В інших клітинах також відомі факти підвищення максимальної швидкості FCCP-стимульованого дихання із зміною функціонального стану. Так, під час диференціації наївних Т-клітин у Т-клітини пам'яті ця швидкість суттєво зростає, що підвищує виживання цих клітин та може забезпечити швидке реагування на подразник [79].

Ацетилхолін та холецистокінін не просто стимулюють дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення пірувату (рис. 4.32), а збільшують величину адаптаційної здатності мітохондрій, і це лежить в основі реалізації випереджувального зв'язку в узгодженості енерговитрат і енергопродукції цих клітин. Визначальною подією у збільшенні адаптаційної

здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози є активація піруватдегідрогеназного комплексу.

Згідно з отриманими результатами інсулін нівелював холецистокінін-стимульоване дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення пірувату. Механізм такого інгібування не відомий. Ми припускаємо, що можливо інсулін впливає на передачу сигналу від рецепторів холецистокініну. Відомо, що інсулін впливає на активність Ca^{2+} -АТФази плазматичної мембрани ацинарних клітин підшлункової залози, проте лише опосередковано через зміну цитозольної концентрації АТФ. Дані доводять, що інсулін може змінювати спорідненість та здатність різних холецистокінінових рецепторів до холецистокініну в ацинарних клітинах підшлункової залози [155]. Альтернативна гіпотеза полягає в тому, що можливо інсулін здійснює безпосередній вплив на метаболізм клітин. Відомо, що інсулін спричиняє збільшення продукції гліколітичного НАДН у ацинарних клітинах підшлункової залози [138]. Проте, інсулін безпосередньо не пригнічує піруватдегідрогеназний комплекс у клітинах підшлункової залози. Адже, цей гормон за окиснення пірувату не впливав на швидкість дихання, коли холецистокінін був відсутній у середовищі інкубації. Більше того, в інших тканинах (печінці та жировій тканині) інсулін навпаки має позитивний вплив на піруватдегідрогеназу [158; 51]. Клот та колеги [41] показали, що максимальна активність піруватдегідрогенази в ізольованих клітинах печінки була досягнута через 10 хв дії інсуліну і зберігалася принаймні протягом 45 хвилин, що відповідає нашим експериментальним установкам.

Також виявлено зміни величини адаптаційної здатності мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за дії патологічних чинників (рис. 4.32). Так, етанол та холецистокінін *in vitro* та за одноразового введення тваринам (*in vivo*) знижують здатність мітохондрій панкреатичних ацинусів відповідати на високі навантаження протонофором. Додатково ми вимірювали й інші мітохондріальні показники та виявили, що вони корелюють зі змінами адаптаційної здатності. Було встановлено, що за дії етанолу та холецистокініну

in vitro спостерігали зниження мембранного потенціалу мітохондрій та автофлуоресценції НАДН, а також зниження секреторної відповідь та збільшення кількості блеб утворених на плазматичній мембрані та некроз клітин. Ефект етанолу та холецистокініну 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 холецистокініну *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. У цій серії досліджень зареєстровано зміни адаптаційної здатності мітохондрій за дії етанолу, але не спостерігали підвищення рівня амілази в плазмі крові, що свідчить про відсутність розвитку гострого панкреатиту та ушкодження підшлункової залози.

Результати цієї роботи показують, що відсутність достатньої кількості субстрату *in vitro* робить ацинарні клітини підшлункової залози сприйнятливими до розвитку некрозу за умов дії патологічних факторів, проте цей ефект не відтворюється у досліді *in vivo*. Такі ефекти, найімовірніше, є оборотними *in vivo*, але ми припускаємо, що накопичення пошкоджень мітохондрій та їх біоенергетики шляхом хронічного зловживання етанолом, особливо при стимуляції секреції панкреатичного соку, призведе до розвитку панкреатиту.

Патологічний ефект на адаптаційну здатність етанолу у поєднанні з іншими факторами *in vitro* та *in vivo* спостерігався вже за середньої дози етанолу (20-25 ммоль/л), на відміну від більшості досліджень. Так, до прикладу у інших авторів, етанол *in vitro* також спричиняє зміни мітохондріальних функцій [180], Ca^{2+} -сигналізації [174, 47], вироблення активних форм кисню у [82] ацинарних клітин підшлункової залози, але в

концентраціях 50-100 ммоль/л, що рідко спостерігається в крові пацієнтів і зазвичай асоціюється з ризиком зупинки дихання та смерті.

А пацієнти з алкогольним панкреатитом, вживали помірну кількість алкоголю і його концентрація в плазмі крові становила менше 50 ммоль/л [148], тоді як вживання алкогольних напоїв не обов'язково є причиною розвитку панкреатиту [148].

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 глютаміну, запобігають некрозу ацинарних клітин підшлункової залози, що був спричинений холецистокініном та етанолом *in vitro*. Піруват підтримує холецистокінін-стимульовану швидкість дихання панкреатичних ацинусів, але, на диво, не впливає ні на роз'єднану швидкість дихання, ні на деполяризацію мітохондрій, спричинену поєднанням холецистокініну та етанолу. Глутамін, навпаки, спричиняє зниження рівня НАДН, що запобігає деполяризації мітохондрій, спричинену холецистокініном та етанолом, але викликає зменшення швидкості максимального роз'єданого дихання за умов дії холецистокініну та етанолу. Також саме піруват, на відміну від глютаміну, підвищує адаптаційну здатність мітохондрій за стимулювання ацетилхоліном та холецистокініном.

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.

Отже, параметри оцінки адаптаційної здатності мітохондрій є інформативними та чутливими до змін функціонального стану клітин, що дають змогу краще вивчати процеси у цілісних живих клітинах та мітохондріях як у нормі, так і за патологій.

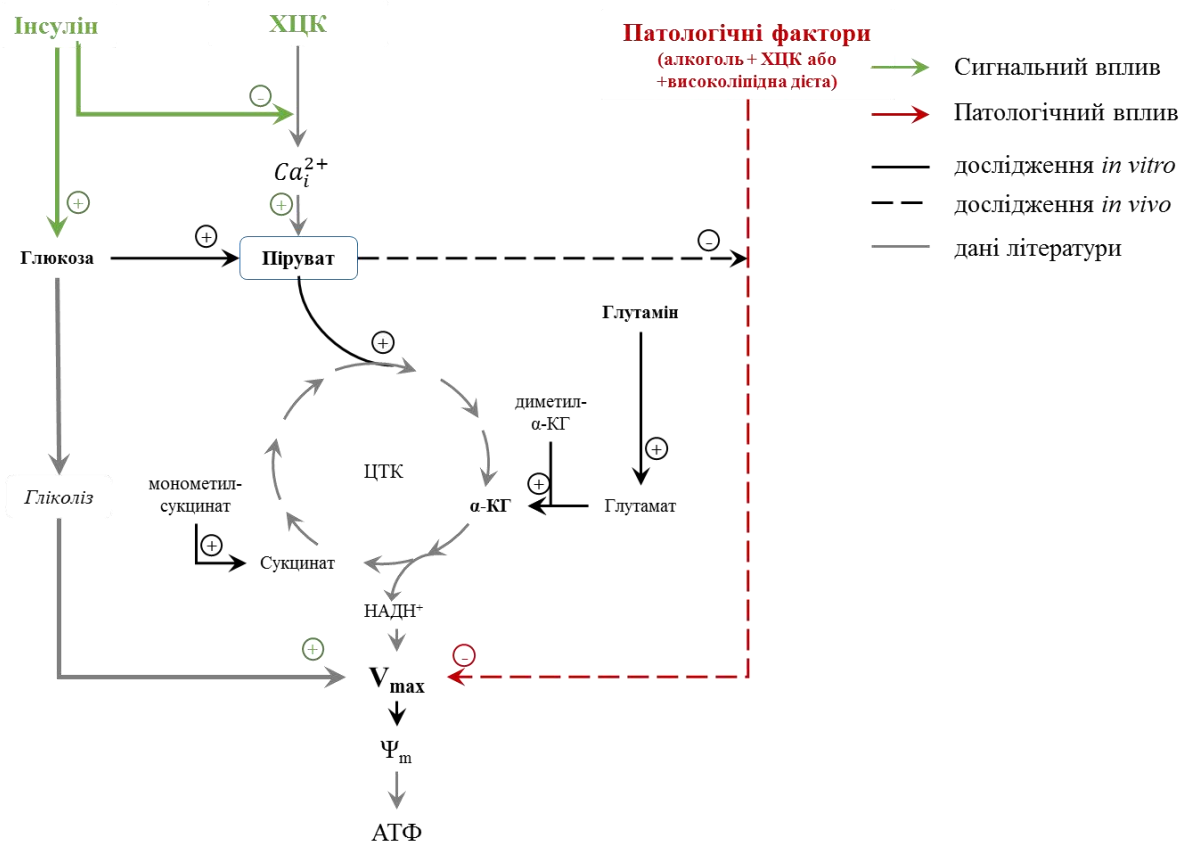


Рис. 4.32 Схема зміни швидкості дихання та мембранного потенціалу мітохондрій залежно від функціонального стану: ХЦК – холецистокінін, α-КГ – α-кетоглутарат; НАДН⁻ – нікотинамідаденіндинуклеотид; ЦТК – цикл трикарбонових кислот; V_{max} – максимальна швидкість дихання; Ψ_m – мембранний потенціал мітохондрій; АТФ – аденозинтрифосфат.

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, глютаміну 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 глютамін (незалежно від наявності інших субстратів);

автофлуоресценція НАДН збільшувалася – за окиснення глюкози або глюкози, глутаміну та пірувату і, водночас, збільшилась інтенсивність флуоресценції родаміну 123 – за окиснення глюкози або глюкози 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 ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

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.
2. Мерлавський В, Іккерт О, Манько В. Вплив Ca^{2+} на процеси дихання гепатоцитів за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету. *Вісн. Львів. ун-ту. Серія біол.* 2015;70:294–304.
3. Adler G, Kern HF, Pan GZ. Secretagogue-induced membrane alterations in dispersed acini from rat pancreas. *Eur J Cell Biol.* 1984;33:234–241.
4. Aguer C, Gambarotta D, Mailloux RJ, Moffat C, Dent R, McPherson R, Harper ME. Galactose enhances oxidative metabolism and reveals mitochondrial dysfunction in human primary muscle cells. *PLoS One.* 2011;6(12):1–11.
5. Akerman KEO, Wikstrom MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 1976;68:191–197.
6. Apte MV, Wilson JS, Korsten MA, McCaughan GW, Haber PS, Pirola RC. Effects of ethanol and protein deficiency on pancreatic digestive and lysosomal enzymes. *Gut.* 1995;36:287–293.
7. Apte MV, Wilson JS, McCaughan GW, Korsten MA, Haber PS, Norton ID, Pirola RC. Ethanol-induced alterations in messenger RNA levels correlate with glandular content of pancreatic enzymes. *J Lab Clin Med.* 1995;125:634–640.
8. Araya S, Kuster E, Gluch D, Mariotta L, Lutz C, Reding TV, Graf R, Verrey F, and Camargo SMR. Exocrine pancreas glutamate secretion help to sustain enterocyte nutritional needs under protein restriction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018; 314:517–536.
9. Arnold S, Goglia F, Kadenbach B. 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-*c* oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur. J. Biochem.* 1998; 252:325–330.
10. Arutla M, Raghunath M, Deepika G, Jakkampudi A, Murthy HVV, Rao GV, Reddy DN, Talukdar R. Efficacy of enteral glutamine supplementation in

- patients with severe and predicted severe acute pancreatitis — A randomized controlled trial. *Indian Journal of Gastroenterology*. 2019.
11. Assreuy J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. *Endocr. Metab. Immune Disord Drug Targets*. 2006;6:165–173.
 12. Baggaley E, Elliott A, Bruce J. Oxidant induced inhibition of the plasma membrane Ca^{2+} ATPase in pancreatic acinar cells: role of the mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(5):1247–1260.
 13. Balaban R. S. Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol*. 1990; 258 (3 Pt 1):377–389.
 14. Balázs Kui B, Balla Z, Végh TE, Pallagi P, Venglovecz V, Iványi B, Takács T, Hegyi P, Rakonczay Z Jr. Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. *Laboratory Investigation*. 2014;94:138–149.
 15. Barreto SG, Woods CM, Carati CJ, Schloithe AC., Jaya SR., Toouli J, Saccone GT. Galanin inhibits caerulein-stimulated pancreatic amylase secretion via cholinergic nerves and insulin. *Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol*. 2009; 297:333–339.
 16. Barrow SL, Voronina SG, da Silva Xavier G, Chvanov MA., Longbottom RE., Gerasimenko OV., Petersen OH., Rutter GA., Tepikin AV. ATP depletion inhibits Ca^{2+} release, influx and extrusion in pancreatic acinar cells but not pathological Ca^{2+} responses induced by bile. *Pflugers Arch*. 2008;455:1025–1039.
 17. Bartosiewicz D, Krasowska A. Inhibitors of ABC transporters and biophysical methods to study their activity. *Z. Naturforsch. C*. 2009;64:454–458.
 18. Bauduin H, Colin M, Dumont JE. Energy sources for protein synthesis and enzymatic secretion in rat pancreas *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*. 1969;174: 722–733.
 19. Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27, 2004;198–219.

20. Bereiter-Hahn J. Behaviour of mitochondria in the living cell. *Int Rev Cytol.* 1990;122:1–63.
21. Berry SM, Fink AS. Exogenous insulin does not influence CCK- and meal-stimulated pancreatic secretion. *Pancreas.* 1996;12:345–350.
22. Biczko G, Vegh ET, Shalbueva N, Rakonczay Z, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mitochondrial Dysfunction, Through Impaired Autophagy, Leads to Endoplasmic Reticulum Stress, Deregulated Lipid Metabolism, and Pancreatitis in Animal Models. 2017;154 (3):689-703.
23. Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A., Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle.* 2013; Vol. 12(4):674–683.
24. Booth DM, Murphy JA., Mukherjee R, Awais M, Neoptolemos JP, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R, Criddle DN. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology.* 2011;140(7):2116–2125.
25. Borst P, Loos JA, Christ EJ, Slater EC. Uncoupling activity of long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 1962;62:509–518.
26. Bradford HF. Respiration in vitro of synaptosomes from mammalian cerebral cortex. *J. Neurochem.* 1969;16:675–684.
27. Brand MD, Chien LF, Diolez P. Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. *Biochem. J.* 1994;297:27–29.
28. Brand MD. Measurement of mitochondrial proton motive force. Oxford: IRL Press. 1995:39–62.
29. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 2011;435(2):297-312
30. Brookes PS. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Mitochondrion.* 2004;3:187–204

31. Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. Vol. P. :46–57.
32. Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev*. 2003; 83(2):581–632.
33. Burnham DB, Williams JA. Effects of high concentrations of secretagogues on the morphology and secretory activity of the pancreas: a role for microfilaments. *Cell Tissue Res*. 1982;222:201–212.
34. Cavallini G, Frulloni L, Bassi C, Gabbrielli A, Castoldi L, Costamagna G, De Rai P, Di Carlo V, Falconi M, Pezzilli R, Uomo G. Prospective multicentre survey on acute pancreatitis in Italy (ProInf-AISP): results on 1005 patients // *Dig Liver Dis*. 2004;36:205–211.
35. Cecchini G. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:77–109.
36. Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J. Biol. Chem*. 1955;217:383–393.
37. Cheng BQ, Liu CT, Li WJ, Fan W, Zhong N, Zhang Y, Jia X-Q, Zhang S-Z. Ethyl pyruvate improves survival and ameliorates distant organ injury in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas*. 2007;35:256–61.
38. Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem*. 2009; 109(4):1179–1191.
39. Chvanov M, Voronina S, Zhang X, Telnova S, Chard R, Ouyang Y, Armstrong J, Tanton H, Awais M, Latawiec D, Sutton R, Criddle DN., Tepikin AV. Knockout of the Mitochondrial Calcium Uniporter Strongly Suppresses Stimulus-Metabolism Coupling in Pancreatic Acinar Cells but Does Not Reduce Severity of Experimental Acute Pancreatitis. *Cells*. 2020; 9.
40. Clemens DL, Schneider KJ, Arkfeld CK, Grode JR., Wells M.A, Singh S. Alcoholic pancreatitis: New insights into the pathogenesis and treatment. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2016;7(1):48–58.

41. Clot J-P, Chantal B, de Galle'e B, Postel-Vinay M-C, Durand D, Desbuquois B. Effects of growth hormone on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat liver and in isolated hepatocytes: comparison with insulin. *Metabolism*. 1988; 37:1101–1106.
42. Conley KE, Amara CE, Jubrias SA, Marcinek DJ. Mitochondrial function, fibre types and ageing: new insights from human muscle *in vivo*. *Physiol*. 2007;92:333–339.
43. Criddle DN, Raraty MG, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101:10738–10743.
44. Criddle DN, Murphy J, Fistetto G, Barrow S, Tepikin AV, Neoptolemos JP. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of atp synthesis. *Gastroenterology* 2006;130:781–793.
45. Criddle DN, Gerasimenko J. V, Baumgartner H. K, Jaffar M., Voronina S., Sutton R., Petersen O. H., Gerasimenko O. V. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ*. 2007;14(7):1285–1294.
46. Criddle DN, Booth DM, Mukherjee R, McLaughlin E, Green GM, Sutton R, Petersen OH., Reeve JR Jr. Cholecystokinin-58 and cholecystokinin-8 exhibit similar actions on calcium signaling, zymogen secretion, and cell fate in murine pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297(6):1085–1092.
47. Criddle DN. The role of fat and alcohol in acute pancreatitis: A dangerous liaison. *Pancreatology*. 2015;15(4):6–12.
48. Cuzzocrea S. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in arthritis // *Curr. Pharm. Des*. 2006;12:3551–3570.
49. Danielsson A. Effects of glucose, insulin and glucagon on amylase secretion from incubated mouse pancreas. *Pflugers Arch*. 1974;348:333–342.

50. Deng X, Wang L, Elm MS, Gabazadeh D, Diorio GJ, Eagon PK, Whitcomb DC. Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Pathol.* 2005;166:93–106.
51. Denton RM, McCormack JG, Rutter GA, Burnett P, Edgell NJ, Moule SK, Diggle TA. The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex. *Adv. Enzyme Regul.* 1996;36:183–198.
52. Denton RM, McCormack JG. The calcium sensitive dehydrogenases of vertebrate mitochondria. 1986;7 (5–6):377–386.
53. Denton RM. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1787:1309–1316.
54. Deshpande RR, Heinzle E. On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnol. Lett.* 2004;26:763–767.
55. Dickerson R, Vehe K, Mullen J, Feurer I. Resting energy expenditure in patients with pancreatitis. *Crit Care Med.* 1991;19:484–490.
56. Dickson VK, Silvester JA, Fearnley IM, Leslie AG, Walker JE. On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase. *EMBO J.* 2006;25:2911–2918.
57. Diczfalusy MA, Bjorkhem I, Einarsson C, Hillebrant CG, Alexson SE. Characterization of enzymes involved in formation of ethyl esters of long-chain fatty acids in humans. *J Lipid Res.* 2001;42(7):1025-1032.
58. DiMagno MJ. Oktoberfest binge drinking and acute pancreatitis: is there really no relationship? *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9(11):920–922.
59. Dobsak P, Courdertot-Masuyer C, Zeller M, Vergely C, Laubriet A, Assem M, Eicher JC, Teyssier JR., Wolf JE, Rochette L. Antioxidative properties of pyruvate and protection of the ischemic rat heart during cardioplegia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34:651–9.

60. Doliba NM, Qin W, Vatamaniuk MZ, Buettger CW, Collins HW, Magnuson MA, Kaestner KH, Wilson DF, Carr RD, Matschinsky FM. Cholinergic regulation of fuel-induced hormone secretion and respiration of SUR1^{-/-} mouse islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(3):525–535.
61. Doruk N, Buyukakilli B, Atici S, Cinel I, Cinel L, Tamer L, Avlan D, Bilgin E, Oral U. The effect of preventive use of alanyl-glutamine on diaphragm muscle function in cecal ligation and puncture-induced sepsis model. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2005;29:36–43.
62. Dranka BP, Benavides GA, Diers AR, Giordano S, Zelickson BR, Reily C, Zou L, Chatham JC, Hill BG, Zhang J, Landar A, Darley-Usmar V.M. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(9):1621–1635.
63. Evans AM, Peers C, Wyatt CN, Kumar P, Hardie DG. Ion channel regulation by the LKB1-AMPK signalling pathway: the key to carotid body activation by hypoxia and metabolic homeostasis at the whole body level. *Adv Exp Med Biol.* 2012;758:81–90.
64. Fan BG, Andren-Sandberg A. I.v. hypertonic glucose stimulates the exocrine pancreas in rat. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30:40–44.
65. Faxen K, Salomonsson L, Adelroth P, Brzezinski P. Inhibition of proton pumping by zinc ions during specific reaction steps in cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta,* 2006;1757:388–394.
66. Ferrer R, Medrano J, Diego M, Calpena R, Graells L, Molto M, Perez T, Perez F, Salido G. Effect of exogenous insulin and glucagon on exocrine pancreatic secretion in rats in vivo. *Int J Pancreatol* 2000;28:67–75.
67. Fghani E. Introduction to pancreatic disease: chronic pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas.* 2015.
68. Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent. *J Intern Med.* 2007;261:349–362.

69. Forman NG, Wilson DF. Energetics and stoichiometry of oxidative phosphorylation from NADH to cytochrome c in isolated rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*;257 (21):12908–12915.
70. Forsmark ChE, Vege SS, Wilcox CM. Acute Pancreatitis. *N Engl J Med*. 2017;376(6):598–599.
71. Forster S, Thumser AE, Hood SR, Plant N. Characterization of Rhodamine-123 as a Tracer Dye for Use In *In vitro* Drug Transport Assays. *PLoS One*. 2012;7(3):1-9.
72. Frey TG, Mannella CA. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*. 2000;25:319–324.
73. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer*. 2006;6:521–534.
74. Fukushima D, Doi H, Fukushima K, Katsura K, Ogawa N, Sekiguchi S, Fujimori K, Sato A, Satomi S, Ishida K, Fukushima K. Glutamate exocrine dynamics augmented by plasma glutamine and the distribution of amino acid transporters of the rat pancreas. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(3):265-271.
75. Gao X, Wen X, Esser L, Quinn B, Yu L, Yu CA, Xia D. Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: A comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry*. 2003;42:9067–9080.
76. Garry DJ, Garry MG, Williams JA, Mahoney WC, Sorenson RL. Effects of islet hormones on amylase secretion and localization of somatostatin binding sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1989;256:897-904.
77. Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Rizzuto RR, Treiman M, Tepikin AV, Petersen OH. The distribution of the endoplasmic reticulum in living pancreatic acinar cells // *Cell Calcium*. 2002;32(5–6):261–268.
78. Gerencser AA, Neilson A, Choi SW, Edman U, Yadava N, Oh RJ, Ferrick DA, Nicholls DG, Brand MD. Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Anal. Chem*. 2009;81:6868–6878.

79. Gerritje JW, van der Windt, Everts B, Chang C-H, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, Pearce EJ, Pearce EL. Mitochondrial Respiratory Capacity Is a Critical Regulator of CD8+ T Cell Memory Development. *Immunity*. 2012;36(1):68–78.
80. Giorgio V., von Stockum S., Antoniel M., Fabbro A., Fogolari F., Forte M, Glick G. D, Petronilli V., Zoratti M., Szabó I., Lippe G., Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(15):5887–5892.
81. Goldacre MJ, Roberts SE. Hospital admission for acute pancreatitis in an English population, 1963-98: database study of incidence and mortality. *BMJ*. 2004;328:1466–1469
82. Gonza´lez A, Nu´n˜ez AM, Granados MP, Jose´ A, Pariente JA, Salido GM. Ethanol impairs CCK-8-evoked amylase secretion through Ca²⁺-mediated ROS generation in mouse pancreatic acinar cells. *Alcohol* 2006;38:51–57.
83. Gorelick FS, Jamieson JD. The pancreatic acinar cells: structure-function relationships. In: Johnson LR (Ed.). *Physiology of the gastrointestinal tract*, 3rd Ed. New York, Raven Press. 1994;1353–1376.
84. Gorelick FS, Thrower E. The acinar cell and early pancreatitis responses. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7:10–14.
85. Gorren AC, Mayer B. Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1770:432–445.
86. Greenbaum NL, Wilson DF. Role of intramitochondrial pH in the energetics and regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1058(2):113–120.
87. Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, Pandol SJ. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. *Gastroenterology*. 2002;122:106–118.
88. Hafner RP, Brand MD. Effect of protonmotive force on the relative proton stoichiometries of the mitochondrial proton pumps. *Biochem. J*. 1991;275:75–80.

89. Halangk W, Matthias R, Schild L, Meyer F, Schulz HU, Lippert H. Effect of supramaximal cerulein stimulation on mitochondrial energy metabolism in rat pancreas. *Pancreas*. 1998;16:88–95.
90. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:251–261.
91. Havala T, Shronts E, Cerra F. Nutritional support in acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin N Am*. 1989;18:525–542.
92. Helton WS, Jacobs DO, Bonner-Weir S, Bueno R, Smith RJ, Wilmore DW. Effects of glutamine-enriched parenteral nutrition on the exocrine pancreas // *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1990;14:344–352.
93. Hreniukh V, Manko B, Sidorova O, Babsky A. Maximal oxidative capacity of mitochondria in lymphoma NK/Ly with methyl esters of energetic substrates. *Animal Biology*. 2015;18:42–48.
94. Huang W, Cash N, Wen L, Szatmary P, Mukherjee R, Armstrong J, Chvanov M, Tepikin AV, Murphy MP, Sutton R, Criddle DN. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone in murine acute pancreatitis. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:1–13.
95. Huang W, Xiong JJ, Cheng CR, Szatmary P, Chvanov M, Criddle DN, Xia Q, Sutton R. Therapeutic potential of pyruvate in acute pancreatitis: In Vitro findings and a systematic review. *Pancreatology*. 2016;16(1):32.
96. Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, Varughese A, Lu G, Liu J, Ramzan R, Vogt S, Grossman LI, Doan JW, Marcus K, Lee I. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome *c* oxidase and cytochrome *c* in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *BBA - Bioenergetics*. 2012;1817(4):598–609.
97. Hynes J, Floyd S, Soini AE, O'Connor R, Papkovsky DB. Fluorescence-based cell viability screening assays using water-soluble oxygen probes. *J. Biomol. Screen*. 2003;8:264–272.
98. Iwabe C, Shiratori K, Shimizu K, Hayashi N. Role of endogenous insulin in pancreatic secretion in rats. *Pancreatology*. 2001;1:300–305.

99. Javed MA, Wen L, Awais M, Latawiec D, Huang W, Chvanov M, Schaller S, Bordet T, Michaud M, Pruss R, Tepikin A, Criddle D, Sutton R. TRO40303 Ameliorates Alcohol-Induced Pancreatitis Through Reduction of Fatty Acid Ethyl Ester-Induced Mitochondrial Injury and Necrotic Cell Death. *Pancreas*. 2018; 47: 18-24.
100. Jekabsons MB, Nicholls DG. *In situ* respiration and bioenergetic status of mitochondria in primary cerebellar granule neuronal cultures exposed continuously to glutamate. *J. Biol. Chem.* 2004;279:32989–33000.
101. Jezek P, Freisleben HJ. Fatty acid binding site of the mitochondrial uncoupling protein. Demonstration of its existence by epr spectroscopy of 5-doxyI-stearic acid. *FEBS Lett.* 1994;343:22–26.
102. Jin Q, Oroszn DE, Modriansky M, Garlid KD. Kinetics of electron transfer through the respiratory chain. *Biophys J.* 2002;83(4):1797-1808.
103. Jo S, Choi SH, Heo JS, Kim E-M, Min M-S, Choi D-W, Seo J-M, Chung J-C, Kim Y-II. Missing effect of glutamine supplementation on the surgical outcome after pancreaticoduodenectomy for periampullary tumors: a prospective, randomized, double-blind, controlled clinical trial. *World J Surg.* 2006;30: 1974–1982.
104. Johnson PR, Dolman NJ, Pope M, Vaillant C, Petersen OH, Tepikin AV, Erdemli Gl. Non-uniform distribution of mitochondria in pancreatic acinar cells. *Cell Tissue Res.* 2003;313:37–45.
105. Johnson-Cadwell LI, Jekabsons MB, Wang A, Polster BM, Nicholls DG. ‘Mild uncoupling’ does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress. *J. Neurochem.* 2007;101:1619–1631.
106. Jonckheere AI, Smeitink JA, Rodenburg RJ. Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35:211–225.

107. Juma LOM, Singh J, Pallot DJ, Salido GM, Adeghate E. Interactions of islet hormones with acetylcholine in the isolated rat pancreas. *Peptides* 1997a;18:1415–1422.
108. Juma LOM, Singh, J, Salido GM, Pariente JA, Tapia JA, Adeghate EA. Mechanism of interaction between islet hormones and cholecystokinin-octapeptide in isolated rat pancreatic segments and acinar cells. *Journal of Physiology*. 1997b;501:156–157.
109. Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* 1979;49:105–121.
110. Katz M, Carangelo R, Miller LJ, Gorelick F. Effect of ethanol on cholecystokinin-stimulated zymogen conversion in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol*. 1996;270:171–175.
111. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239–257.
112. Kim C, Kim K, Lee H, Song C, Ryu H, Hyun J. Potentiation of cholecystokinin and secretin-induced pancreatic exocrine secretion by endogenous insulin in humans. *Pancreas*. 1999;18:410–414.
113. Kirichenko A, Vygodina T, Mkrtchyan HM, Konstantinov A. Specific cation binding site in mammalian cytochrome oxidase. *FEBS Lett*. 1998;423:329–333.
114. Kondrashova MN, Doliba NM. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine. *FEBS Lett*. 1989;243(2):153–155.
115. Kono H, Nakagami M, Rusyn I, Connor HD, Stefanovic B, Brenner DA, Mason RP, Arteel GE, Thurman RG. Development of an animal model of chronic alcohol-induced pancreatitis in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:1178–1186.

116. Korc M, Sankaran H, Wong KY, Williams JA, Goldfine ID. Insulin receptors in isolated mouse pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun.* 1978;84:293–299.
117. Korc M, Williams JA, Goldfine ID. Stimulation of the glucose transport system in isolated mouse pancreatic acini by cholecystokinin and analogues. *J Biol Chem.* 1979;254:7624–7629.
118. Kosowski H., Schild L., Kunz D., Halangk W. Energy metabolism in rat pancreatic acinar cells during anoxia and reoxygenation. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1367:118–126.
119. Kristiansen L, Grønbaek M, Becker U, Tolstrup JS. Risk of pancreatitis according to alcohol drinking habits: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008;168(8):932–937.
120. Kuznetsova SS, Azarkina NV, Vygodina TV, Siletsky SA, Konstantinov AA. Zinc ions as cytochrome *c* oxidase inhibitors: two sites of action. *Biochemistry (Mosc),* 2005;70:128–136.
121. Lacy PE, Cardeza AF, Wilson WD. Electron microscopy of the rat pancreas: effects of glucagon administration. *Diabetes* 1959;8:36–44.
122. Lampel M, Kern HF. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1977;373:97-117.
123. Lange LG, Sobel BE. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. *J Clin Invest.* 1983;72:724–731.
124. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *Lancet.* 2015;386 (9988):85–96.
125. Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science.* 1986; 231(4737):497–499.
126. Laposata M. Fatty acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake. *Prog Lipid Res.* 1998;37 (5):307–316.

127. Lee I, Salomon AR, Ficarro S, Mathes I, Lottspeich F, Grossman LI, Hüttemann M. cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome *c* oxidase activity. *J. Biol. Chem.* 2005;280:6094–6100.
128. Lee I, Kadenbach B. Palmitate decreases proton pumping of liver-type cytochrome *c* oxidase. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268:6329–6334.
129. Lee YL, Kwon HY, Park HS, Lee TH, Park HJ. The role of insulin in the interaction of secretin and cholecystokinin in exocrine secretion of the isolated perfused rat pancreas. *Pancreas.* 1996;12:58-63.
130. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997;185:1481–1486.
131. Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metab.* 2013;17(4):491–506
132. Lin MT, Kung SP, Yeh SL, Liaw KY, Wang MY, Kuo ML, Po-Houng Lee P-H, Chen W-J. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition attenuates plasma interleukin-6 in surgical patients with lower disease severity. *World J Gastroenterol.* 2005;11:6197–6201.
133. Liu X, Sun X-F, Ge Q-X. The role of glutamine supplemented total parenteral nutrition (TPN) in severe acute pancreatitis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2016;20:4176–4180.
134. Lu Z, Karne S, Kolodecik T, Gorelick FS. Alcohols enhance caerulein-induced zymogen activation in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;282:501–507.
135. Luan ZG, Zhang H, Ma XC, Zhang C, Guo RX. Role of high-mobility group box 1 protein in the pathogenesis of intestinal barrier injury in rats with severe acute pancreatitis. *Pancreas.* 2010;39:216–23.
136. Luo M, Bazargan N, Griffith DP, Estívariz CF, Leader LM, Easley KA, Daignault NM, Hao Li, Meddings JB, Galloway JR, Blumberg JB, Jones DP, Ziegler TR. Metabolic effects of enteral versus parenteral alanyl-glutamine

- dipeptide administration in critically ill patients receiving enteral feeding: a pilot study. *Clin Nutr.* 2008;27:297–306.
137. Lüthen RE, Niederau C, Ferrell LD, Grendell JH. Energy metabolism in mouse pancreas in response to different dosages of a CCK analogue. *Pancreas.* 1995;11:141–146.
138. Mankad P, James A, Siriwardena AK, Elliott AC, Bruce JIE. Insulin Protects Pancreatic Acinar Cells from Cytosolic Calcium Overload and Inhibition of Plasma Membrane Calcium Pump. *J Biol Chem.* 2012;287(3):1823–1836.
139. Man'ko BO, Man'ko VV. Influence of Ca^{2+} on kinetic parameters of pancreatic acinar mitochondria in situ respiration. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal.* 2013;85(4):48–60.
140. Manko BO, Manko VV. Mechanisms of respiration intensification of rat pancreatic acini upon carbachol-induced $\text{Ca}^{(2+)}$ release. *Acta Physiol (Oxf).* 2013;208(4):387–99.
141. Matozaki T, Williams JA. Multiple sources of 1,2-diacylglycerol in isolated rat pancreatic acini stimulated by cholecystokinin. *J. Biol. Chem.* 1989;264:14729–14734.
142. 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;91 (6):5–14.
143. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 1990;70:391–425.
144. Mills DA, Schmidt B, Hiser C, Westley E, Ferguson-Miller S. Membrane potential-controlled inhibition of cytochrome *c* oxidase by zinc. *J. Biol. Chem.* 2002;277:14894–14901.
145. Moncada S, Bolanos JP. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J. Neurochem.* 2006;97:1676–1689.
146. Mosztbacher D, Farkas N, Solymár M, Pár G, Bajor J, Szűcs Á, Czimmer J, Márta K, Mikó A, Rumbus Z, Varjú P, Hegyi P, Párniczky A. Restoration of

- energy level in the early phase of acute pediatric pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(6):957–963.
147. Mukherjee R, Mareninova OA, Odnokova IV, Huang W, Murphy J, Chvanov M, Javed MA, Wen L, Booth DM, Cane MC, Awais M, Gavillet B, Pruss RM, Schaller S, Molkentin JD, Tepikin AV, Petersen OH, Pandol SJ, Gukovsky I, Criddle DN, Gukovskaya AS, Sutton R. Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut.* 2016;65(8):1333–46.
148. Nissinen A, Laitinen M, Kakko S, Helander A, Savolainen MJ, Hörkö S. Low plasma antibodies specific for phosphatidylethanol in alcohol abusers and patients with alcoholic pancreatitis. *Addict Biol.* 2012;17(6):1057-67
149. Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med.* 2002;30:2022–2029.
150. Nuutinen EM, Nishiki K, Erecińska M, Wilson DF. Role of mitochondrial oxidative phosphorylation in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1982;243:159–169.
151. Oba M, Baldwin RL 4th, Bequette BJ. Oxidation of glucose, glutamate, and glutamine by isolated ovine enterocytes in vitro is decreased by the presence of other metabolic fuels. *J Anim Sci.* 2004;82:479–86.
152. Odnokova IV, Sung KF, Mareninova OA, Hermann K, Evtodienko Y, Andreyev A, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria. *Gut.* 2009;58(3):431–442.
153. O'Konski MS, Pandol SJ. Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. *J Clin Invest.* 1990;86:1649–1657.
154. Oliveira JM, Jekabsons MB, Chen S, Lin A, Rego AC, Goncalves J, Ellerby LM, Nicholls DG. Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: the bioenergetics of isolated and *in situ* mitochondria from transgenic mice. *J. Neurochem.* 2007;101:241–249.

155. Otsuki M, Williams JA. Direct Modulation of Pancreatic CCK Receptors and Enzyme Secretion by Insulin in Isolated Pancreatic Acini from Diabetic Rats. *Diabetes*. 1983;32(3):241–246.
156. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, Treskes M, van der Spoel HJ, Zandstra DF. Plasma glutamine depletion and patient outcome in acute ICU admissions. *Intensive Care Med*. 2001;27:84–90.
157. Pandol SJ, Periskic S, Gukovsky I, Zaninovic V, Jung Y, Zong Y, Solomon TE, Gukovskaya AS, Tsukamoto H. Ethanol diet increases the sensitivity of rats to pancreatitis induced by cholecystokinin octapeptide. *Gastroenterology*. 1999;117:706–716.
158. Parker JC., Jarett L. Insulin Mediator Stimulates Pyruvate Dehydrogenase of Intact Liver Mitochondria. *Diabetes*. 1985;34:92–97.
159. Patel R, Singh J, Yago MD, Vilchez JR., Martinez-Victoria E, Manas M. Effect of insulin on exocrine pancreatic secretion in healthy and diabetic anaesthetised rats. *Mol Cell Biochem*. 2004;261:105–110.
160. Pavlishko NM, Ryabinina OV, Zhilyakova TA, Sakharov IYu, Gerzhikova V G., Gonchar MV. Oxidase-Peroxidase Method of Ethanol Assay in Fermented Musts and Wine Products. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2005;41:604–609.
161. Peng S, Gerasimenko JV, Tsugorka T, Gryshchenko O, Samarasinghe S, Petersen OH, Gerasimenko OV. Calcium and adenosine triphosphate control of cellular pathology: asparaginase-induced pancreatitis elicited via protease-activated receptor 2. *Phil Trans Royal Soc B Biol Sci*. 2016;371:1–12.
162. Peng S, Gerasimenko JV, Tsugorka T. M., Gryshchenko O., Samarasinghe S., Petersen O. H., Gerasimenko O.V. Galactose protects against cell damage in mouse models of acute pancreatitis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(9):3769–3778.
163. Persichini T, Mazzone V, Polticelli F, Moreno S, Venturini G, Clementi E, Colasanti M. Mitochondrial type I nitric oxide synthase physically interacts with cytochrome *c* oxidase. *Neurosci. Lett*. 2005;384:254–259.

164. Ponnappa BC, Hoek JB, Waring AJ, Rubin E. Effect of ethanol on amylase secretion and cellular calcium homeostasis in pancreatic acini from normal and ethanol-fed rats. *Biochem Pharmacol.* 1987;36:69–79.
165. Ponnappa BC, Hoek JB, Jubinski L, Rubin E. Effect of chronic ethanol ingestion on pancreatic protein synthesis. *Biochem Pharmacol.* 1988; 966(3):390-402.
166. Porter R. K., Brand M. D. Mitochondrial proton conductance and H⁺/O ratio are independent of electron transport rate in isolated hepatocytes // *Biochem. J.* 1995. Vol. 310. P. 379–382.
167. Raraty M., Ward J., Erdemli G., Vaillant C., Neoptolemos J. P., Sutton R., Petersen O. H. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells // *Proc Natl Acad Sci.* 2000. Vol. 97(24). P. 13126–13131.
168. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;17:208–212
169. Rich P. Chemiosmotic coupling: the cost of living. *Nature.* 2003;421:583.
170. Rooman I, Lutz C, Pinho AV, Huggel K, Reding T, Lahoutte T, Verrey F, Graf R, Camargo SM. Amino acid transporters expression in acinar cells is changed during acute pancreatitis. *Pancreatology.* 2013;13(5):475-485.
171. Rouse R, Xu L, Stewart Sh, Zhang J. High fat diet and GLP-1 drugs induce pancreatic injury in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;276(2):104–114.
172. Rumsey WL, Wilson DF. Tissue capacity for mitochondrial oxidative phosphorylation and its adaptation to stress. *Comprehensive Physiology.* 2011;14:1095–1113.
173. Saito A, Williams JA, Kanno T. Potentiation by insulin of the acetylcholine-induced secretory response of the perfused rat pancreas. *Biomedical Research* 1980;1:101-103.
174. Samad A, James A, Wong J, Mankad P, Whitehouse J, Patel W, Alves-Simoes M, Siriwardena AK, Bruce JI. Insulin protects pancreatic acinar cells from palmitoleic acid-induced cellular injury. *J Biol Chem.* 2014;289:23582–23595.

175. Sans MD, Bruce JIE., Williamis JA. Regulation of Pancreatic Exocrine Function by Islet Hormones. Pancreapedia. 2020.
176. Sazanov LA, Hinchliffe P. Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *thermus thermophilus*. *Science*.2006;311:1430–1436.
177. Schild L, Matthias R, Stanarius A, Wolf G, Augustin W, Halangk W. Induction of permeability transition in pancreatic mitochondria by cerulein in rats. *Mol Cell Biochem*. 1999;195:191–197.
178. Schulz KF, Chalmers I, Hayes RJ, Altman DG. Empirical evidence of bias. Dimensions of methodological quality associated with estimates of treatment effects in controlled trials. *JAMA*. 1995;273(5):408–12.
179. Scott ID, Nicholls DG. Energy transduction in intact synaptosomes. Influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondria determined *in situ*. *Biochem. J*. 1980;186:21–33.
180. Shalbueva N, Mareninova OA, Gerloff A, Yuan J, Waldron RT, Pandol SJ, Gukovskaya AS. Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology*. 2013;144(2):437–446.
181. Shaw JHF, Wolfe RR. Glucose, fatty acid, and urea kinetics in patients with severe pancreatitis. The response to substrate infusion and total parenteral nutrition. *Ann Surg*. 1986;204:665–672.
182. Singleton KD, Wischmeyer PE. Glutamine’s protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;292:1839–1845.
183. Skulachev V. P. Mitochondrial filaments and clusters as power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci*. 2001;26:23–29.
184. Smith BW, Roe JH. A photometric method for the determination of alpha-amylase in blood and urine, with use of the starch-iodine color. *J Biol Chem*. 1949; 179 (1):53–59.
185. Steiner J, Rafols D, Park HK, Katar MS, Rafols JA, Petrov T. Attenuation of iNOS mRNA exacerbates hypoperfusion and upregulates endothelin-1

- expression in hippocampus and cortex after brain trauma. *Nitric Oxide*, 2004;10:162–169.
186. Stepp D. W. Impact of obesity and insulin resistance on vasomotor tone: nitric oxide and beyond. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006;33:407–414.
187. Stin MF, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Scheffer PG, Teerlink T, Twisk J. WR, Houdijk APJ, van Leeuwen PAM. Antioxidant enriched enteral nutrition and oxidative stress after major gastrointestinal tract surgery. *World J Gastroenterol.* 2008;14:6960–6969.
188. Tanton H, Voronina S, Evans A, Armstrong J, Sutton R, Criddle DN, Haynes L, Schmid MC, Campbell F, Costello E, Tepikin AV. F1F0-ATP Synthase Inhibitory Factor 1 in the Normal Pancreas and in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Effects on Bioenergetics Cells. Invasion and Proliferation. *Front Physiol.* 2018;9:833.
189. Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:11044–11048.
190. Thrower EC, Yuan J, Usmani A, Liu Y, Jones C, Minervini SN, Alexandre M, Pandol SJ, Guha S. A novel protein kinase D inhibitor attenuates early events of experimental pancreatitis in isolated rat acini. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300:120–129.
191. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100:328–341.
192. Tsukamoto H, Towner SJ., Yu GS, French SW. Potentiation of ethanol-induced pancreatic injury by dietary fat. Induction of chronic pancreatitis by alcohol in rats. *Am J Pathol.* 1988;131:246–257.
193. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science.* 1996;272:1136–1144.

194. Turkyilmaz S, Cekic AB, Usta A, Alhan E, Kural BV, Ercin C, Sağlam. Ethyl pyruvate treatment ameliorates pancreatic damage: evidence from a rat model of acute necrotizing pancreatitis. *Arch Med Sci.* 2019;232–239.
195. van Dijk DPJ, Horstman AMH, Smeets JSJ, den Dulk M, Grabsch HI., Dejong CHC, Rensen SS, Olde Damink SWM, van Loon LJC. Tumour-specific and organ-specific protein synthesis rates in patients with pancreatic cancer. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019;10:549–556.
196. Virolle M.-J, Morris VJ, Bibb MJ. A simple and reliable turbidimetric and kinetic assay for alpha-amylase that is readily applied to culture supernatants and cell extracts. *Journal of Industrial Microbiology.* 1990;5:295–301
197. Voronina SG., Barrow S. L., Gerasimenko O. V., Petersen O. H., Tepikin A. V. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating DeltaPsi_m. *J Biol Chem.* 2004;279 (26):27327 – 27338.
198. Voronina S., Sukhomlin T., Johnson P. R., Erdemli G., Petersen O. H., Tepikin A. Correlation of NADH and Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *J Physiol.* 2002;539 (Pt 1):P. 41–52.
199. Voronina SG, Barrow SL, Simpson AW. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 2010;138:1976–1987.
200. Werner J, Laposata M, Fernandez-del Castillo C, Saghir M, Iozzo RV, Lewandrowski KB, Warshaw AL. Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. *Gastroenterology.* 1997;113:286–294.
201. Werner J, Saghir M, Warshaw AL, Lewandrowski KB, Laposata M, Iozzo RV, Carter EA, Schatz RJ, Fernandez-Del Castillo C. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002;283:65–73.

202. Wiederkehr A, Park KS, Dupont O, Demaurex N, Pozzan T, Cline GW, Wollheim CB. Matrix alkalization: a novel mitochondrial signal for sustained pancreatic β -cell activation. *EMBO J*. 2009;28:417–428.
203. Williams HU, Pross M, Meyer F, Matthias R, Halangk W. Acinar cell respiration in experimental acute pancreatitis. *Shock*. 1995;3:184–188.
204. Williams JA, Korc M, Dormer RL. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol*. 1978;235:517–524.
205. Wu M, Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead S, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, Ferrick DA. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2007;292:125
206. Wyatt CN, Mustard KJ, Pearson SA, Dallas ML, Atkinson L, Kumar P, Peers C, Hardie DG, Evans AM. AMP-activated protein kinase mediates carotid body excitation by hypoxia. *J Biol Chem*. 2007;282:8092–8098.
207. Yang ZY, Ling Y, Yin T, Tao J, Xiong J-X, Wu H-S, Wang C-Y. Delayed ethyl pyruvate therapy attenuates experimental severe acute pancreatitis via reduced serum high mobility group box 1 levels in rats. *World J Gastroenterol*. 2008;14:4546–50.
208. Yao GX, Xue XB, Jiang ZM, Yang NF, Wilmore DW. Effects of perioperative parenteral glutamine-dipeptide supplementation on plasma endotoxin level, plasma endotoxin inactivation capacity and clinical outcome. *Clin Nutr*. 2005;24:510–515.
209. Yeh CL, Hsu C. S, Yeh SL, Chen W. J. Dietary glutamine supplementation modulates Th1/Th2 cytokine and interleukin-6 expressions in septic mice. *Cytokine*. 2005;31:329–34.
210. Yong L, Lu Q-P, Liu S-H, Hu F. Efficacy of glutamine-enriched nutrition support for patients with severe acute pancreatitis: a metaanalysis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2016;40:83–94.

211. Zarocostas J. Four in 100 deaths worldwide are caused by alcohol, says WHO. *Br Med J.* 2011;342.
212. Zerem E. Treatment of severe acute pancreatitis and its complication. *World J Gastroenterol.* 2014;20(38):13879–13892.
213. Zwicker K, Galkin A, Drose S, Grgic L, Kerscher S, Brandt U. The Redox-Bohr group associated with iron–sulfur cluster N2 of complex I. *J. Biol. Chem.* 2006;281:23013–23017.

ДОДАТОК А

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 B.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*

- 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 V. **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 мітохондріальні 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.