

АНОТАЦІЯ

Зуб А.М. Вплив амінокислот на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 091 «Біологія» (09 – Біологія). – Міністерство освіти і науки України. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2023.

Дисертація присвячена дослідженню впливу амінокислот на біоенергетичні процеси у ацинарних клітинах підшлункової залози щурів.

Ацинарні клітини підшлункової залози синтезують і виділяють в просвіт дванадцятипалої кишки ферменти, необхідні для перетравлення поживних речовин. Виробництво травних ензимів панкреатичними ацинусами залежить від транспорту амінокислот. Амінокислоти є будівельними блоками білків, клітинних структур і тканин, а також можуть діяти як регулятори білкового обміну та багатьох фізіологічних процесів. Не менш важливою є роль амінокислот як джерела енергії та метаболітів для забезпечення життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози.

Гострий панкреатит – це запальне захворювання підшлункової залози, яке пов'язане зі значною смертністю. Основними причинами гострого панкреатиту є вторинна обструкція протоки підшлункової залози жовчними каменями, алкоголь, ендоскопічна ретроградна холангіопанкреатографія та різні препарати, які запускають патологічні клітинні шляхи та дисфункцію органел, що завершується характерними ознаками гострого панкреатиту – загибеллю ацинарних клітин та місцевим і системним запаленням.

Важливе значення в патогенезі гострого панкреатиту має обмін амінокислот. З одного боку, амінокислотний склад сироватки різко змінюється у пацієнтів з гострим панкреатитом. З іншого боку, порушення транспорту або метаболізму амінокислот призводить до високої частоти гострого панкреатиту.

Харчова підтримка за гострого панкреатиту відіграє важливу роль у запобіганні недоїдання, корекції негативного балансу азоту та зниженні частоти інфекційних ускладнень і смертності. Вплив високоенергетичної дієти на одужання від гострого панкреатиту активно вивчається. Амінокислотні добавки, здається, є життєздатною стратегією постачання необхідної енергії та метаболітів ацинарним клітинам підшлункової залози для полегшення гострого панкреатиту.

Проте користь від введення амінокислот може бути переважена потенційними шкідливими ефектами. Так, було показано, що деякі амінокислоти у високих дозах є токсичними для підшлункової залози. Крім цього, гострий панкреатит може виникати як побічний ефект за лікування аспарагіназою, ферментом, який бере участь у перетворенні аспарагіну до аспарагінової кислоти. Механізми токсичного впливу амінокислот у ацинарних клітинах підшлункової залози повністю не вивчені, але пошкодження мітохондрій, ймовірно, є центральною подією за амінокислот-індукованого гострого панкреатиту.

Мітохондріальні шляхи метаболізму амінокислот описані у клітинах печінки, м'язів та інших тканин, проте мало вивчені у ацинарних клітин підшлункової залози.

Зважаючи на вищевказані аргументи, дослідження впливу амінокислот на біоенергетичні процеси ацинарних клітин підшлункової залози дозволить з'ясувати роль катаплерозу у функціонуванні цих клітин, покращити розуміння механізмів розвитку гострого панкреатиту, спричиненого надмірними дозами амінокислот та обґрунтувати вибір терапевтичних агентів для лікування гострого панкреатиту.

Метою нашої роботи було дослідити вплив амінокислот на мітохондріальні енергетичні процеси панкреатичних ацинусів.

У дисертаційній роботі досліджено вплив амінокислот у різних концентраціях на швидкість роз'єданого дихання мітохондрій панкреатичних

ацинусів. Встановлено, що глутамат, глутамін, аланін, лізин і аспарат збільшують швидкість FCCP-стимульованого дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. З'ясовано, що доступність глюкози як основного джерела енергії зменшує внесок лізину, аланіну та аспарату, але не глутамінової кислоти і глутаміну, у швидкість роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів. Позитивний вплив амінокислоти на роз'єдане дихання доводить принципову здатність мітохондрій окиснювати її в умовах експерименту, за наявності або відсутності глюкози як альтернативного джерела енергії. Однак це не доводить, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози віддають перевагу окисненню досліджуваних амінокислот у фізіологічних умовах.

Не знайдено достатніх доказів того, що аспарагін, аргінін або гістидин використовуються як джерело енергії мітохондріями ацинарних клітин підшлункової залози.

Досліджено вплив глутаміну на мітохондріальне дихання та життєздатність ацинарних клітин у нормі та за стимуляції секретагогами. Встановлено, що за стимуляції панкреатичних ацинусів холецистокініном (ХЦК) у концентрації 0,1 нмоль/л глутамін знижує швидкість роз'єданого окиснення. Внесення у середовище інкубації глутаміну, пірувату і глюкози разом з ХЦК у високій концентрації (10 нмоль/л) призводить до зменшення максимальної швидкості дихання. Показано, що глутамін не впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози за гіперстимуляції ХЦК.

Порівняно вплив глутаміну та аміаку на мітохондріальне окиснення у нормі та за впливу стимуляторів секреції. З'ясовано, що інкубація ізольованих панкреатичних ацинусів з NH_4Cl спричиняє негативний вплив на мітохондрії незалежно від стимуляції ацетилхоліном або ХЦК. Глутамін сприяє збільшенню максимальної швидкості дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози незалежно від ефекту секретагогів. Токсична кількість аміаку, необхідна для негативних наслідків, очевидно, не утворюється через окиснення глутаміну

у помірній концентрації (2 ммоль/л) на тлі глюкози, як за нормальних умов, так і за стимуляції ацинарних клітин ацетилхоліном або ХЦК.

З'ясовано вплив амінокислот у концентрації 20 ммоль/л на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози. Показано, що аланін і гістидин за інкубації впродовж 24 год не змінюють життєздатність панкреатичних ацинусів. Аланін може реалізувати захисний вплив через катаболізм до пірувату за допомогою аланін-трансамінази. Піруват посилює окиснювальну та АТФ-продуктивну здатність мітохондрій і захищає ацинарні клітини підшлункової залози від токсичних речовин.

Встановлено, що аспарагін, аспарагінова кислота і глутамінова кислота помірно збільшують кількість мертвих клітин. Аргінін і лізин за довготривалої інкубації мають значний негативний вплив на життєздатність панкреатичних ацинусів *in vitro*, спричиняючи некротичну загибель клітин.

Вперше описано, що глутамін у високій концентрації (20 ммоль/л) викликає блебінг та набряк ацинарних клітин і призводить до некрозу. Цікаво, що глутамат, прямий метаболіт глутаміну, не викликає таких шкідливих ефектів у ацинарних клітинах підшлункової залози. Відомо, що глутамін спонтанно розкладається в розчинах, утворюючи аміак. Ми припускаємо, що накопичення аміаку є основною причиною набряку та некрозу ацинарних клітин підшлункової залози, індукованого глутаміном у високій концентрації.

Було вивчено ефект субстрату окиснення натрій пірувату *in vivo* на рівень амінокислот у крові за L-аргінін-індукованого гострого панкреатиту у щурів.

Встановлено, що у підшлунковій залозі тварин з гострим панкреатитом, індукованим L-аргініном, незалежно від введення натрій пірувату, виявлено атипові клітини, що, ймовірно, є ознакою фіброзу. Ознак лейкоцитарної інфільтрації, некрозу, набряку чи крововиливу не виявлено, очевидно, через пізнє обстеження.

Досліджено, що у тварин з панкреатитом відбувається порушення ультраструктури клітин. Методом електронної мікроскопії було виявлено

мітохондрії з дегенерованими кристами, скупчення аутофагосом або неапікальну локалізацію зимогенних везикул, а також розпад цитоплазми та ядер деяких ацинарних клітин підшлункової залози.

Вперше зареєстровано, що піруват нормалізує рівень метіоніну, фенілаланіну, триптофану, глутаміну, аспартату, орнітину, серину і цистеїну у плазмі крові щурів з L-аргінін-індукованим гострим панкреатитом, але не впливає на морфологію підшлункової залози за гострого панкреатиту. Натрій піруват може сприяти нормалізації мітохондріальних процесів і відновленню клітинного рівня АТФ. За умов введення пірувату зникає дефіцит субстратів окиснення, що веде до зниження потреб клітини в катаболізмі амінокислот, як наслідок, це призводить до підвищення їхньої концентрації в крові. Механізм нормалізації рівня більшості незамінних амінокислот у плазмі крові за дії пірувату можна пояснити покращенням зовнішньосекреторної функції підшлункової залози і, як наслідок, інтенсифікації розщеплення білків в процесі травлення.

Отримані результати досліджень вказують на доцільність використання амінокислот та інших енергетичних субстратів для корекції мітохондріальної дисфункції за гострого панкреатиту.

Ключові слова: амінокислоти, органи і тканини щурів, панкреатичні ацинуси, мітохондріальне дихання, FCCP, АТФ, аміак, секретогоги, життєздатність, некроз, апоптоз, натрій піруват, гострий панкреатит.

SUMMARY

Zub A.M. The effect of amino acids on the energy processes of acinar cells of the pancreas. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a degree of Doctor of Philosophy 091 "Biology" (09 – Biology). – Ministry of Education and Science of Ukraine. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the influence of amino acids on bioenergetic processes in pancreatic acinar cells of rats.

Acinar cells of the pancreas synthesize and secrete into the lumen of the duodenum enzymes necessary for the digestion of nutrients. The production of digestive enzymes by pancreatic acini depends on the highly active transport of amino acids. Amino acids are the building blocks of proteins, cell structures and tissues, and can also act as regulators of protein metabolism and many physiological processes. Equally important is the role of amino acids as a source of energy and metabolites to ensure the viability of pancreatic acinar cells.

Acute pancreatitis is an inflammatory disease of the pancreas that is associated with frequent mortality. The main causes of acute pancreatitis are secondary obstruction of the pancreatic duct by gallstones, alcohol, endoscopic retrograde cholangiopancreatography, and various drugs that trigger pathological cellular pathways and organelle dysfunction, culminating in the characteristic signs of acute pancreatitis – the death of acinar cells and local and systemic inflammation.

The exchange of amino acids is of great importance in the pathogenesis of acute pancreatitis. On the one hand, the amino acid composition of serum changes dramatically in patients with acute pancreatitis. On the other hand, impaired transport or metabolism of amino acids leads to a high incidence of acute pancreatitis.

Nutritional support in acute pancreatitis plays an important role in preventing malnutrition, correcting negative nitrogen balance, and reducing the frequency of infectious complications and mortality. The effect of a high-energy diet on recovery

from acute pancreatitis is being actively studied. Amino acid supplementation appears to be a viable strategy to supply the necessary energy and metabolites to pancreatic acinar cells and alleviate acute pancreatitis.

However, the benefits of amino acid supplementation may be outweighed by potential harmful effects. Certain amino acids have been shown to be toxic to the pancreas at high doses. Acute pancreatitis can occur as a side effect of treatment with asparaginase, an enzyme involved in the conversion of asparagine to aspartic acid. The mechanisms of action of toxic amino acids in pancreatic acinar cells are not fully understood, but mitochondrial damage is likely to be a central event in amino acid-induced acute pancreatitis.

Mitochondrial pathways of amino acid metabolism have been described in liver cells, muscles, and other tissues, but little has been elucidated in pancreatic acinar cells.

Taking into account the above arguments, the study of the effect of amino acids on the bioenergetic processes of pancreatic acinar cells will allow us to clarify the role of cataplerosis in the functioning of these cells, to improve the understanding of the mechanisms of development of acute pancreatitis caused by excessive doses of amino acids, and to justify the choice of therapeutic agents for the treatment of acute pancreatitis.

The aim of our work was to investigate the effect of amino acids on the mitochondrial energy processes of pancreatic acinar cells.

In the dissertation, the influence of amino acids in different concentrations on the rate of oxygen consumption by uncoupled mitochondria of pancreatic acini was investigated.

It was established that glutamate, glutamine, alanine, lysine, and aspartate increase the rate of FCCP-stimulated mitochondrial respiration in pancreatic acinar cells. It was found that the availability of glucose as the main energy source reduces the contribution of lysine, alanine and aspartate, but not glutamic acid and glutamine, to the rate of uncoupled respiration of pancreatic acini. The positive effect of the amino acid on uncoupled respiration proves the fundamental ability of mitochondria to

oxidize it under experimental conditions, in the presence or absence of glucose as an alternative energy source. However, this does not prove that the mitochondria of acinar cells of the pancreas prefer oxidation of the studied amino acids in physiological conditions.

No sufficient evidence was found that asparagine, arginine, or histidine is used as an energy source by uncoupled mitochondria in pancreatic acinar cells.

The influence of glutamine on the rate of mitochondrial respiration and the viability of acinar cells in normal conditions and under stimulation with secretagogues was studied. It was established that upon stimulation of pancreatic acini with cholecystokinin (CCK) in a moderate concentration, glutamine reduces the rate of uncoupled oxidation. The addition of glutamine, pyruvate, and glucose to the incubation medium together with CCK in a high concentration (10 nM) leads to a decrease in the maximum respiration rate. It was shown that glutamine does not affect the viability of pancreatic acinar cells under CCK hyperstimulation.

The influence of glutamine and ammonia on the rate of mitochondrial oxidation in normal conditions and under the influence of secretion stimulants was compared. It was found that incubation of isolated pancreatic acinar cells with NH_4Cl causes a negative effect on mitochondria independent of acetylcholine or CCK stimulation. Glutamine increases the maximum respiration rate of mitochondria pancreatic acinar cells regardless of the effect of secretagogues. The toxic amount of ammonia necessary for such negative effects is apparently not formed due to the oxidation of glutamine in a moderate concentration (2 mM) with glucose, both under normal conditions and during stimulation of acinar cells with acetylcholine or CCK.

The effect of amino acids at a concentration of 20 mM on the viability of pancreatic acinar cells was determined. It was shown that alanine and histidine during long-term incubation do not change the viability of pancreatic acini. The protective effect of alanine may be associated with catabolism to pyruvate by alanine transaminase. Pyruvate enhances the oxidative capacity of mitochondria and ATP production, protects acinar cells of the pancreas from toxic substances.

Asparagine, aspartic acid and glutamic acid have been found to increase the number of dead cells. Arginine and lysine during long-term incubation have a significant negative effect on the viability of pancreatic acini *in vitro*, causing necrotic cell death.

It was first described that glutamine in high concentration (20 mM) causes blebbing and swelling of acinar cells and leads to necrosis. Interestingly, glutamate, a direct metabolite of glutamine, does not cause such deleterious effects in pancreatic acinar cells. It is known that glutamine decomposes spontaneously in solutions, forming ammonia. We hypothesize that ammonia accumulation is the primary cause of pancreatic acinar cell edema and necrosis induced by glutamine in high concentration.

Based on the obtained results, the effect of oxidation substrate sodium pyruvate on L-arginine-induced acute pancreatitis in rats *in vivo* was studied.

It was established that in the pancreas of animals with acute pancreatitis induced by L-arginine, regardless of the administration of sodium pyruvate, atypical cells were found, which is probably a sign of fibrosis. No signs of leukocyte infiltration, necrosis, edema, or hemorrhage were detected, apparently due to the late examination.

It has been investigated that the ultrastructure of cells is disturbed in animals with pancreatitis. Electron microscopy revealed mitochondria with degenerated cristae, accumulation of autophagosomes or non-apical localization of zymogen vesicles, as well as disintegration of the cytoplasm and nuclei of some pancreatic acinar cells.

It was first reported that pyruvate normalizes the levels of methionine, phenylalanine, tryptophan, glutamine, aspartate, ornithine, serine and cysteine in the blood plasma of rats with L-arginine-induced acute pancreatitis, but does not affect the morphology of the pancreas in acute pancreatitis. Sodium pyruvate can contribute to the normalization of mitochondrial processes and restoration of the cellular level of ATP. Under the conditions of administration of pyruvate, the deficiency of oxidation substrates disappears, which leads to a decrease in the needs of the cell in the catabolism of amino acids, as a result, it leads to an increase in their concentration in

the blood. The mechanism of normalization of the level of most essential amino acids in the blood plasma under the action of pyruvate can be explained by the improvement of the exocrine function of the pancreas and, as a result, the intensification of the splitting of proteins in the digestion process.

The obtained research results indicate the expediency of using amino acids and other energy substrates for the correction of mitochondrial dysfunction in acute pancreatitis.

Key words: amino acids, organs and tissues of rats, pancreatic acini, mitochondrial respiration, FCCP, ATP, ammonia, secretagogues, viability, necrosis, apoptosis, sodium pyruvate, acute pancreatitis.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. **Zub, A.**, Manko, O. V., & Manko, B. O. (2021). The effects of ammonia and glutamine on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells. *Visnyk of Lviv University. Biological Series*, (84), 105–112. <https://doi.org/10.30970/vlubs.2021.84.10>
2. Manko, B. O., Bilonoha, O. O., Voloshyn, D. M., **Zub, A. M.**, Ivasechko, I. I., & Manko, V. V. (2021). Pyruvate and glutamine define the effects of cholecystokinin and ethanol on mitochondrial oxidation, necrosis, and morphology of rat pancreatic acini. *Pancreas*, 50(7). <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000001864>
3. **Zub, A. M.**, Ostapiv, R. D., Manko, O. V., & Manko, B. O. (2023). Sodium pyruvate improves the plasma amino acid profile in rats with L-arginine-induced acute pancreatitis. *Amino Acids*. <https://doi.org/10.1007/s00726-023-03324-y>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Fedashko, V., **Yakubovska***, A., Ivasechko, I., Manko, B.O., Manko, V.V. (2019). Effects of hyperstimulation by cholecystokinin on viability of rat pancreatic acinar cells. Youth and Progress of Biology: XV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas. Lviv, Ukraine, 141.
2. Hadych, A., **Yakubovska***, A., Manko, B.O., Manko, V.V. (2019). Effects of glutamine and NH₄Cl on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells. Youth and Progress of Biology: XV International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 135th anniversary of J. Parnas. Lviv, Ukraine, 141–142.
3. **Якубовська***, А., Манько, Б.О., Манько, В.В. (2019). Вплив аргініну і лізину на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин

підшлункової залози щурів. XX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка. Київ, Україна, 32.

4. **Зуб, А.**, Манько, Б.О., Манько, В.В. (2019). Залучення амінокислот у процеси мітохондріального дихання впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози щурів. Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, Україна, 33.
5. Chipak, S., **Zub, A.**, Ostariv, R., Manko, B.O., & Manko V.V. (2020). Influence of sodium pyruvate on pancreatic morphology and amino acid blood levels in rats with arginine-induced acute pancreatitis. Youth and Progress of Biology: XVI International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 75th anniversary of the faculty of biology of Ivan Franko National University of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M.P. Derkach. Lviv, Ukraine, 182–183.
6. Shostak, M., **Zub, A.**, Manko, B.O., Manko, V.V. (2020). Effect of high concentrations of amino acids on apoptosis and necrosis in rat pancreatic acinar cells. XVI International Scientific Conference for Students and PhD Students, dedicated to the 75th anniversary of the faculty of biology of Ivan Franko national university of Lviv and 90th anniversary from the birthday of prof. M.P. Derkach. Lviv, Ukraine, 200.
7. **Zub, A.**, Manko, B.O., Manko, V.V. (2022). Viability of pancreatic acinar cells under the influence of amino acids in high concentration. Youth and Progress of Biology: XVIII International Scientific Conference for Students and PhD Students dedicated to the 195th anniversary from the birthday of Julius Planer. Lviv, Ukraine, 164–165.

* Якубовська А. М. (Yakubovska A. M.) – дівоче прізвище здобувачки Зуб А. М. (Zub A. M.)