

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЗУБ АНАСТАСІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК 557.1:[612.34:612.26]

ДИСЕРТАЦІЯ

**ВПЛИВ АМІНОКИСЛОТ НА ЕНЕРГЕТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ
АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ**

Спеціальність 091 – Біологія

Галузь знань 09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

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

Львів – 2023

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 аспартат збільшують швидкість FCCP-стимульованого дихання мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. З'ясовано, що доступність глюкози як основного джерела енергії зменшує внесок лізину, аланіну та аспартату, 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 секретогогами. 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 секретогогів. 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-трансмінази. 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 атипіві 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, секретагоги, 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.**, Ostapiv, 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.)

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

[Ca²⁺] – Концентрація іонів кальцію

FCSP – Карбонілціанід-р-трифторметоксифенілгідрозон

АДФ – Аденозиндифосфат

АТФ – Аденозинтрифосфат

АХ – Ацетилхолін

ЕПР – Ендоплазматичний ретикулум

K_{0,5} – Уявна константа напівактивації дихання

МПТП – Мітохондріальна пора транз'єнтної проникності

НАД – Нікотинаміддинуклеотид

ФАД – Флавінаденіндинуклеотид

ХЦК – Холецистокінін

ЦТК – Цикл трикарбонових кислот

ЗМІСТ

ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1. Екзокринна функція підшлункової залози.....	23
1.2. Процеси мітохондріального дихання	24
1.2.1. Цикл трикарбонових кислот	24
1.2.2. Дихальний ланцюг	26
1.3. Особливості функціонування мітохондрій у ацинарних клітинах підшлункової залози	28
1.3.1. Специфічна роль мітохондрій.....	28
1.3.2. Внесок мітохондрій у патогенез гострого панкреатиту	29
1.4. Роль амінокислот у функціонуванні підшлункової залози	32
1.4.1. Метаболізм амінокислот.....	33
1.4.2. Транспорт амінокислот у ацинарні клітини підшлункової залози ...	35
1.4.3. Ефект амінокислот на підшлункову залозу	36
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	40
2.1. Умови утримання та основні засади поводження із тваринами при проведенні фізіологічних досліджень.....	40
2.2. Групи піддослідних тварин за дослідження впливу натрій пірувату на гострий панкреатит	40
2.3. Ізолювання панкреатичних ацинусів	41
2.4. Полярнографічне вимірювання швидкості споживання кисню.....	42
2.5. Кінетичний аналіз	42
2.6. Флуоресцентна мікроскопія.....	44

2.7. Виділення ДНК.....	46
2.8. Кількісна оцінка фрагментації ДНК	46
2.9. Електрофорез	47
2.10. Хроматографічний аналіз амінокислот	47
2.11. Гістологічне дослідження	48
2.12. Електронна мікроскопія	48
2.13. Оцінка активності амілази	49
2.14. Статистичний аналіз	49
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ.....	50
3.1. Вплив амінокислот на дихання панкреатичних ацинусів <i>in vitro</i>	50
3.1.1. Ефект глютамінової кислоти на дихання панкреатичних ацинусів... 51	
3.1.2. Споживання кисню панкреатичними ацинусами за впливу глютаміну.....	54
3.1.3. Дихання панкреатичних ацинусів за впливу аланіну.....	56
3.1.4. Вплив лізину на дихання панкреатичних ацинусів щурів	59
3.1.5. Дихання панкреатичних ацинусів за окиснення аспарагінової кислоти.....	61
3.1.6. Вплив аспарагіну на дихання панкреатичних ацинусів.....	64
3.1.7. Дихання панкреатичних ацинусів за впливу аргініну.....	66
3.1.8. Вплив гістидину на процеси окиснення у панкреатичних ацинусах	68
3.2. Ефект глютаміну на ацинарні клітини за стимуляції секреторними агентами	72
3.2.1. Вплив пірувату і глютаміну на дихання та життєздатність панкреатичних ацинусів за стимуляції ХЦК	72

3.2.2. Вплив аміаку та глютаміну на мітохондріальне дихання панкреатичних ацинусів	78
3.3. Життєздатність панкреатичних ацинусів за впливу амінокислот у високій концентрації.....	84
3.3.1. Вживаність та морфологія панкреатичних ацинусів за короткотривалої інкубації з амінокислотами у високій концентрації	85
3.3.2. Ефект амінокислот у високій концентрації на життєздатність ацинарних клітин за довготривалої інкубації	91
3.4. Вплив натрій пірувату на гострий L-аргінін-індукований панкреатит ..	94
3.4.1. Ефект натрій пірувату на морфологічні та ультраструктурні зміни підшлункової залози за гострого панкреатиту	94
3.4.2. Зміна концентрації амінокислот у плазмі крові щурів з гострим панкреатитом за впливу натрій пірувату.....	97
РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ	104
ВИСНОВКИ.....	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	114
ДОДАТОК А.....	141
ДОДАТОК Б	144

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Актуальність теми. Екзокринна частина підшлункової залози відіграє центральну роль у процесах травлення [43; 71]. Ацинарні клітини підшлункової залози секретують травні ферменти, іони і воду в дванадцятипалу кишку [157; 158]. За втрати зовнішньосекреторної функції підшлункової залози помітно порушується всмоктування поживних речовин і виникає недоїдання [154; 164].

Амінокислоти є важливими субстратами для синтезу білків, глюкози та біологічно активних речовин [23]. Крім цього, амінокислоти беруть участь у синтезі АТФ [63]. Ацинарні клітини підшлункової залози поглинають велику кількість амінокислот, які використовуються для забезпечення високого рівня синтезу білка [159].

Порушення транспорту або метаболізму амінокислот, внаслідок рідкісних генетичних захворювань, призводить до високої частоти гострого панкреатиту у людей [96; 121; 144; 146].

Патологічні стани підшлункової залози, такі як панкреатит, супроводжуються зниженням або порушенням функціонування мітохондрій, що призводить до недостатнього енергетичного забезпечення клітини [18; 64; 132; 184]. Не виключено, що амінокислоти можуть вступати в процеси мітохондріального дихання для утворення відновлених еквівалентів [63].

Одним із підходів до покращення патологічних станів підшлункової залози є корекція харчування [91; 118; 126; 154; 198; 201]. Припускають, що добавки амінокислот сприятимуть відновленню продукування АТФ і метаболітів, що може призвести до полегшення гострого панкреатиту [7; 8; 10; 48; 109; 205; 206]. Проте позитивний вплив амінокислот може бути переважений потенційними токсичними ефектами [79]. Так, було показано, що певні амінокислоти у високих концентраціях викликають панкреатит у людини і тварин [16; 17; 19; 68; 83; 94; 95; 125; 153; 174; 176; 205].

З огляду на вищезазначене, з'ясування ролі амінокислот у забезпеченні мітохондріального дихання та життєздатності панкреатичних ацинусів є важливим і актуальним. Дослідження цих процесів є корисним для розуміння механізмів дії амінокислот у ацинарних клітинах і сприятиме вибору амінокислот чи інших субстратів окиснення для корекції патологічних станів підшлункової залози.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було дослідити вплив амінокислот на енергетичні процеси ацинарних клітин підшлункової залози.

Для досягнення цієї мети виконували такі завдання:

1. Дослідити вплив амінокислот на мітохондріальне дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози.
2. З'ясувати вплив глутаміну на дихання і життєздатність панкреатичних ацинусів за стимуляції секретогогами.
3. Вивчити ефект амінокислот у високій концентрації на життєздатність панкреатичних ацинусів.
4. Визначити як впливає натрій піруват на L-аргінін-індукований панкреатит у щурів.

Об'єкт дослідження – енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози.

Предмет дослідження – роль амінокислот у забезпеченні мітохондріального дихання і життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози.

Методи дослідження: *фізіологічні* – моделювання гострого панкреатиту введенням L-аргініну *in vivo*, дослідження терапевтично впливу натрій пірувату *in vivo*, *біохімічні* – кількісна оцінка фрагментації ДНК, оцінка активності амілази, *фізико-хімічні* – полярографічний метод дослідження швидкості поглинання кисню, флуоресцентна і електронна мікроскопія, гель-електрофорез ДНК, високоефективна рідинна хроматографія амінокислот; *кінетичні* – кінетичний аналіз залежності швидкості дихання від концентрації субстрату

окиснення; *статистичні* – описова статистика, t-тест Стьюдента, двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з повтореннями з подальшими post-hoc t-тестами коригованими за методом Голм-Бонферроні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційну роботу виконано на базі кафедри фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках держбюджетних тем «Ca²⁺-транспортувальні системи та регуляції клітинного дихання екзокринних залоз у нормі і за дії стресорних чинників» (2015–2017 рр., № держреєстрації 0115U003246), «Адаптаційний потенціал мітохондрій секреторних клітин підшлункової залози і печінки у нормі та за розвитку патології» (2018–2020 рр., № держреєстрації 0118U003604), «Функціональна оцінка мітохондрій: пайплайн для виявлення механізмів передпатологічних станів травних залоз» (2023–2025 рр., № держреєстрації 0123U101951), а також проєкту у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дістарних чинників» (2021–2023 рр., № держреєстрації 0123U110302).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано вплив амінокислот на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози. Досліджено зміну швидкості роз'єданого дихання за впливу амінокислот. Встановлено, що FCCP-стимульована швидкість дихання підвищується за окиснення глутамату, глутаміну, аланіну, лізину і аспартату. Доступність альтернативних субстратів окиснення зменшує вплив аланіну, лізину і аспартату, але не глутамінової кислоти чи глутаміну. Показано, що аспарагін, аргінін і гістидин не вступають у процеси мітохондріального дихання незалежно від наявності альтернативних субстратів окиснення.

Уперше встановлено, що глутамін у фізіологічній концентрації за стимуляції ХЦК зменшує швидкість роз'єданого окиснення, але не впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози. Встановлено, що в

процесі окиснення глутаміну у фізіологічній концентрації не утворюється токсична кількість аміаку, навіть за стимуляції ацинарних клітин підшлункової залози секретатогами.

Уперше показано негативний вплив глутаміну у високій концентрації (20 ммоль/л) на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози за довготривалої інкубації. Зареєстровано збільшення площі клітин та інтенсифікацію мембранного блебінгу за впливу глутаміну. Встановлено захисний вплив аланіну і гістидину на життєздатність панкреатичних ацинусів.

Уперше встановлено, що натрій піруват нормалізує рівень амінокислот у плазмі крові, але не впливає на морфологічну структуру підшлункової залози у щурів з гострим панкреатитом.

Практичне значення одержаних результатів. Основні положення дисертаційної роботи дозволяють зрозуміти механізми впливу амінокислот на мітохондріальні процеси ацинарних клітин підшлункової залози. Результати досліджень можуть бути використані для розробки засобів запобігання гострому панкреатиту чи для модуляції функціонування панкреатичних ацинусів за різних фізіологічних станів. Одержані результати є важливими не лише для розуміння ролі амінокислот у функціонуванні клітин підшлункової залози, а й для передбачення ефекту інших енергетичних субстратів. Узагальнення експериментальної роботи можуть бути впровадженими у навчальний процес у Львівському національному університеті імені Івана Франка при викладанні загального курсу «Фізіологія людини і тварин», а також спецкурсів «Основи біоенергетики», «Системна фізіологія», «Основи здорового харчування» і «Основи нутриціології». Методичні та експериментальні розробки використовуються студентами під час виконання курсових та дипломних робіт. Результати досліджень можуть бути використані для підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у навчальних закладах вищої освіти України.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно здійснено підбір та опрацювання даних літератури. Автором виконано основну експериментальну частину дисертації і статистичну обробку результатів. Планування наукової роботи, аналіз та інтерпретацію одержаних результатів, підготовку рукописів статей виконано за участю наукового керівника і співавторів публікацій.

Апробація результатів. Основні положення дисертації були представлені на II Міжнародній міждисциплінарній дослідницькій конференції “Young Science Beyond Borders” (Польща, заочна форма участі), 2023), XV, XVI, XVIII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2019, 2021, 2022), XX з’їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019), VIII з’їзді Українського біофізичного товариства (Київ, 2019), а також на щорічних звітних наукових конференціях працівників біологічного факультету та наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 3 статті: 2 статті у міжнародних виданнях з квантилем Q 2 і 1 стаття в українському фаховому журналі; і 7 тез доповідей у матеріалах міжнародних і вітчизняних наукових конференцій.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 146 сторінках комп’ютерного набору і складається зі вступу, 4-х розділів («Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження», «Результати досліджень та їхнє обговорення» та «Узагальнення»), а також висновків, списку використаних джерел. Робота містить 27 рисунків. Бібліографічний список налічує 210 джерел літератури.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Екзокринна функція підшлункової залози

Підшлункова залоза відіграє важливу роль у процесах травлення та обміну речовин, виконуючи екзокринну та ендокринну функції. Екзокринна частина складає понад 95 % маси підшлункової залози. Зовнішньосекреторна функція полягає у виділенні в дванадцятипалу кишку панкреатичного соку, який містить травні ферменти [43; 93].

Панкреатичні ацинуси з'єднуються кінцевими або проміжними протоками, що зливаються у міжчасточкові протоки, які, у свою чергу, збираються, утворюючи головну протоку підшлункової залози. Ацинарні клітини в межах окремих ацинарних одиниць електрично з'єднані щілинними контактами або нексусами [149] та прямими хімічними зв'язками [87]. Між ацинарними клітинами в межах різних сусідніх ацинарних одиниць існує електричне зчеплення [86].

Ацинарні клітини виділяють понад 20 ферментів, включаючи протеази, ліпази, рибонуклеази, амілази та гідролази, і багату на NaCl рідину [158]. Як правило, ферменти синтезуються і секретуються в неактивній формі (зимогени), щоб уникнути самоперетравлення органу [157]. Протокові клітини виділяють велику кількість рідини, що містить бікарбонати [70].

Висока інтенсивність синтезу білків у ацинарних клітинах підшлункової залози [44] супроводжується високою активністю транспортерів амінокислот [159]. Амінокислоти, окрім участі у синтезі білків, можуть окиснюватись у мітохондріях з утворенням дихальних субстратів [23]. Оскільки, екзокринна секреція білків і рідини є енерговитратними процесами, порушення або недостатність продукування АТФ є важливою особливістю ураження підшлункової залози за патологічних станів.

Тому дослідження енергетичного забезпечення ацинарних клітин за дії амінокислот є вкрай важливим для визначення та моделювання функціонування підшлункової залози у нормі та за патологічних станів.

1.2. Процеси мітохондріального дихання

Мітохондрії займають приблизно 8 % об'єму ацинарних клітин підшлункової залози [20]. Основні катаболічні шляхи сходяться у мітохондріях і призводять до виробництва АТФ шляхом окисного фосфорилування.

У результаті катаболізму глюкози та інших вуглеводів, жирних кислот і більшості амінокислот утворюється ацетил-КоА, який вступає у цикл трикарбонових кислот, внаслідок функціонування якого, генеруються відновлені донори електронів НАДН та ФАДН₂. Електрони переносяться через комплекси електрон-транспортного ланцюга до молекулярного кисню. Термодинамічно сприятливий транспорт електронів вивільняє енергію, яка використовується для перекачування протонів з матриксу в міжмембранний простір мітохондрій у комплексах I, III та IV, створюючи електрохімічний градієнт [75]. Енергія, яка виділяється при дисипації протонного електрохімічного градієнта, потім використовується у синтезі АТФ із АДФ та Ф_n, каталізованому АТФ-синтазою [193].

1.2.1. Цикл трикарбонових кислот

ЦТК функціонує в матриксі мітохондрій і є амфіболічним шляхом, який зв'язує багато катаболічних та анаболічних процесів.

Основні реакції ЦТК:

1. Конденсація ацетил-КоА з оксалоацетатом до утворення цитрату під дією цитратсинтази.
2. Оборотно перетворення цитрату в ізоцитрат, яке каталізується аконітазою (аконітатгідратазою). У процесі реакції утворюється трикарбонова

кислота – *цис*-аконітат, яка зазвичай не дисоціює від активного центру ферменту.

3. Окисне декарбоксилювання ізоцитрату з утворенням α -кетоглутарату за допомогою ізоцитратдегідрогенази. У результаті реакції відбувається відновлення НАД⁺ до НАДН.

4. Декарбоксилювання α -кетоглутарату до сукциніл-КоА і CO₂ під дією комплексу α -кетоглутаратдегідрогенази. НАД⁺ служить акцептором електронів, а КоА є носієм сукцинільної групи. Енергія окиснення α -кетоглутарату зберігається в тіоефірному зв'язку сукциніл-КоА.

5. Оборотно утворення сукцинату зі сукциніл-КоА, яке каталізується сукциніл-КоА-синтетазою (бурштиною тіокіназою). Подібно до ацетил-КоА, сукциніл-КоА має тіоефірний зв'язок із сильною негативною стандартною вільною енергією гідролізу ($G^{\circ} = 36$ кДж/моль). Енергія, що виділяється за розриву цього зв'язку, стимулює синтез фосфоангідридного зв'язку в ГТФ.

6. Окиснення сукцинату до фумарату флавопротеїном сукцинатдегідрогеназою, у результаті чого відбувається відновлення ФАД⁺ до ФАДН₂.

7. Оборотна гідратація фумарату до L-малату, яка каталізується фумаразою (фумаратгідратазою).

8. Окиснення L-малату до оксалоацетату з утворенням відновленого НАДН, під дією НАД⁺-зв'язаної L-малатдегідрогенази.

Оксалоацетат безперервно перетворюється у екзергонічній реакції, каталізованій цитратсинтазою. Цей процес дозволяє підтримувати надзвичайно низький клітинний рівень оксалоацетату (<10⁻⁶ моль), що спрямовує реакцію малатдегідрогенази в бік утворення оксалоацетату [23].

Хоча ЦТК займає центральне місце в енергетичному метаболізмі, його роль не обмежується енергозбереженням. Чотири- та п'ятивуглецеві проміжні продукти циклу служать попередниками для біосинтезу глюкози, жирних кислот або незамінних амінокислот. Для підтримання пулу проміжних

продуктів, вилучених для цієї мети, клітини використовують анаплеротичні реакції [141].

1.2.2. Дихальний ланцюг

Електрон-транспортний ланцюг мітохондрій використовує декілька реакцій переносу електронів для утворення клітинного АТФ шляхом окисного фосфорилування. У ссавців система окисного фосфорилування утворена п'ятьма багатобілковими ферментними комплексами та двома мобільними носіями електронів, вбудованими у внутрішню мембрану мітохондрій. Процес транспорту електронів від відновних еквівалентів до молекулярного кисню спряжений з утворенням протонного градієнта на внутрішній мембрані, який використовується для синтезу АТФ.

Комплекси дихального ланцюга розподілені всередині внутрішньої мембрани мітохондрій, а збираються у надмолекулярні структури – суперкомплекси [163].

Комплекс I (НАДН-убіхіноноксидоредуктаза або НАДН-дегідрогеназа) є великим ферментом, який складається з 45 поліпептидних ланцюгів, зокрема флавопротеїну, що містить флавінмононуклеотид (ФМН), і щонайменше шести Fe-S центрів [30]. Комплекс I каталізує екзергонічний перехід гідрит іону з НАДН до ФМН, від якого два електрони проходять через ряд Fe-S центрів до залізосірчаного білка N-2. У результаті перенесення електронів від N-2 до убіхінону утворюється відновлений убіхінол, який дифундує в ліпідний бішар. Транспорт електронів також стимулює ендергонічне перенесення чотирьох протонів із матриксу мітохондрій до міжмембранного простору [23].

Комплекс II (сукцинат-убіхіноноксидоредуктаза) складається з чотирьох субодиниць та п'яти протеазних груп [173; 202]. Це єдиний комплекс дихального ланцюга, повністю кодований ядерною ДНК. В еукаріотичних клітинах субодиниця В асоціюється з мембранним доменом субодиниць С і D і разом зі субодиницею А утворює гідрофільну головку білкового комплексу,

який виступає у мітохондріальний матрикс. Субодиниці А та В складають каталітичне ядро комплексу II, яке самостійно може окиснювати сукцинат до фумарату у ЦТК. У межах підкомплексу субодиниць А і В електрони транспортуються до кофактора ФАД, що міститься в субодиниці А, і до трьох кластерів Fe-S у субодиниці В. Далі електрони транспортуються до убіхінону [62; 173].

Коензим Q, також відомий як убіхінон, складається з хінону та гідрофобного хвоста. Він функціонує як носій електронів і транспортує електрони до комплексу III. Коензим Q піддається циклу відновлення до семіхінону (частково відновлений, радикальна форма) та убіхінолу (повністю відновлений) [97; 99; 104].

Комплекс III (цитохром bc_1 комплекс) складається з 11 субодиниць. Основними компонентами комплексу є цитохром b, субодиниці Ріске (містять два кластери Fe-S) та цитохром c [85]. Оскільки цитохром c одночасно може приймати лише один електрон, цей процес відбувається у два етапи (цикл Q). Спочатку відбувається зв'язування убіхінолу та убіхінону з двома окремими ділянками комплексу III. Один електрон надходить до Fe-S, а потім до цитохрому c, тоді як другий електрон переноситься до цитохрому b, а далі до убіхінону, зв'язаного в іншому місці. Поряд з цим, два іони H^+ вивільняються в міжмембранний простір, сприяючи створенню градієнта протонів. Далі убіхінол окиснюється до убіхінону і дисоціює від комплексу. На наступному етапі процес повторюється, але цитохром b відновлює семіхінол до убіхінолу, перш ніж він дисоціює від комплексу III і може бути перероблений [128].

Цитохром c – розчинний білок, який знаходиться у міжмембранному просторі. Після того, як єдиний гем приймає електрон із комплексу III, цитохром c рухається до комплексу IV для віддачі електрона в двоядерний Cu-центр [75].

Комплекс IV (цитохром c оксидаза) складається з 14 субодиниць [13]. Мітохондріальна субодиниця II містить два йони Cu (Cu_A), субодиниця I

містить дві групи гему – а і а₃, та інший йон міді (Cu_B). Перенесення електронів через комплекс IV відбувається від цитохрому с до Cu_A центру, далі гему а, тоді до гему а₃ – Cu_B центру і, нарешті, до O₂. На кожні чотири електрони, які проходять через цей комплекс – фермент споживає чотири йони H⁺ з матриксу при перетворенні O₂ в 2 H₂O [23]. Вільна енергія від переносу електронів використовується для додаткового закачування чотирьох протонів із матриксу мітохондрій у міжмембранний простір, сприяючи утворенню градієнта протонів [195].

АТФ-синтаза або комплекс V використовує градієнт протонів на внутрішній мембрані мітохондрій для синтезу АТФ. АТФ-синтаза містить дві субодиниці F₀ і F₁, які діють як система обертового двигуна [134]. Гідрофобна субодиниця F₀ вбудовується у внутрішню мембрану мітохондрій. Вона містить протонний канал, який багаторазово протонується і депротонується, коли йони H⁺ переносяться за градієнтом від міжмембранного простору до матриксу. Поперемінна іонізація F₀ викликає обертання, що змінює орієнтацію субодиниці F₁. Гідрофільна субодиниця F₁ повернена до матриксу мітохондрій. Конформаційні зміни у субодиниці F₁ каталізують утворення АТФ із АДФ та Ф_n. На кожні 3–5 іонів H⁺ виробляється 1 молекула АТФ [193].

1.3. Особливості функціонування мітохондрій у ацинарних клітинах підшлункової залози

Мітохондрії відіграють вирішальне значення не тільки у генерації АТФ, але й у фізіологічно важливій субклітинній компартменталізації цитозольних Ca²⁺-сигналів.

1.3.1. Специфічна роль мітохондрій

Ca²⁺, Mg²⁺ і АТФ необхідні для екзоцитозу [12]. Mg²⁺ наявний у мілімолярних концентраціях у всьому цитозолі, але висока цитозольна [Ca²⁺] створюється у локальних доменах поблизу апікальної плазматичної мембрани

[107]. Ca^{2+} -сигнали генеруються у відповідь на дію нейромедіатора – ацетилхоліну (АХ), який активує мускаринові рецептори на базолатеральній мембрані або циркулюючого гормону – холецистокініну (ХЦК), який стимулює високоафінні рецептори ССК1, розташовані на базолатеральній мембрані [119; 160].

Цитозольні сигнали Ca^{2+} завжди ініціюються в апікальному полюсі клітини [151]. Особлива група мітохондрій, яка оточує апікальну зернисту область, відіграє вирішальну роль у обмеженні цитозольного підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$, діючи як Ca^{2+} буферний бар'єр. Поглинання Ca^{2+} мітохондріями під час апікального збільшення $[\text{Ca}^{2+}]$ стимулює синтез АТФ. АТФ необхідний і для екструзії Ca^{2+} через Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани, які в основному розташовані в апікальній ділянці, а також для зворотного захоплення Ca^{2+} в ЕПР [150].

Оскільки екструзія Ca^{2+} відбувається під час підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$, існує потреба в компенсаторному надходженні Ca^{2+} . Субплазмалемні (периферичні) мітохондрії відіграють важливу роль у підтримці як накопичуваного надходження Ca^{2+} в матрикс, так і перекачуванні йону в ЕПР [150].

Третя група мітохондрій оточує ядро. Найімовірніша функція перинуклеарних мітохондрій – діяти як захисний бар'єр для ядра, тому що Ca^{2+} -сигнали, які контролюють секрецію, не повинні увійти в ядро. Комплекси ядерних пор майже не забезпечують їх стійкість до потоку Ca^{2+} [59]. Якщо ж специфічні ядерні Ca^{2+} сигнали існують, а ядро містить усі необхідні біохімічні сполуки для виробництва, наприклад, IP_3 [45], то перинуклеарні мітохондрії також могли би запобігти передачі таких сигналів у інші ділянки ацинарної клітини.

1.3.2. Внесок мітохондрій у патогенез гострого панкреатиту

Панкреатит – це запальне захворювання підшлункової залози з широкою етіологією і патогенезом. Розрізняють два основні типи панкреатиту – гострий і

хронічний. У людей головними тригерами гострого панкреатиту є зловживання алкоголем або блокування жовчної протоки жовчними каменями. Крім того, панкреатит може виникати як наслідок гіпертригліцеридемії, ендоскопічної ретроградної холангіопанкреатографії, генетичних мутацій (CLDN2, SPINK1, PRSS1), у відповідь на лікування (аспарагіназа), тощо [32]. Важливою характеристикою панкреатиту є екзокринна й ендокринна недостатність, що супроводжується зміною рівня вільних амінокислот у плазмі крові [60; 164].

Панкреатит виникає через порушення нормального функціонування ацинарних і протокових клітин підшлункової залози. Накопичення іонів кальцію в цитоза ацинарних клітин є однією з ключових подій у розвитку захворювання. Патологічне підвищення $[Ca^{2+}]$ реалізується за рахунок надходження катіонів з міжклітинного середовища та з клітинних депо, зокрема з мітохондрій [65]. Підвищені концентрації Ca^{2+} , у свою чергу, спричиняють дисфункцію мітохондрій, стрес ЕПР та порушення аутофагії. Усі ці зміни разом призводять до внутрішньоклітинної активації ферментів і самоперетравлення ацинарних клітин. Порушення секреції бікарбонатів протоковими клітинами і, як наслідок, закислення міжклітинного середовища, надалі призводить до внутрішньопротокової активації зимогенних везикул [69]. Згодом ацинарні клітини гинуть шляхом апоптозу та некрозу, що призводить до запалення тканин і, зрештою, фіброзних трансформацій.

Мітохондріальна дисфункція разом із активацією зимогенних везикул є одними з основних механізмів пошкодження ацинарних клітин підшлункової залози [184].

На експериментальних моделях гострого панкреатиту, включаючи гіперстимуляцію церулеїном, протокову інфузію жовчних кислот або жирних кислот разом із етанолом, було встановлено, що стійке підвищення цитозольної $[Ca^{2+}]$ ініціює негативні процеси у клітинах [82; 148; 190; 194]. Внутрішньоклітинне перевантаження Ca^{2+} викликає порушення біоенергетичних процесів, і як наслідок, некроз. Надфізіологічні концентрації

ХЦК і його аналогів, які використовують у моделях гострого панкреатиту [108], спричиняють втрату $\Delta\psi_m$, що залежить від Ca^{2+} [136].

Раніше було показано, що ізольовані мітохондрії підшлункової залози більш чутливі до іонів Ca^{2+} , ніж мітохондрії печінки, і зберігають свій функціональний стан лише за умови виділення в присутності хелатору Ca^{2+} . Ca^{2+} за низьких мікромольних концентрацій деполаризує мітохондрії підшлункової залози через відкриття мітохондріальної пори МПТП [136]. МПТП у відповідь на мітохондріальне перевантаження Ca^{2+} приймає висококондуктивну конформацію, що зумовлює нерегульоване надходження розчинених речовин з молекулярною масою до 1500 Да, а також води, у матрикс мітохондрій. Результатом є втрата $\Delta\psi_m$, пов'язана з набряканням мітохондрій та розривом їхньої зовнішньої мембрани. Стійке Ca^{2+} -індуковане відкриття МПТП є ранньою подією в експериментальних моделях гострого панкреатиту, що спричиняє зменшення вироблення АТФ, дефектну аутофагію, активацію зимогенів, вивільнення цитокінів і порушення метаболізму [132]. Запобігання відкриттю МПТП досягається шляхом інгібування модулюючого білка циклофіліну D, тому цей білок вважається важливою мішенню для лікування гострого панкреатиту *in vivo* [169]. Крім того, відкриття МПТП, чутливої до циклофіліну D, опосередковує мітохондріальну дисфункцію й у протокових клітинах підшлункової залози, що вказує на загальний механізм, який діє у кількох типах клітин [179].

Порушення функціонування мітохондрій є одним із головних патологічних процесів у моделях гострого панкреатиту, індукованого основними амінокислотами. У мітохондріях підшлункової залози, виділених зі щурів або мишей, яким вводили надвисоку дозу аргініну, спостерігалось інгібування активності АТФ-синтази через Ca^{2+} -незалежний шлях. За цієї моделі гострого панкреатиту аргінін переважно накопичується у мітохондріях [18]. Деполаризація мітохондріальної мембрани, спричинена аргініном, не залежить від оксиду азоту. Цей процес може бути зумовлений орнітином,

іншим метаболітом аргініну, який деполяризує мітохондрії підшлункової залози. Варто відзначити, що накопичення основних амінокислот, аргініну, лізину та орнітину, викликає пошкодження мітохондрій у нейронах [24].

Внутрішньоочеревинне введення 2 г/кг лізину викликає важкий гострий некротизуючий панкреатит. Лізин спричиняє раннє пошкодження мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози, що передує активації трипсиногену та прозапального фактора транскрипції NF- κ B, які, як прийнято вважати, відіграють важливу роль у розвитку гострого панкреатиту [17]. Експерименти на ізольованих мітохондріях підшлункової залози, виділених від контрольних та оброблених лізином щурів, показали, що лізин знижує функцію АТФ-синтази, впливаючи на транспортний ланцюг електронів або викликаючи дисбаланс між гідролізом і синтезом АТФ. Екзогенний лізин у концентрації 30-60 ммоль/л значно інгібував відновлення $\Delta\psi_m$ мітохондріями ацинарних клітин після додавання АДФ. Схожі дані були отримані на мітохондріях панкреатичних ацинусів тварин на 1-шу та 4-ту год після внутрішньоочеревинної ін'єкції лізину [17].

Профілактика деполяризації мітохондрій призводить до відновлення функції мітохондрій зі значним зниженням місцевих і системних патологічних реакцій на моделях експериментального важкого панкреатиту [18; 132; 167]. Із метою корекції енергетичного дефіциту активно досліджується вплив високоенергетичного ентерального харчування у пацієнтів з гострим панкреатитом на ранній стадії [118; 126].

1.4. Роль амінокислот у функціонуванні підшлункової залози

У ацинарних клітинах підшлункової залози спостерігається висока інтенсивність енергетичних процесів, а також велика активність транспортерів амінокислот, необхідних для синтезу травних ферментів [159].

Порушення травлення, зниження продукції гормонів і ензимів, які виділяються ацинарними клітинами підшлункової залози, лежать в основі

розвитку панкреатиту із формуванням екзокринної та ендокринної недостатності [154].

1.4.1. Метаболізм амінокислот

Проміжні чотири- та п'яти-вуглецеві сполуки надходять у ЦТК під час катаболізму амінокислот. У результаті катаболізму амінокислот утворюються глюконеогенні або кетогенні попередники.

Після протеолізу кетогенні амінокислоти можуть остаточно окиснюватися у м'язах, тоді як глюконеогенні амінокислоти залежать від анаплерозу та катаплерозу і перетворюються на глюкозу у печінці та нирках перед окисненням до CO_2 та H_2O .

До виключно кетогенних амінокислот належать лейцин та лізин. П'ять амінокислот є як кетогенними, так і глюконеогенними: фенілаланін, ізолейцин, треонін, триптофан і тирозин. Решта тринадцять – виключно глюконеогенні [23].

Катаболізм лізину у ссавців через сахаропіновий шлях призводить до необоротного утворення глутамату та α -аміноадипату, які потім піддаються дезамінації та окисненню.

Деградація лізину в основному проходить в печінці [73] через мітохондріальний сахаропіновий шлях [74]. НАДФН-залежна лізин- α -кетоглутарат редуктаза перетворює L-лізин до сахаропіну за наявності α -кетоглутарату [84]. Експерименти на тваринах показують, що лізин окиснюється в ентероцитах за умов високого рівня білка [183], хоча немає доказів того, що ентероцити експресують ферменти, необхідні для катаболізму лізину [35]. Крім функції попередника синтезу білка, лізин є також попередником біосинтезу карнітину, який відіграє важливу роль у β -окисненні [177].

У результаті катаболізму глюконеогенних амінокислот, у периферійних тканинах, таких як скелетні м'язи, утворюються аланін і глутамін (носії азоту в крові), які згодом поглинаються печінкою і кишечником та безпечно

утилізуються у циклі сечовини, з побічним утворенням глюкози з аланіну [55; 137].

Є дані, що у м'язах аспарагінова кислота, аспарагін, глутамінова кислота, ізолейцин та валін, отримані з білка, переважно перетворюються у глутамін, який виділяється у кров [31]. Синтез та вивільнення глутаміну зі скелетних м'язів стимулюється у відповідь на метаболічний ацидоз і голодування [31].

Глутамін є найкращим джерелом енергії для ацинарних клітин підшлункової залози [111]. Глутамін може перетворюватися у глутамат з наступним дезамінуванням глутаматдегідрогеназою або глутаматтрансаміназою до α -кетоглутарату, який надходить у ЦТК для анаплерозу і синтезу АТФ [9]. Цей шлях також є важливим для функціонування клітин за раку підшлункової залози [14].

Глутамат є важливим інтермедіатом метаболізму амінокислот, він може віддавати аміногрупу для синтезу нової амінокислоти (трансамінування) чи внаслідок дезамінування перетворюватись в 2-оксоглутарат, який є проміжним метаболітом ЦТК [203].

Внутрішньовенне введення аланілглутаміну підвищувало концентрацію та загальну кількість глутамату, який виділяється у панкреатичний сік [40]. Ацинарні клітини виділяють значно більшу кількість глутамату й аспартату, ніж нейтральних амінокислот [9]. Є докази того, що секреція глутамату в панкреатичний сік допомагає підтримувати харчові потреби ентероцитів протягом короткого періоду дієти з дефіцитом білка [9].

Катаболізм гістидину здебільшого відбувається у шкірі та печінці. Гістидаза (гістидин-аміакліаза) є першим і основним регуляторним ферментом катаболізму гістидину з виробленням аміаку і *транс*-уроканату [36]. *Транс*-уроканат гідролізується в печінці уроканазою з утворенням 4-імідозолон-5-пропріонату, який, у свою чергу, перетворюється на форміміноглутамат. Наступний крок включає перенесення форміміногрупи на тетрагідрофолат з утворенням 5',10'-метеніл-тетрагідрофолату, глутамату та аміаку [26].

Розпад аргініну відбувається у мітохондріях трьома шляхами, в результаті яких утворюються $\Delta 1$ -піролін-5-карбонова кислота, оксид азоту та креатин. У першому шляху аргінін мітохондріальною аргіназою перетворюється в орнітин, а потім у $\Delta 1$ -піролін-5-карбовову кислоту. Аргіназа, яка представлена двома ізоформами (I і II типу), є ключовим ферментом циклу сечовини, що гідролізує аргінін до орнітину та сечовини. Орнітин може бути попередником поліамінів (путресцину, спермідину та сперміну), які є аліфатичними полікатіонами, що беруть участь у метаболічних перетвореннях в клітині [100]. Другий шлях катаболізму аргініну веде до виробництва NO, каталізованого NO-синтазою [197]. NO-синтаза має 3 ізоформи: конститутивну ендотеліальну, нейрональну та індукцибельну [57]. Третій шлях призводить до утворення гуанідіноацетату, а потім креатину – під дією гліцин амідиотрансферази та гуанідин ацетат-N-метилтрансферази відповідно [25]. Шлях ініціює аргінін-гліцинамідиотрансфераза, яка переносить групу гуанідину з аргініну в гліцин із утворенням гуанідіноацетату й орнітину. Цей фермент наявний переважно у ниркових каналцях, підшлунковій залозі та значно меншою мірою у печінці та інших органах. Нирки є основним місцем утворення гуанідіноацетату [51]. Гуанідіноацетат метилюється гуанідіноацетатною N-метилтрансферазою, яка знаходиться переважно у печінці, підшлунковій залозі та, значно меншою мірою, у нирках, з утворенням креатину. Циркулюючий креатин активно поглинається скелетними м'язами та нервами, де він фосфорилується, і зрештою, зазнає неферментативного, необоротного зневоднення з утворенням креатиніну. Останній виводиться нирками. Таким чином, гомеостаз креатину, у першу чергу, стосується нирок, печінки та скелетних м'язів [25].

1.4.2. Транспорт амінокислот у ацинарні клітини підшлункової залози

Ацинарні клітини підшлункової залози експресують транспортери амінокислот, що дозволяє накопичувати амінокислоти проти значного градієнта

концентрації для підтримки високого рівня синтезу білка, а також для використання амінокислот як субстратів для виробництва АТФ. Найбільш виражені натрій-залежні транспортери SNAT3 (Slc38a3) та SNAT5 (Slc38a5), а також натрій-незалежні транспортери нейтральних амінокислот LAT1 (Slc7a5) та LAT2 (Slc7a8), локалізуються на базолатеральній мембрані ацинарних клітин [159].

Експеримент на перфузованій підшлунковій залозі показав, що транспорт нейтральних амінокислот в ацинарні клітини може гальмуватися через конкуренцію з деякими іншими амінокислотами. Аланін, гліцин, метіонін, лейцин, фенілаланін, тирозин та аргінін транспортуються швидше, порівняно з триптофаном й аспаратом [117]. Транспорт аланіну в екзокринній частині підшлункової залози залежить від натрію і викликає деполяризацію клітин без супутньої секреції зимогенів [172; 186]. Цей транспорт конкурує з перенесенням гліцину, але не аргініну [105].

Ще одна особливість транспорту через базолатеральну мембрану – здатність підсилюватися або трансстимулюватися іншими амінокислотами. За транслокації серину може відбуватися обмін з кількома іншими нейтральними амінокислотами за допомогою антипортерів [116].

Агауа та співавтори показали, що ацинарні клітини підшлункової залози експресують нижчі рівні транспортерів глутамату, ніж переносників глутаміну. Високий рівень транспорту глутаміну асоціюється з секрецією глутамату зі панкреатичних ацинусів у просвіт тонкої кишки [9].

Є повідомлення про те, що транспортер нейтральних амінокислот LAT1 бере участь у регенерації тканини підшлункової залози за гострого панкреатиту [29].

1.4.3. Ефект амінокислот на підшлункову залозу

Порушення транспорту або метаболізму амінокислот часто асоційоване з дисфункцією підшлункової залози. Добре відомо, що лікування аспарагіназою

викликає гострий панкреатит [139], можливо, через важливу роль синтезу аспарагіну в ацинарних клітинах підшлункової залози [181]. Гострий панкреатит також може виникати за рідкісних амінокислот-пов'язаних генетичних захворювань, таких як цитрулінемія типу II (дефіцит носія аспартату/глутамату цитрину) [96], непереносимість білка лізинуру (дефіцит SLC7A7 – компонента катіонного транспортера амінокислот) [121; 144] та дефіцит пропіоніл-КоА-карбоксилази, що порушує метаболізм амінокислот валіну, ізолейцину, метіоніну та треоніну [146].

Високі дози (2–8 г/кг) основних амінокислот, таких як аргінін, орнітин, лізин та гістидин, викликають гострий панкреатит у гризунів [205], але механізми їхньої токсичності залишаються невідомими.

Аргінін-індукований гострий панкреатит модулюють одно- чи дворазовим внутрішньоочеревинним введенням L-аргініну загальною дозою 5 г/кг. Ця модель гострого некротичного панкреатиту характеризувалася максимальною інфільтрацією імунних клітин через 72 години, регенерацією ацинарних клітин через 7 днів і повним відновленням архітектури підшлункової залози через 14 днів [94; 129].

Описані два клінічні випадки аргінін-індукованого панкреатиту у людини [19; 125]. Хоча патологічні механізми аргінінового панкреатиту залишаються недостатньо вивченими, відомо, що надмірні дози аргініну зумовлюють ультраструктурні зміни у внутрішньоклітинних органелах, таких як ЕПР, мітохондрії [129]. Аргініновий панкреатит супроводжується зростанням експресії білків теплового шоку HSP27 і HPS70 в ацинарних клітинах [68]. Кальцій-незалежна мітохондріальна дисфункція, пов'язана з циклофіліном D, виникає на початку розвитку гострого панкреатиту, зумовленого аргініном і веде до зниження рівня АТФ і, як наслідок, порушення процесів автофагії, стресу ЕПР та інших патологічних подій, що призводять до некротичних змін та запалення підшлункової залози [18]. Цікаво, що за аргінін-індукованого гострого панкреатиту у щурів, аргінін в основному накопичується у

мітохондріях, що, очевидно, пов'язано із особливостями метаболізму цієї амінокислоти [18]. Можливим медіатором негативного впливу аргініну є орнітин, проміжний метаболіт аргініну у циклі сечовини [17; 205]. Інгібування аргінази, ферменту, який перетворює аргінін у орнітин, покращує стан за гострого панкреатиту у щурів [15].

Внутрішньоочеревинне введення 3 г/кг орнітину спричиняє важкий гострий панкреатит із масивним інтерстиціальним набряком, апоптозом, некрозом ацинарних клітин та інфільтрацією лейкоцитів [153].

За впливу 2 г/кг лізину *in vivo* спостерігається набряк мітохондрій із наступним розширенням ЕПР та утворенням аутофагічних вакуолей, що свідчить про швидку клітинну дегенерацію [95]. Раннє лізин-індуковане пошкодження мітохондрій та порушення активності АТФ-синтази призводять до розвитку гострого панкреатиту [17].

Ведення 3 г/кг гістидину не впливало на підшлункову залозу щурів [16], однак, використання двох ін'єкцій 4 г/кг гістидину (з інтервалом 1 год) у мишей може індукувати гострий панкреатит [83; 205]. Відносно низька розчинність гістидину у фізіологічному розчині вимагає більшої кількості рідини для введення з більш високою концентрацією амінокислоти. Як і у випадку з іншими основними амінокислотами, цитозольний кальцій не був центральним медіатором мітохондріальної токсичності гістидину [18; 205]. Нокаут циклофіліну D захищає ацинарні клітини підшлункової залози від загибелі індукованої гістидином [205].

Панкреатит – це дегенеративний процес самоперетравлення з масовою втратою диференційованої екзокринної ацинарної тканини з послідовним регенеративним процесом. У людей гостре ураження екзокринної частини підшлункової залози змінює амінокислотний склад плазми крові [60; 162]. Тому амінокислотні добавки можуть бути корисними для лікування хворих з важким панкреатитом.

У доклінічних дослідженнях глютамін продемонстрував позитивний ефект на панкреатит у щурів [7], знижував рівень амілази та ліпази у сироватці крові, зменшував рівень запальних факторів та захищав слизову оболонку кишечника [109].

Ефект глютаміну на перебіг гострого панкреатиту у людей є суперечливим. У пацієнтів з гострим панкреатитом глютамін не змінював розвиток інфікованого некрозу і рівень внутрішньолікарняної смертності, але покращував функціонування органів і рівень біомаркерів запалення [7]. У іншому рандомізованому клінічному дослідженні раннє внутрішньовенне введення аланіл-глютамін дипептиду пацієнтам з важким гострим панкреатитом сприяло зменшенню ураження органів та ускладнень хвороби порівняно з групою пізнього лікування [200]. Оскільки аланіл-глютамін дипептид гідролізується до аланіну та глютаміну [206], механізм сприятливого ефекту лікування достеменно невідомий.

Цікаво, що лізин, який у високих концентраціях (2 г/кг) призводить до пошкодження ацинарних клітин підшлункової залози, у низькій дозі (10 мг/кг) зменшує ураження тканин підшлункової залози мишей, викликане аргініном, шляхом інгібування вивільнення запального цитокіну ІЛ-6 та посилення антиоксидантної активності [8].

З огляду на те, що амінокислоти відіграють важливу роль у функціонування підшлункової залози, але на сьогодні немає однозначного розуміння механізмів їхнього впливу, дослідження ефектів амінокислот на енергозабезпечення та життєздатність ацинарних клітин, дозволить модулювати панкреатичні процеси за різних станів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Умови утримання та основні засади поводження із тваринами при проведенні фізіологічних досліджень

У експериментах використовували щурів-самців лінії Wistar масою 250–300 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної кімнатної температури з 12-годинним циклом освітлення, з вільним доступом до води та стандартного корму (D-Мікс, Україна) (перед експериментом тварини голодували 18 год з вільним доступом до води).

Усі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Рада Європи № 123, Страсбург 1986) та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 26 лютого 2006 року). Протоколи експериментів були затверджені Комісією з біоетики Львівського національного університету імені Івана Франка.

2.2. Групи піддослідних тварин за дослідження впливу натрій пірувату на гострий панкреатит

Для дослідження впливу натрій пірувату за гострого L-аргінін-індукованого панкреатиту ми використали 3 групи дослідних тварин: контроль; тварини з гострим панкреатитом, індукованим L-аргініном та група L-аргінін-індукованого панкреатиту з подальшим введенням натрій пірувату.

L-аргінін-HCl розчиняли у фізіологічному розчині і доводили рН до 7,4 NaOH. Розчин L-аргініну готували перед кожним експериментом. Дві дози L-аргінін-HCl з розрахунку 2,5 г/кг маси тіла тварини вводили внутрішньоочеревинно з інтервалом в одну годину. Контрольним тваринам замість L-аргінін-HCl внутрішньоочеревинно вводили той самий об'єм фізрозчину [152]. Введення натрій пірувату розпочинали через 72 год після першої ін'єкції L-аргінін-HCl. Натрій піруват у загальній дозі 1 г / кг маси тіла

/ добу [207] вводили внутрішньоочеревинно три рази на добу о 8, 14 і 20 год протягом чотирьох днів поспіль. Контрольна група тварин і тварини з гострим панкреатитом, індукованим L-аргініном, замість натрій пірувату, отримували однаковий об'єм фізіологічного розчину (рис. 2.1).

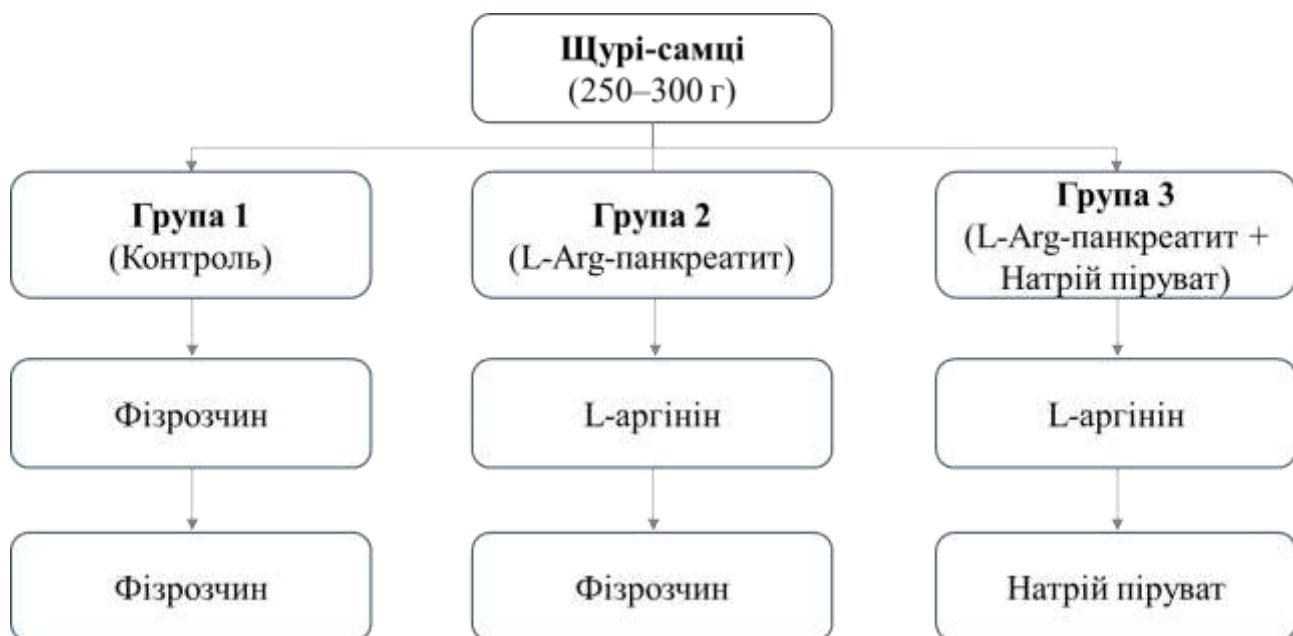


Рис. 2.1. Схема дослідження впливу натрій пірувату на L-аргінін-індукований гострий панкреатит

На 8-й день експерименту відбирали зразки підшлункової залози для гістологічного дослідження та електронної мікроскопії, а також кров для амінокислотного аналізу.

2.3. Ізолювання панкреатичних ацинусів

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримували з використанням колагенази (тип 4, 220 од./мл) за модифікованим методом Вільямса і співавт. [196], як було це описано раніше [3]. Клітини підраховували за допомогою гемоцитометра. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували трипановим синім (0,1 %-ний розчин). Після виділення ацинуси зберігали у базовому позаклітинному середовищі у відкритій конічній колбі.

Базовий позаклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0, глутамін – 2,0, натрій піруват – 2,0, глюкоза – 10,0; БСА – 2,5 мг/мл; соєвий інгібітор трипсину– 0,1 мг/мл та добавку незамінних амінокислот MEM; рН 7,4. У деяких експериментах амінокислотну добавку не використовували.

Базовий безсубстратний розчин містив всі складові базового позаклітинного розчину, окрім субстратів окиснення – глутаміну, натрій пірувату і глюкози.

2.4. Полярграфічне вимірювання швидкості споживання кисню

Клітинне дихання вивчали шляхом вимірювання швидкості споживання кисню за допомогою полярграфічної установки, яка включала: кисневий монітор (Biological oxygen monitor YSI 5300, США), електрод Кларка, закриту скляну термостатовану (37 °C) камеру об'ємом 1,6 мл і механічну мішалку. Перед вимірюванням дихання суспензію ацинусів підшлункової залози попередньо інкубували протягом 15, 30 або 60 хв за 37 °C в середовищі з окиснювальними субстратами та / або іншими досліджуваними речовинами. Протонофор карбонілціанід-р-трифторметоксифенілгідразон (FCCP) (0,5–2 мкмоль/л) використовували для досягнення максимальної частоти роз'єданого дихання, як описано раніше [111]. Частоту дихання спочатку нормалізували за кількістю клітин і масштабували відносно середньої базальної частоти дихання в контролі.

2.5. Кінетичний аналіз

Кінетичні параметри (V_{max} , $K_{0,5}$) розраховували за лінеаризацією Іді-Гофсті [112].

Для визначення ΔV_{max} від V_{max} віднімали значення базового рівня дихання без впливу амінокислоти (контроль) (рис. 2.2).

Крім того, використовували лінійну регресію в координатах Іді–Гофсті [49; 76].

$$v = -K_m * \left(\frac{v}{[S]}\right) + V_{max},$$

де v – швидкість дихання, K_m – константа Міхаеліса-Ментен, $[S]$ – концентрація субстрату, V_{max} – максимальна швидкість дихання.

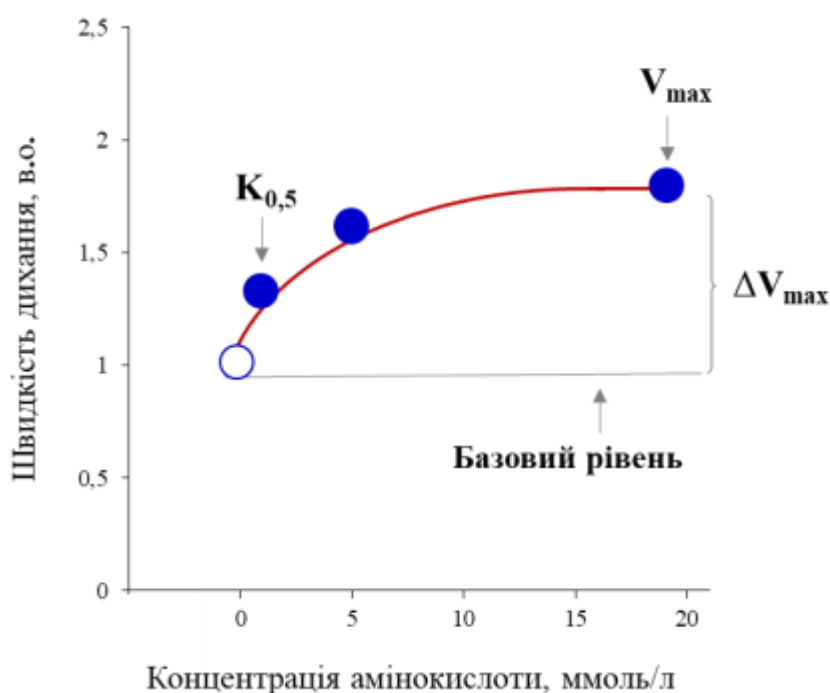


Рис. 2.2. Кінетичні параметри на графіку швидкості дихання за окиснення амінокислоти; біла крапка позначає контроль (без амінокислоти)

Кінетичні параметри рівняння Хілла розраховували в координатах Хілла або в координатах $\{v; v/[S]h\}$ (модифікованих координатах Іді–Гофсті) методом ітерації показника h [115]. Найкращу відповідність одержаної залежності експериментальним даним визначали за допомогою лінійної регресії. Тобто підбирали таке значення h , за якого коефіцієнт апроксимації R^2 був найближчим до 1 [115]. Вірогідність апроксимації визначали з допомогою F-статистики. Коефіцієнт апроксимації вважали вірогідним, якщо значення $P \leq 0,05$.

2.6. Флуоресцентна мікроскопія

Для дослідження ефекту ХЦК на морфологію і життєздатність панкреатичних ацинусів, клітини інкубували з ХЦК у базовому зовнішньоклітинному розчині за 37 °С впродовж 60 хв. Щоб виявити апоптоз, Анексин V-FITC (збудження 470–490 нм; випромінювання >515 нм) використовувався в комбінації з 4',6-діамідино-2-феніліндолом (DAPI) (збудження 340–390 нм; випромінювання >420 нм), який забарвлював лише некротичні клітини. Клітини, пофарбовані аннексином V-FITC, але не DAPI вважалися апоптичними. У іншій серії експериментів для підрахунку некротичних клітин використовували етидій бромід (збудження 340–390 нм; випромінювання >600 нм) у комбінації з Hoechst 33342 (збудження 340–390 нм; випромінювання >420 нм).

Для оцінки життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози за впливу амінокислот у високій концентрації (20 ммоль/л), ізольовані ацинуси підшлункової залози інкубували або в базовому позаклітинному розчині, що містить глюкозу (10 ммоль/л), або в середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (DMEM) з глюкозою (10 ммоль/л), але без глютаміну та пірувату. Досліджувані амінокислоти додавали у концентрації 20 ммоль/л. У планшет вносили 1 млн клітин на 2 мл базового середовища інкубації. Клітини інкубували у CO₂ інкубаторі Memmert ICO150 (Mettler, Швабах, Німеччина) впродовж 24 год. Мікроскопію виконували на 2, 4 та 24 год інкубації. Для фарбування ядер некротичних клітин використовували етидій бромід (збудження 340–390 нм; випромінювання >600 нм) і Hoechst 33258 (збудження >346 нм, емісія >460 нм) (рис. 2.3). Апоптоз оцінювали за наявністю клітин з конденсованими або фрагментованими ядрами.

Флуоресцентне зображення одержували за допомогою мікроскопа IX73 і камери DP-74 (Olympus, Токіо, Японія). Інтенсивність флуоресценції аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

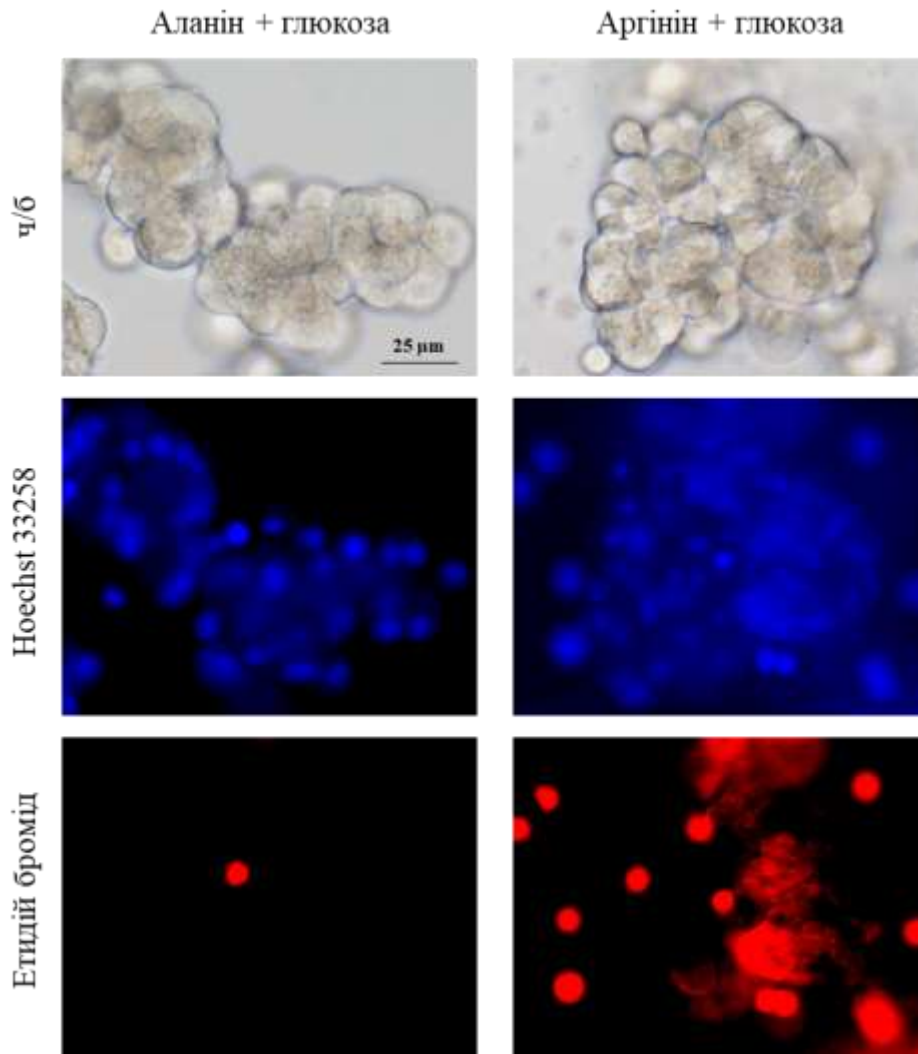


Рис. 2.3. Зображення світлової (ч/б) і флуоресцентної (Ноечст 33258 – фарбування всіх ядер, етидій бромід – забарвлення некротичних клітин) мікроскопії ацинусів підшлункової залози за впливу аланіну і аргініну на тлі глюкози; [аланін] = 20 ммоль/л, [аргінін] = 20 ммоль/л, [Ноечст 33258] = 0,5 мкг/мл, [етидій бромід] = 1 мкг/мл

Підрахунок блебінгу клітин проводили лише для периферичних клітин в ацинусах в одній фокальній площині. Для вивчення розміру клітин було виміряно два перпендикулярні діаметри клітин за допомогою програмного забезпечення CellSens Dimension. Площа клітини була розрахована за рівнянням:

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

де А – довжина малої, а В – великої осі.

У кожному експерименті аналізували усі ацинуси з принаймні 5 різних фотографій.

2.7. Виділення ДНК

Ізольовані ацинуси підшлункової залози осаджували центрифугуванням, лізували в буфері NP-40 (10 мкл на 10^6 клітин, мінімум 50 мкл) [72]. Супернатанти збирали після центрифугування протягом 5 хв при 1600 g. Екстракцію повторювали ще 3 рази з такою ж кількістю буфера для лізису. У експериментах з дослідженням впливу амінокислот у високій концентрації (20 ммоль/л) на панкреатичні ацинуси за довготривалої інкубації, проводили кислотну екстракцію ДНК розчином, що містив гуандин тіоціанат, натрій ацетат і фенол-хлороформ. Для забезпечення повного виділення ДНК використовували як нижню, так і інтерфазу, що містить нерозділені комплекси білок-ДНК.

До отриманих зразків додавали протеїназу К (кінцева концентрація 2,5 мкг/мл) у буфері SDS-натрій хлор-Tris-EDTA та інкубували за 50 °C впродовж 14 год. Після додавання 0,5 об'єму 10 ммоль/л амоній ацетату, ДНК осаджували 2,5 об'єму етанолу і розчиняли у Tris-Borate-EDTA буфері. Чистоту зразків ДНК вимірювали використовуючи спектрофотометр DeNovix DS-11+ (США). Показник A_{260}/A_{280} для одержаних зразків ДНК дорівнював від 1,8 до 2,0.

2.8. Кількісна оцінка фрагментації ДНК

Ізольовані панкреатичні ацинуси осаджували за допомогою центрифугування і суспендували у Tris-EDTA буфері для лізису, що містив 10 ммоль/л Tris (рН 7,5), 10 ммоль/л EDTA та 0,2 % (маса / об'єм) Triton X-100. Високо- та низькомолекулярну ДНК розділяли центрифугуванням зразків

протягом 15 хв при 13000 g. Супернатанти, що містили фрагментовану ДНК і гранули з високомолекулярною ДНК інкубували впродовж 14 год за 4 °С в 1 мл Tris-EDTA буферу для лізису та 0,25 мл 50 % (об'єм / об'єм) трихлороцтової кислоти. ДНК, як з супернатантів, так і з осадів, була гідролізована шляхом нагрівання за 70 °С протягом 20–25 хв в 1 мл 0,5 моль/л розчину HClO₄ і кількісно визначена дифеніламіновим методом Бертон (1 об'єм супернатанту змішували з 2-ма об'ємами дифеніламінового реагенту і фарбували 17 год, 25–30 °С). Фотометрію проводили за допомогою планшет-рідера (BіоТек, Вінускі, США) при 630 нм.

2.9. Електрофорез

Електрофорез проводили у 1 % агарозному гелі з використанням Tris-Borate-EDTA буферу з додаванням етидій броміду [106]. У комірки вносили навантажувальний буфер (6X), що містив 0,03 % бромфенолового синього, 0,03 % ксилол-ціанолу, 60 % гліцерину, 1% додецилсульфату натрію і 100 ммоль/л EDTA, додавали стандарт або досліджувані зразки ДНК. Розділення фрагментів ДНК проводили за напруги 70 В. Гель візуалізували під ультрафіолетом.

2.10. Хроматографічний аналіз амінокислот

До плазми крові додавали сульфосаліцилову кислоту, зберігали за 4 °С впродовж 1 доби для осадження білків. Після цього зразки центрифугували протягом 30 хв при 5000 об/хв, відбирали надосадову рідину і здійснювали амінокислотний аналіз.

Дослідження проводили з використанням рідинного хроматографа Waters, який складається з модуля розділення Alliance та діодноматричного детектора Waters 996. Для розділення амінокислот використовували колонку з стаціонарною фазою Luna C18 розміром 250*4,6 мм, з розмірами частинок 5 мкм та порами діаметром 100 Å. Мобільна фаза складалась з ацетонітрилу (Super Gradient; Macron) та 0,05 моль/л розчину натрію фосфату

однозаміщеного, з рН 2,0. Для розділення застосовували градієнтне елюювання. Швидкість подачі елюента була 1,0 мл/хв, амінокислоти детектували за довжини хвилі (лямбда) 350 нм. Дериватизацію амінокислот проводили з 2,4-динітро-1-флуорбензолом на водяній бані за 40 °С протягом 40 хв.

2.11. Гістологічне дослідження

Фрагменти підшлункової залози фіксували у формаліні, зневоднювали через спирт у зростаючих концентраціях та заливали у парафін, попередньо інкубуючи в ксилолі. Зрізи товщиною 5 мкм отримували за допомогою напівавтоматичного мікротому HistoRange з використанням алмазного ножа. Далі проводили фарбування гематоксиліном Ерліха та еозином (H&E). Одержані зразки аналізували та оцінювали за допомогою мікроскопа Olympus IX73 з використанням камери DP-74 (Olympus, Токіо, Японія).

2.12. Електронна мікроскопія

Фіксацію тканини підшлункової залози здійснювали 1,5 % розчином OsO₄ (SPI – CHEM USA) в 0,2 моль/л розчині какодилату натрію (Fluka, США) при рН 7,2 протягом 2–2,5 годин за 4 °С. Зразки зневоднювали у розчинах етанолу у зростаючих концентраціях (30 хв в кожному). Потім зразки інкубували в пропіленоксиді (Fluka, США) протягом 10 хв. Далі здійснювали заливку в епоксидні смоли Epon 812 (Fluka, США) і полімеризацію в термостаті за 60° С 24 год. Зрізи виготовляли на ультрамікротомі УМТП–6М з допомогою алмазного ножа (DIATOM). Контрастування зрізів в 1 % розчині уранілацетату та в контрастері здійснювали за Рейнольдсом [156]. Зрізи товщиною 100 нм досліджували з допомогою електронного трансмісійного мікроскопа TEM–100. Фотографували з використанням цифрової камери SONY – H9.

2.13. Оцінка активності амілази

Турбідиметричний кінетичний метод використовували для вимірювання активності альфа-амілази [185]. Метод заснований на зниженні каламутності, яке відбувається при розщепленні 1 % (маса / об'єм) суспензії крохмалю розчином альфа-амілази плазми. Поглинання вимірювали за 37°C при 300 нм за допомогою спектрофотометра Denovix DS-11+ (США) у скляній кюветі 10 мм.

2.14. Статистичний аналіз

Кожен експеримент проводили принаймні з трьома суспензіями ізолюваних панкреатичних ацинусів, отриманих від різних тварин (n завжди означає кількість тварин). Отримані результати досліджень опрацьовували статистично та здійснювали необхідні математичні розрахунки у програмі Microsoft Office Excel та за допомогою програмного забезпечення OriginPro 2018. Достовірність відмінності між групами для парних експериментів *in vitro* (коли клітини в кожній експериментальній групі отримані від однієї тварини) визначали за допомогою двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні, у разі значної взаємодії між факторами або в межах одного фактора з більш ніж двома рівнями, коли взаємодія не була доведена.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив амінокислот на дихання панкреатичних ацинусів *in vitro*

Амінокислоти широко застосовують як харчові добавки. Кілька амінокислот рекомендують або досліджують у терапії захворювань, серед яких: м'язові порушення, сепсис, множинні травми, цироз печінки, ниркова недостатність, екзема, хвороби пов'язані зі старінням і захворювання шлунково-кишкового тракту, зокрема, панкреатит [79].

Харчова підтримка за гострого панкреатиту відіграє важливу роль у запобіганні недоїдання, корекції негативного балансу азоту та зниженні частоти інфекційних ускладнень і смертності [198; 201]. Вплив високоенергетичної дієти на одужання від гострого панкреатиту активно вивчається [91; 118]. Амінокислотні добавки, здається, є життєздатною стратегією постачання необхідної енергії та метаболітів ацинарним клітинам підшлункової залози та полегшення гострого панкреатиту. Проте користь від введення амінокислот може бути переважена потенційними шкідливими ефектами, оскільки було показано, що певні амінокислоти у високих дозах є токсичними для підшлункової залози [17; 19; 125; 205].

Цікаво, що у моделях гострого панкреатиту використовують амінокислоти, які мають позитивно заряджені (основні) R-групи. Лізин має другу первинну аміногрупу в ϵ -положенні свого аліфатичного ланцюга, аргінін містить позитивно заряджену гуанідинову групу, а гістидин включає групу імідазолу [23].

Оскільки більшість метаболічних шляхів амінокислот локалізовані у цитозолі та мітохондріях клітин [63], а пошкодження мітохондрій є центральною подією за амінокислот-індукованого панкреатиту [17; 18; 99], ми досліджували вплив амінокислот на поглинання кисню мітохондріями панкреатичних ацинусів.

Панкреатичні ациноси виділяли з нормальної підшлункової залози щура. У контролі виділені клітини інкубували у базовому безсубстратному розчині або у середовищі з глюкозою за 37 °С протягом 15 хв. У експериментах до середовища інкубації додавали досліджувані амінокислоти у концентрації 0,1, 1, 5 або 20 ммоль/л (глутамат у концентрації 1, 5 і 20 ммоль/л). Клітини переносили у полярографічну комірку, реєстрували базальну швидкість дихання, після цього у комірку вносили FCCP у зростаючих концентраціях (0,5, 1, 1,5, 2 мкмоль/л).

3.1.1. Ефект глутамінової кислоти на дихання панкреатичних ациносів

Глутамат бере участь у різних метаболічних шляхах. Він є попередником для синтезу метаболітів, нейромедіаторів і антиоксидантів. Глутамінова кислота також є попередником для біосинтезу амінокислот, таких як пролін і аргінін [203].

Глутамат є замінною амінокислотою, яка може синтезуватися в організмі з глутаміну, аланіну або аспарагінової кислоти [203]. Глутамінази 1 і 2 відповідають за дезамінування глутаміну з утворенням глутамату і аміаку. Глутамат-піруват-трансамінази каталізують оборотний транспорт аміногрупи від аланіну до α -кетоглутарату, утворюючи глутамат і піруват. Аспартатамінотрансферази беруть участь в оборотному перенесенні аміногрупи від аспартату до α -кетоглутарату, утворюючи глутамат та оксалоацетат. Крім того, аспарагінсинтетаза може синтезувати глутамінову кислоту і аспарагін з глутаміну і аспартату [9].

Відомо, що у екзокринних ацинарних клітинах підшлункової залози глутамінова кислота синтезується з глутаміну і активно секретується у панкреатичний сік. Вважається, що секретований глутамат відіграє важливу роль в підтримці гомеостазу тонкої кишки під час недоїдання [9]. Також раніше

було показано, що глутамат істотно збільшує максимальну швидкість роз'єданого дихання в ізольованих ацинусах підшлункової залози щурів [111].

Ми досліджували ефект глутамінової кислоти у концентрації 1, 5 і 20 ммоль/л на процеси мітохондріального окиснення у панкреатичних ацинусах як за відсутності альтернативних субстратів окиснення, так і за наявності глюкози.

У всіх експериментах глутамінова кислота істотно не впливала на базальну швидкість дихання, але мала значний дозозалежний ефект на роз'єдане дихання ізольованих панкреатичних ацинусів.

Протонофор FCCP у найнижчій концентрації (0,5 мкмоль/л) сприяв збільшенню інтенсивності поглинання кисню за окиснення глутамінової кислоти у всіх досліджуваних концентраціях на тлі ендогенних субстратів від 20,7 % до 41,7 % ($P < 0,05$) у порівнянні з контролем (рис. 3.1 А). За стимуляції мітохондріального окиснення 1 мкмоль/л FCCP швидкість дихання за інкубації клітин з глутаміновою кислотою у концентрації 5 і 20 ммоль/л збільшилась на 58,6 % ($P < 0,05$) і 107,4 % ($P < 0,05$) відповідно, у порівнянні зі швидкістю дихання за окиснення ендогенних субстратів (рис. 3.1 А). Подальше підвищення концентрації FCCP до 1,5 мкмоль/л збільшило швидкість роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів за окиснення глутамінової кислоти у концентрації 1, 5 і 20 ммоль/л на 34,4 % ($P < 0,05$), 91,4 % ($P < 0,05$) і 168,5 % ($P < 0,05$) відповідно, у порівнянні з контролем (рис. 3.1 А). За інкубації клітин з глутаматом у концентрації 5 і 20 ммоль/л FCCP у найвищій концентрації сприяв інтенсифікації поглинання кисню на 114,4 % ($P < 0,05$) і 192,7 % ($P < 0,05$) відповідно, відносно дихання за окиснення ендогенних субстратів (рис. 3.1 А).

За наявності у середовищі інкубації глюкози, спостерігали підвищення швидкості дихання панкреатичних ацинусів за окиснення глутамату у всіх досліджуваних концентраціях за дії 1–2 мкмоль/л FCCP (рис. 3.1 Б). Інтенсивність споживання кисню за окиснення глутамінової кислоти зростала за дії FCCP у концентрації 1 мкмоль/л на 30,9–66,8 % ($P < 0,05$), 1,5 мкмоль/л –

на 36,6–95,8 % ($P < 0,05$) і 2 мкмоль/л – на 62,6–130,7 % ($P < 0,05$) відносно контролю (рис. 3.1 Б).

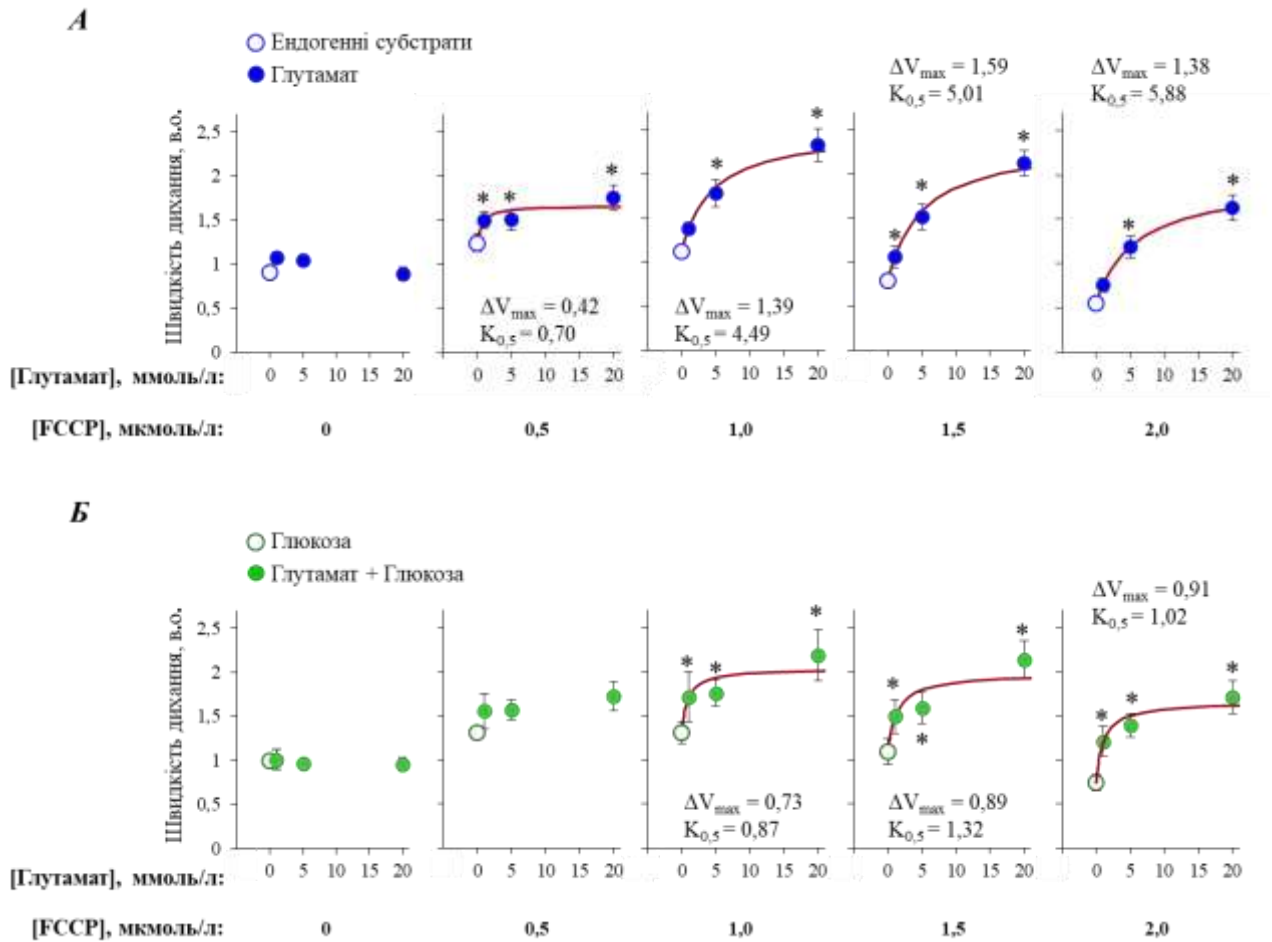


Рис. 3.1. Вплив глутамінової кислоти на швидкість базального ([FCCP] = 0) і роз'єданого ([FCCP] = 0,5–2 мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: [глюкоза] = 10 ммоль/л; [глутамінова кислота] = 1, 5 чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без глутамінової кислоти); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 5-6$

У досліджуваному діапазоні концентрацій FCCP кінетична залежність дихання за окиснення глутамату описувалась рівнянням Міхаеліса–Ментен.

Уявна константа напівактивації дихання ($K_{0,5}$) зростала від 0,70 ммоль/л за дії 0,5 мкмоль/л FCCP до 5,88 ммоль/л за дії 2 мкмоль/л FCCP. ΔV_{\max} була в діапазоні 0,42–1,59 в.о. (рис. 3.1 А). У разі окиснення глутаміну на тлі глюкози $K_{0,5}$ дорівнювала 0,87–1,32 ммоль/л, а ΔV_{\max} зростала від 0,73 до 0,91 в.о. (рис. 3.1 Б).

Отримані нами результати свідчать про те, що глутамінова кислота може активно вступати у процеси мітохондріального окиснення як за відсутності, так і за наявності додаткового джерела енергії. Ймовірно, глутамат у екзокринній частині підшлункової залози метаболізується під дією глутаматдегідрогенази до α -кетоглутарату, який вступає у ЦТК [203].

3.1.2. Споживання кисню панкреатичними ацинусами за впливу глутаміну

Глутамін – багатофункціональна амінокислота. Крім синтезу білка, він є анаплеротичним субстратом для ЦТК. Також глутамін виступає обов'язковим донором азоту для біосинтезу пуринів, піримідинів, НАД, аспарагіну та гексозамінів через свою кінцеву амідну групу. Глутамін стимулює поглинання незамінних амінокислот, активує транскрипційний фактор mTOR, допомагає утилізувати надлишок аміаку та глутамату і регулює окисно-відновний гомеостаз [21]. Глутамін істотно збільшує максимальне роз'єднане дихання в ізольованих ацинусах підшлункової залози щурів [111].

Рівень глутаміну знижується у плазмі крові хворих з важким гострим панкреатитом [103]. Використання екзогенного глутаміну для лікування важкого гострого панкреатиту у людей показало суперечливі результати [10; 48]. Тоді як раннє введення аланіл-глутаміну (дипептиду, який складається з аланіну і глутаміну) було ефективним для зменшення ураження органів та ускладнень хвороби порівняно з групою пізнього лікування [200].

Ми вивчали ефект глутаміну у концентрації 0,1, 1, 5 і 20 ммоль/л на дихання панкреатичних ацинусів щурів.

За допомогою ANOVA з повторюваними вимірюваннями виявлено взаємодію двох факторів у разі внесення глютаміну до базового зовнішньоклітинного середовища інкубації без або з глюкозою (рис. 3.2).

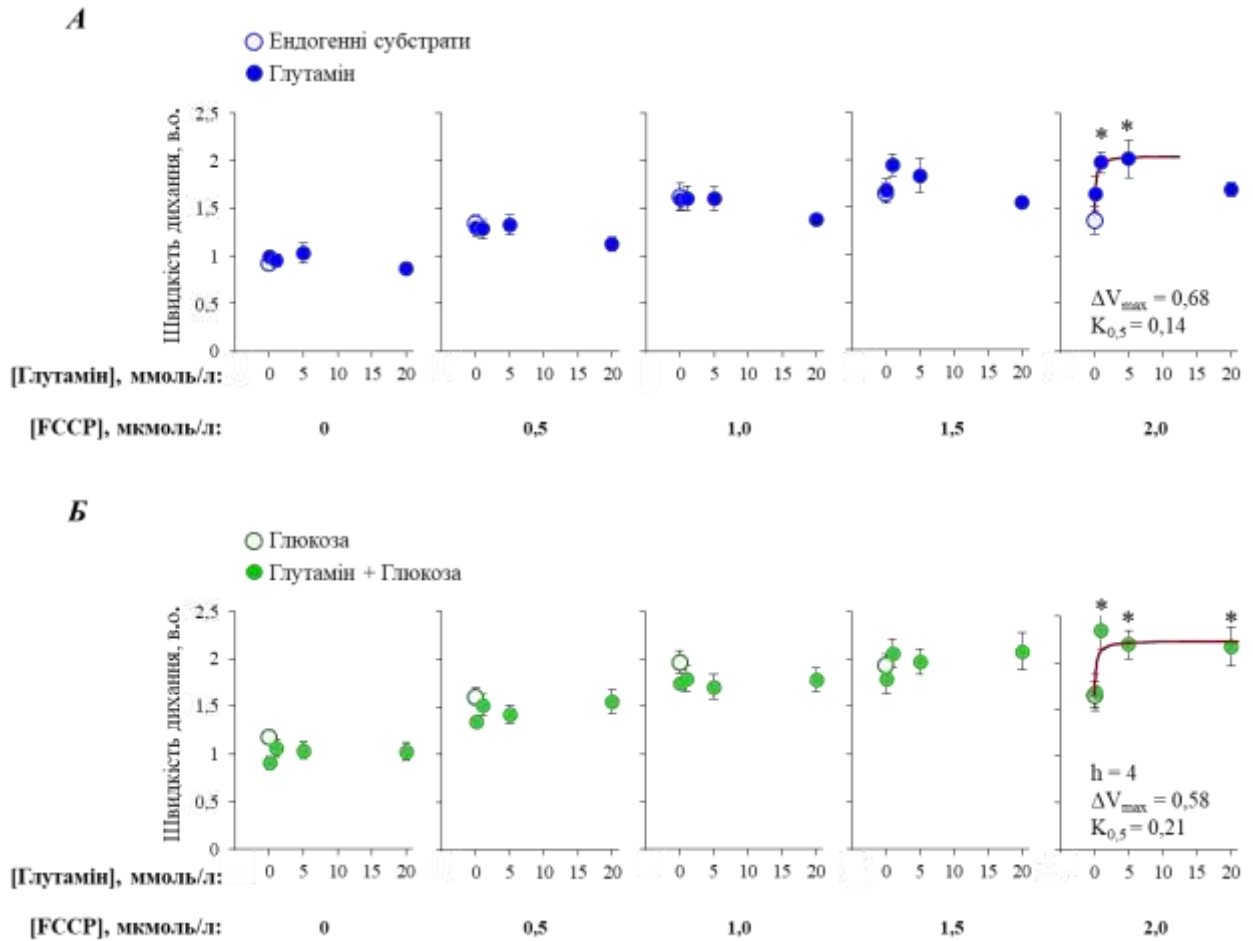


Рис. 3.2. Вплив глютаміну на швидкість базального ($[FCCP] = 0$) і роз'єданого ($[FCCP] = 0,5-2$ мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: $[глюкоза] = 10$ ммоль/л; $[глютамін] = 0,1, 1, 5$ чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без глютаміну); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 8$

Під час окиснення глютаміну у концентрації 1 і 5 ммоль/л швидкість FCCP-стимульованого дихання (2 мкмоль/л) збільшувалась на 44,6 % ($P < 0,05$)

і 44,3 % ($P < 0,05$) відповідно, порівняно зі швидкістю дихання за окиснення ендогенних субстратів (рис. 3.2 А). За наявності у середовищі інкубації глюкози глютамін у концентрації 1, 5 і 20 ммоль/л підвищував FCCP-стимульовану швидкість дихання (2 мкмоль/л) мітохондрій панкреатичних ацинусів на 41,3 % ($P < 0,05$), 32,5 % ($P < 0,05$) і 31,1 % ($P < 0,05$) відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.2 Б).

За окиснення глютаміну на тлі ендогенних субстратів під дією 2 мкмоль/л FCCP $K_{0,5}$ становила 0,14 ммоль/л, а $\Delta V_{\max} = 0,68$ в.о. (рис. 3.2 А). За інкубації ацинусів з глютаміном на тлі глюкози під впливом FCCP у концентрації 2 мкмоль/л кінетичні параметри становили: $K_{0,5} = 0,21$ ммоль/л, а $\Delta V_{\max} = 0,58$ в.о. ($h = 4$) (рис. 3.2 Б).

Отже, глютамін сприяє збільшенню швидкості роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози як на тлі ендогенних субстратів, так і на тлі глюкози.

Мітохондріальний глютамін може катаболізуватись ферментом глютаміназою, яка регулює перетворення глютаміну в глютамат шляхом вивільнення іону амонію. Потім глютамат перетворюється на α -кетоглутарат за допомогою глютаматгідрогенази 1 або кількох мітохондріальних амінотрансфераз. Мітохондріальний α -кетоглутарат може брати участь у ЦТК, підтримуючи шлях окисного фосфорилування або відновного карбоксилювання [166].

3.1.3. Дихання панкреатичних ацинусів за впливу аланіну

Аланін відіграє важливу роль у перенесенні аміаку від тканин до печінки. Глюкоза поглинається м'язами і розкладається шляхом гліколізу до пірувату, який може бути акцептором аміногрупи з утворенням аланіну. У печінці аланін негативно регулює піруваткіназу та бере участь у глюконеогенезі за умов дефіциту поживних речовин [124]. Взаємоперетворення аланін-піруват

каталізується ферментом аланінтрансаміназою, що експресується в печінці [122].

Аланін бере участь в регенерації острівців Лангерганса, захищає β -клітини підшлункової залози від апоптозу, зумовленого прозапальними цитокінами [39; 42]. Проте, на сьогодні мало відомо про катаболізм аланіну в ацинарних клітинах підшлункової залози. З огляду на це, ми досліджували зміну швидкості дихання панкреатичних ацинусів за впливу аланіну (0,1–20 ммоль/л).

Використання двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні дозволило виявити взаємодію двох факторів у разі внесення аланіну до середовища інкубації без альтернативних субстратів окиснення або з глюкозою.

Під час окиснення аланіну у концентрації 0,1 ммоль/л швидкість дихання, стимульованого найнижчою концентрацією FCCP (0,5 мкмоль/л), зростала на 16,5 % ($P < 0,05$) порівняно з відповідною швидкістю дихання за окиснення ендогенних субстратів (рис. 3.3 А). За інкубації клітин з 5 ммоль/л аланіну внесення у полярографічну комірку FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л сприяло збільшенню швидкості поглинання кисню мітохондріями панкреатичних ацинусів на 41,2 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем (рис. 3.3 А). За окиснення аланіну у концентрації 5 і 20 ммоль/л швидкість FCCP-стимульованого дихання (2 мкмоль/л) зростала на 95,8 % ($P < 0,05$) і 77,3 % ($P < 0,05$) відповідно, у порівнянні з використанням безсубстратного розчину (рис. 3.3 А).

За наявності у середовищі інкубації глюкози аланін у концентрації 20 ммоль/л підвищував FCCP-стимульовану швидкість дихання (2 мкмоль/л) мітохондрій панкреатичних ацинусів на 75,0 % ($P < 0,05$) у порівнянні з контролем (рис. 3.3 Б).

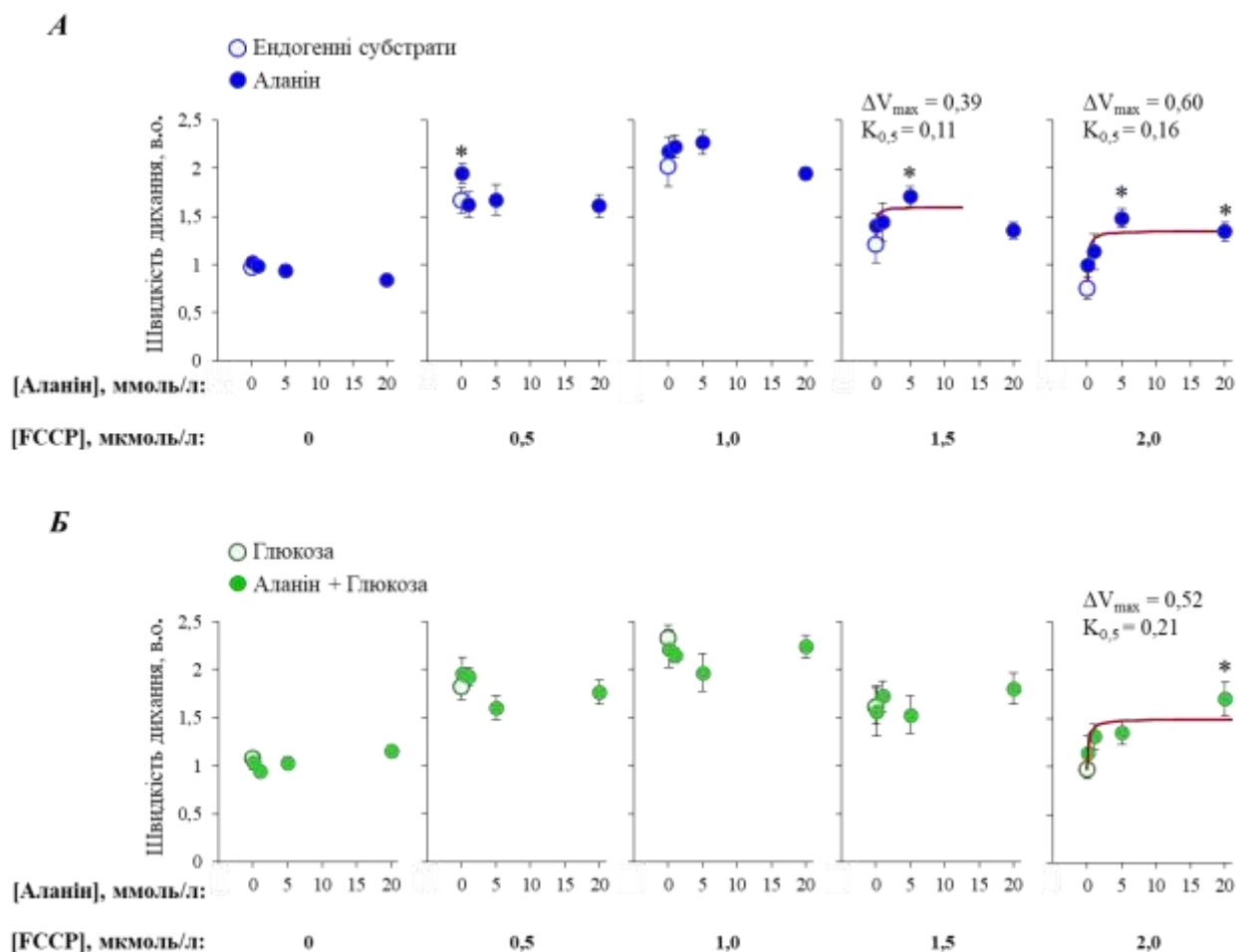


Рис. 3.3. Вплив аланіну на швидкість базального ([FCCSR] = 0) і роз'єданого ([FCCSR] = 0,5–2 мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: [глюкоза] = 10 ммоль/л; [аланін] = 0,1, 1, 5 чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без аланіну); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 6$

Кінетичні параметри за окиснення аланіну залежали від концентрації FCCSR. За окиснення аланіну на тлі ендогенних субстратів за впливу 1,5 мкмоль/л FCCSR $K_{0,5}$ становила 0,11 ммоль/л, а за впливу 2 мкмоль/л FCCSR – $K_{0,5} = 0,16$ ммоль/л (рис. 3.3 А). ΔV_{\max} зростає від 0,39 до 0,60 в.о. внаслідок підвищення концентрації FCCSR від 1,5 до 2 мкмоль/л відповідно (рис. 3.3 А). За

наявності у середовищі інкубації аланіну і глюкози за дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л $K_{0,5} = 0,21$ ммоль/л, а $\Delta V_{\max} = 0,52$ в.о. (рис. 3.1 Б).

Отже, аланін у досліджуваних концентраціях окиснюється у ацинарних клітинах підшлункової залози, про що свідчить збільшення роз'єданого дихання за впливу аланіну як на тлі ендогенних субстратів, так і на тлі глюкози.

3.1.4. Вплив лізину на дихання панкреатичних ацинусів щурів

Лізін, залежно від дози, чинить як негативний, так і позитивний вплив на підшлункову залозу. Лізін у високій концентрації (2 г/кг) призводить до гострого панкреатиту, ймовірно шляхом порушення функціонування мітохондрій [17]. На мишачій моделі L-аргінін-індукованого панкреатиту було показано захисний вплив лізину у низькій концентрації (10 мг/кг) на тканини підшлункової залози [8].

Оскільки відомо, що деградація лізину в основному проходить в печінці [74], ми вирішили перевірити чи окиснюється лізін у ацинарних клітинах підшлункової залози.

За окиснення лізину у концентрації 5 і 20 ммоль/л швидкість дихання за стимуляції FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л збільшувалась на 51,4 % ($P < 0,05$) і 42,6 % ($P < 0,05$) відповідно, порівняно зі швидкістю дихання за окиснення ендогенних субстратів (рис. 3.4 А). За інкубації панкреатичних ацинусів з лізином у концентрації 20 ммоль/л FCCP у найвищій концентрації (2 мкмоль/л) інтенсифікував частоту дихання на 52,3 % ($P < 0,05$) відносно контролю (рис. 3.4 А). Лізін у концентрації 5 ммоль/л на тлі глюкози підвищував швидкість дихання стимульовану 2 мкмоль/л FCCP на 43,3 % ($P < 0,05$) у порівнянні зі швидкістю дихання за окиснення глюкози (рис. 3.4 Б).

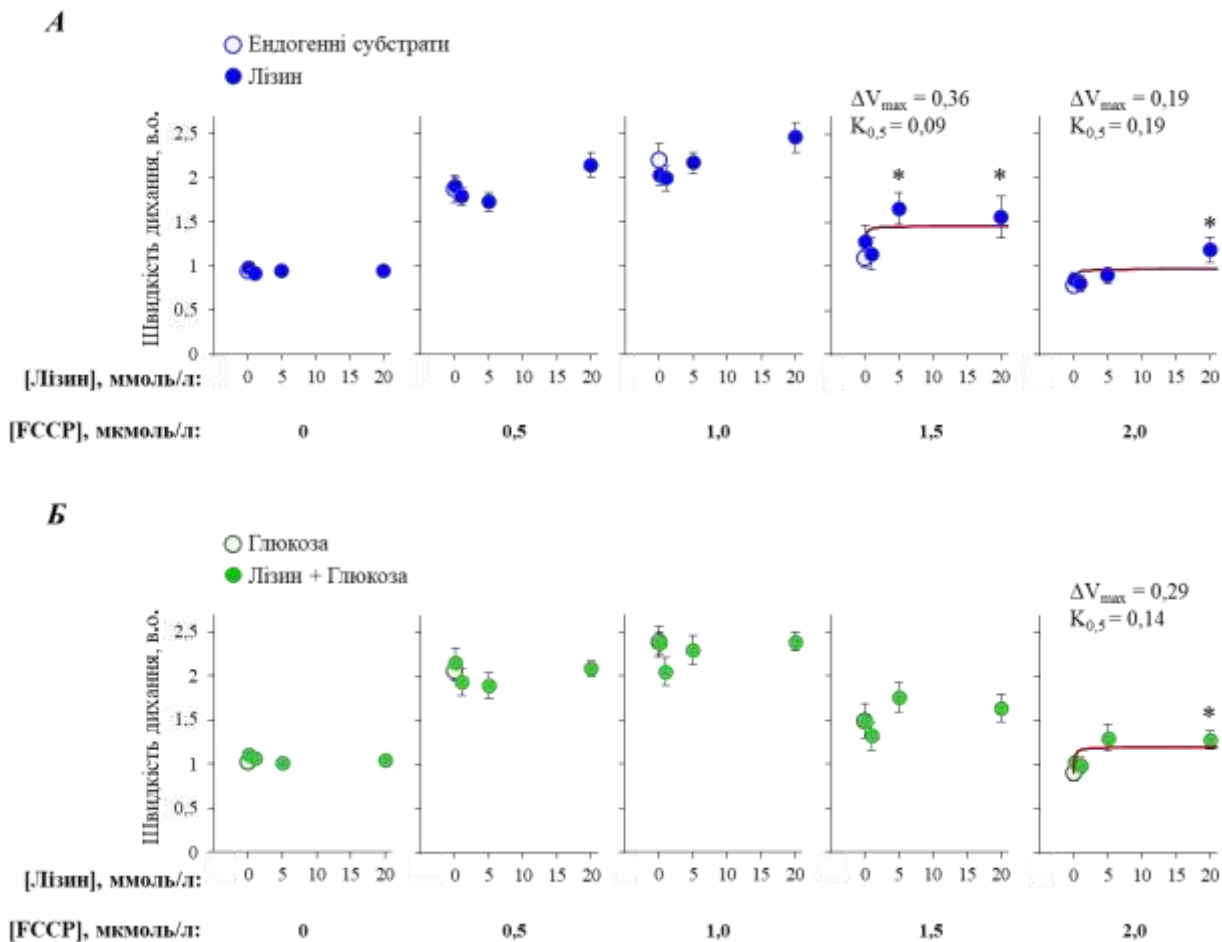


Рис. 3.4. Вплив лізину на швидкість базального ($[FCCSR] = 0$) і роз'єданого ($[FCCSR] = 0,5-2$ мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: $[глюкоза] = 10$ ммоль/л; $[лізин] = 0,1, 1, 5$ чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без лізину); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 9$

За окиснення лізину на тлі ендогенних субстратів за дії $1,5$ мкмоль/л FCCSR кінетичні параметри дорівнювали: $K_{0,5} = 0,09$ ммоль/л, а $\Delta V_{max} = 0,36$ в.о. (рис. 3.4 А); тоді як за дії 2 мкмоль/л FCCSR $K_{0,5}$ зросла до $0,19$ ммоль/л, а ΔV_{max} знизилась до $0,19$ в.о. За інкубації клітин з лізином на тлі глюкози за впливу $1,5$ мкмоль/л FCCSR $K_{0,5} = 0,14$ ммоль/л, а $\Delta V_{max} = 0,19$ в.о. (рис. 3.4 Б).

Встановлено, що лізин на тлі ендogenous субстратів збільшує швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози, стимульовану FCCP у концентрації 1,5 і 2 мкмоль/л. Лізин на тлі глюкози інтенсифікує швидкість споживання кисню мітохондріями лише за стимуляції дихання FCCP у концентрації 2 мкмоль/л.

Ймовірно, у мітохондріях ацинарних клітин підшлункової залози, подібно до мітохондрій клітин печінки, функціонує сахаропіновий шлях катаболізму лізину [74], під час якого лізин перетворюється до α -аміноадипату [84]. Сахаропіновий шлях складається з трьох ферментативних реакцій, що каталізуються біфункціональним ферментом лізин-кетоглутаратредуктазою / сахаропіндегідрогеназою (LKR / SDH) і ферментом α -аміноадипат-семіальдегіддегідрогеназою (AASADH). Домен LKR, високу активність якого виявлено у підшлунковій залозі тварин [110], конденсує лізин і α -кетоглутарат у сахаропін. Домен SDH гідролізує сахаропін з утворенням глутамату та α -аміноадипат-напівальдегіду, останній з яких окиснюється до α -аміноадипату за допомогою AASADH [67]. α -аміноадипат катаболізується до α -кетoadипату шляхом оборотного трансамінування α -кетоглутаратом, утворюючи глутамат, під впливом α -аміноадипатамінотрансферази (AADAT), яка, як відомо, експресується в підшлунковій залозі [61]. α -кетoadипат через ряд біохімічних реакцій піддається розщепленню до глутарил-КоА, тоді до ацетоацетил-КоА, з подальшим утворенням ацетил-КоА [120].

3.1.5. Дихання панкреатичних ацинусів за окиснення аспарагінової кислоти

Секрет підшлункової залози містить аспарагінову кислоту у високій концентрації [9]. Синтез аспарагінової кислоти в мітохондріях ініціюється піруваткарбоксилазою, яка перетворює піруват в оксалоацетат. Потім оксалоацетат перетворюється в аспартат за допомогою аспартатамінотрансферази [63].

Оскільки наразі не відомо чи відбувається катаболізм аспарагінової кислоти у ацинарних клітинах підшлункової залози, ми вивчали ефект аспартату на мітохондріальне окиснення (рис. 3.5).

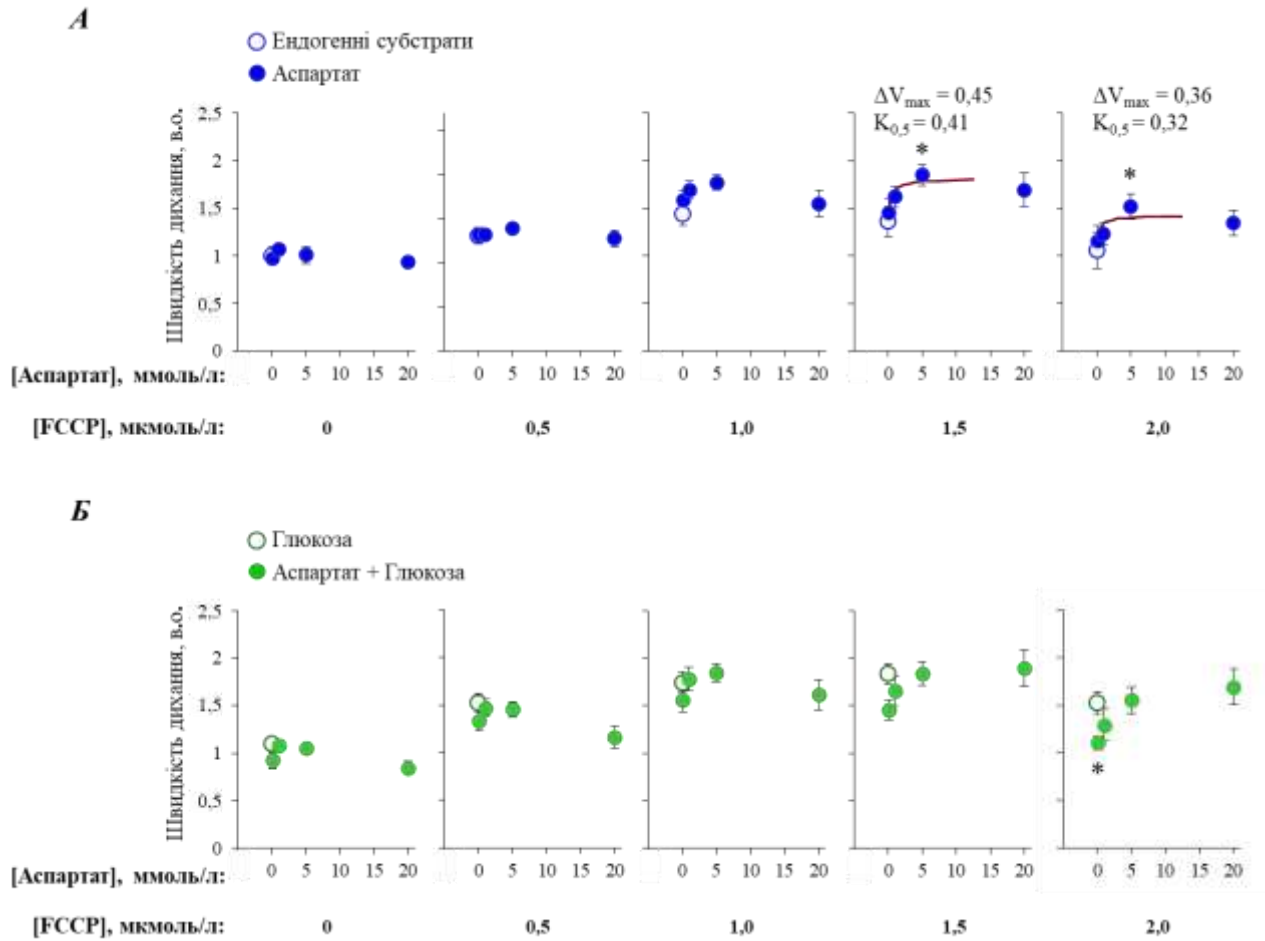


Рис. 3.5. Вплив аспарагінової кислоти на швидкість базального ($[FCCP] = 0$) і роз'єданого ($[FCCP] = 0,5\text{--}2$ мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: $[глюкоза] = 10$ ммоль/л; $[аспарагінова\ кислота] = 0,1, 1, 5$ чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без аспарагінової кислоти); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 6$

За окиснення аспарагінової кислоти у концентрації 5 ммоль/л на тлі ендогенних субстратів швидкість дихання, стимульованого 1,5 і 2 мкмоль/л FCCP, зростала на 35,7 % ($P < 0,05$) і 42,3 % ($P < 0,05$) відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.5 А). Аспарагінова кислота у концентрації 0,1 ммоль/л на тлі глюкози статистично вірогідно зменшувала інтенсивність споживання кисню за впливу FCCP у концентрації 2 мкмоль/л на 28,0 % ($P < 0,05$) у порівнянні з контролем (рис. 3.5 Б).

Нами встановлено, що за окиснення аспарагінової кислоти на тлі ендогенних субстратів за впливу FCCP у концентрації 1,5 і 2 мкмоль/л $K_{0,5}$ становила 0,41 ммоль/л і 0,32 ммоль/л відповідно (рис. 3.5 А). ΔV_{\max} знизилась від 0,45 до 0,36 в. о. за впливу FCCP у концентрації 1,5 і 2 мкмоль/л відповідно (рис. 3.5 А).

Отже, аспарагінова кислота підвищує окисну здатність мітохондрій за відсутності у середовищі інкубації альтернативних субстратів окиснення.

Аспартат відіграє ключову роль у аспартат-глутаматному шляху метаболізму амінокислот, слугуючи загальним попередником основних амінокислот і може бути перетворений на глутамат і аспарагін. Трансамінази можуть передавати аміногрупу аспартату до α -кетоглутарату з утворенням глутамату [155]. Крім того, аспарагінова кислота також може катаболізуватися до органічних кислот (наприклад, оксалоацетат) за допомогою каталітичної активності ферментів, включаючи аспартатамінотрансферазу. Аспартатамінотрансфераза каталізує оборотну реакцію трансамінування, в результаті якої оксалоацетат і глутамат перетворюються на аспартат і α -кетоглутарат. Схоже, що напрямок реакції визначається концентраціями аспартату (0–20 мкмоль/л) і глутамату (125–150 мкмоль/л) у плазмі крові, значеннями константи Міхаеліса для обох амінокислот, а також використанням аспартату у багатьох важливих метаболічних процесах [140].

3.1.6. Вплив аспарагіну на дихання панкреатичних ацинусів

Підшлункова залоза і печінка узгоджено функціонують для підтримки гомеостазу аспарагіну в плазмі крові. Умовно незамінна амінокислота аспарагін може бути синтезована з глутамінової кислоти за допомогою цитозольного ферменту аспарагінсинтетази [81]. Підшлункова залоза має найвищу експресію аспарагінсинтетази з усіх органів, і може додатково регулювати експресію ферменту в умовах дефіциту амінокислот [181]. Функція аспарагінсинтетази полягає в постачанні аспарагіну необхідного для синтезу білків. Підшлункова залоза здатна функціонувати як депо для зберігання аспарагіну в станах, коли концентрація амінокислоти в крові є надлишковою. На відміну від печінки, підшлункова залоза не вивільняє аспарагін у кров, коли концентрація амінокислоти є нижче норми [127].

Зниження рівня аспарагіну, викликане аспарагіназою, ферментом, що перетворює аспарагін на аспарагінову кислоту і аміак, за дитячого гострого лімфоблстозного лейкозу пов'язане з виникненням панкреатиту у 5-10 % пацієнтів [139].

Ми досліджували зміну швидкості дихання панкреатичних ацинусів за впливу аспарагіну (0,1, 1, 5 і 20 ммоль/л) на тіл ендогенних субстратів або глюкози.

Статистично достовірної зміни швидкості базального або FCCP-стимульованого дихання панкреатичних ацинусів не виявлено за інкубації з аспарагіном у діапазоні досліджуваних концентрації як на тлі окиснення ендогенних субстратів, так і на тлі глюкози (рис. 3.6 Б).

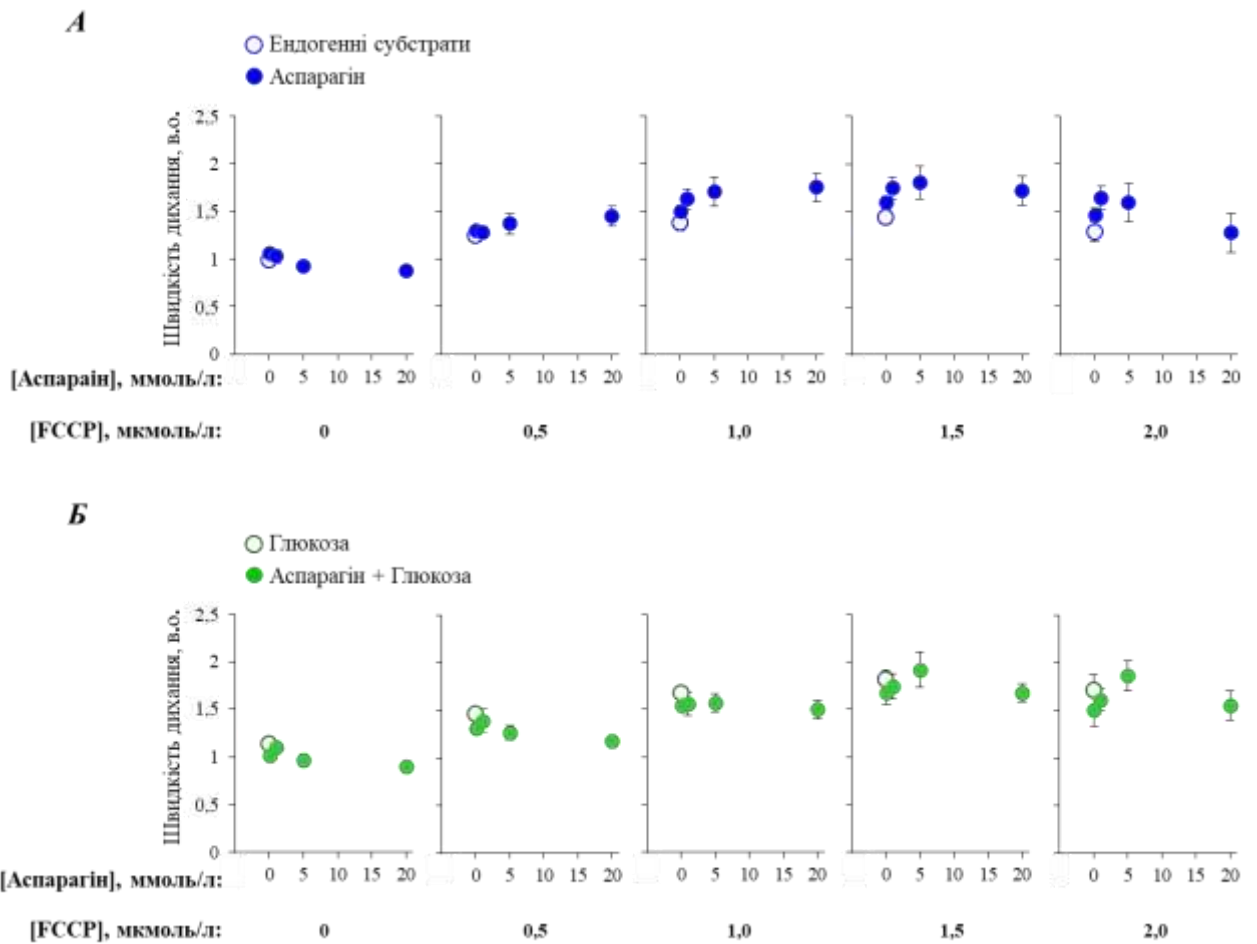


Рис. 3.6. Вплив аспарагіну на швидкість базального ($[FCCSP] = 0$) і роз'єданого ($[FCCSP] = 0,5\text{--}2$ мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: $[глюкоза] = 10$ ммоль/л; $[аспарагін] = 0,1, 1, 5$ чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без аспарагіну); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 8$

Кінетичний аналіз не виявив залежності швидкості реакції від концентрації аспарагіну як та тлі ендогенних субстратів, так і на тлі глюкози.

Відсутність зміни швидкості базального та FCCSP-роз'єданого дихання за інкубації панкреатичних ацинусів з аспарагіном свідчить про те, що аспарагін

не залучений у процеси мітохондріального окиснення ацинарних клітин підшлункової залози.

3.1.7. Дихання панкреатичних ацинусів за впливу аргініну

Аргінін, напівзамінна або умовно незамінна амінокислота в організмі людини, є однією з найбільш метаболічно універсальних амінокислот і служить попередником для синтезу сечовини, оксиду азоту, поліамінів, проліну, глутамату, креатину та агматину. Аргінін метаболізується через складний і високорегульований набір шляхів, які залишаються не повністю вивченими як на рівні всього організму, так і на клітинному рівні. Чотири ферменти використовують аргінін як субстрат: аргініндекарбоксилаза, аргінін-гліцинамідінотрансфераза, аргіназа та NO-синтаза [130].

Високі дози аргініну широко використовують для індукції гострого панкреатиту у гризунів. Раніше досліджено, що аргінін-зумовлене пошкодження підшлункової залози може бути пов'язаним з метаболізмом аргініну до орнітину за участю аргінази [205]. Крім того, оксид азоту, який утворюється в результаті перетворення аргініну на цитрулін за участю NO-синтази, також бере участь у реалізації токсичного ефекту аргініну [28].

Незворотне пошкодження мітохондрій є ключовою подією у розвитку панкреатиту, спричиненого аргініном. У тваринній моделі аргінін-індукованого панкреатиту спостерігали інгібування відновлення $\Delta\Psi_m$ ізольованих мітохондрій після додавання АДФ та прогресуюче зниження базального потенціалу [18].

Ми досліджували вплив аргініну на тлі ендогенних субстратів або глюкози на базальну та FCCP-стимульовану швидкість дихання панкреатичних ацинусів.

Взаємодію двох факторів з використанням ANOVA з повторами з коригованим пост-hoc t-тестами Голм-Бонферроні було виявлено лише за окиснення аргініну на тлі ендогенних субстратів. За окиснення аргініну у

концентрації 5 ммоль/л FCCP у концентрації 1 мкмоль/л збільшував інтенсивність споживання кисню панкреатичними ацинусами на 22,3 % ($P < 0,05$) у порівнянні з контролем (рис. 3.7 А). За окиснення аргініну у концентрації 0,1, 1 і 20 ммоль/л на ендогенних субстратах статистично вірогідної зміни швидкості базального та FCCP-стимульованого дихання не зареєстровано (рис. 3.7 А).

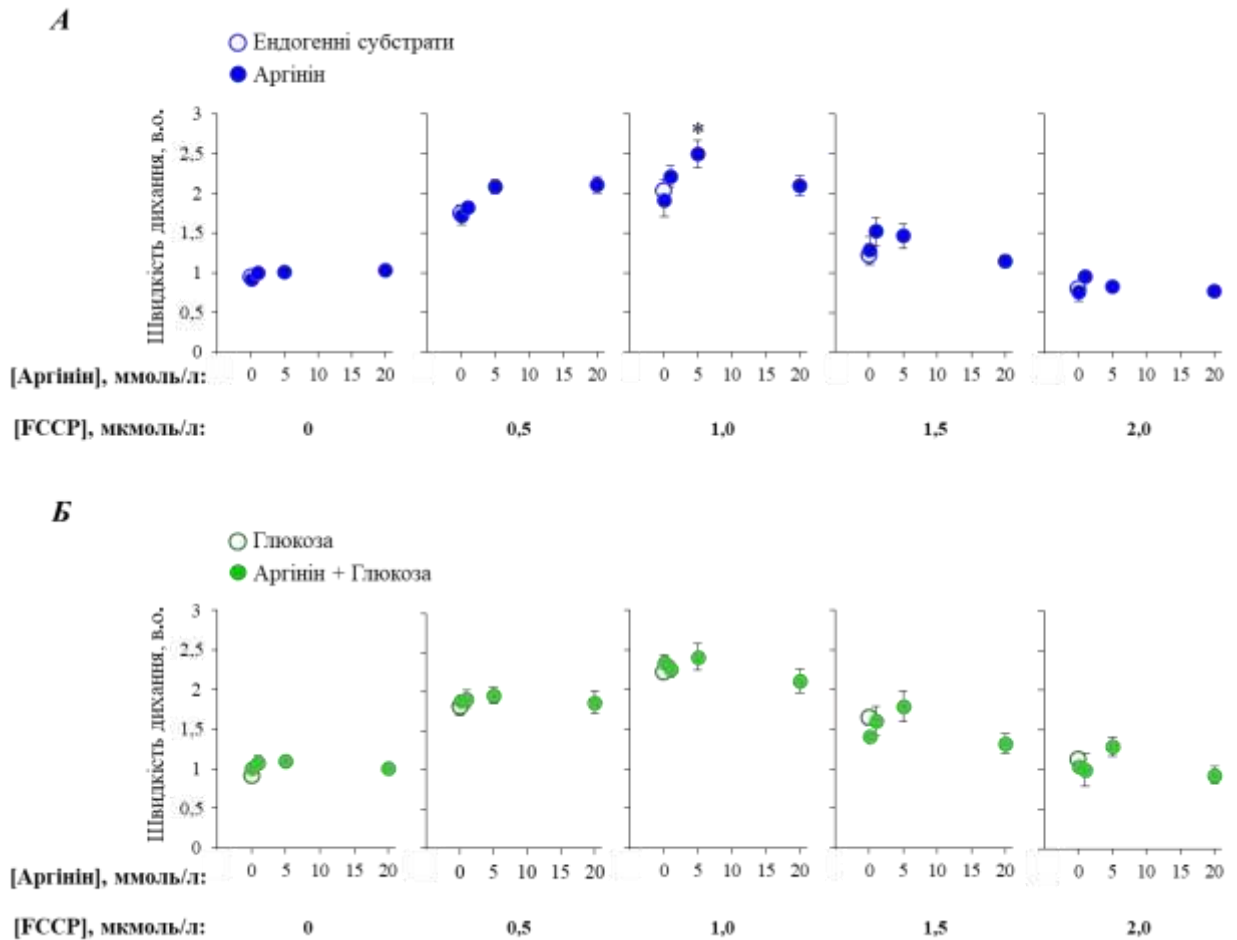


Рис. 3.7. Вплив аргініну на швидкість базального ($[FCCP] = 0$) і роз'єднаного ($[FCCP] = 0,5-2$ мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: $[Глюкоза] = 10$ ммоль/л; $[аргінін] = 0,1, 1, 5$ чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без аргініну); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 7$

Аргінін у діапазоні досліджуваних концентрацій на тлі глюкози статистично вірогідно не впливав на швидкість поглинання кисню мітохондріями панкреатичних ацинусів порівняно з контролем (рис. 3.7 Б).

Кінетичний аналіз не виявив залежності швидкості дихання панкреатичних ацинусів від концентрації аргініну. Поодиноким ефектом аргініну на дихання ми вважали несуттєвим (імовірно, хибно позитивним).

У підсумку, ці результати дають змогу вважати, що аргінін не окиснюється мітохондріями ацинарних клітин підшлункової залози до відновлювальних еквівалентів – як на тлі ендогенних субстратів, так і на тлі глюкози.

Мітохондріальний аргінін може використовуватись для синтезу креатину, про що свідчить експресія аргінін:глїцинамідінотрансферази та гуанїдиноацетат-N-метилтрансферази у підшлунковій залозі [41; 52]. Однак цей шлях безпосередньо не призводить до мітохондріального окиснення.

3.1.8. Вплив гістидину на процеси окиснення у панкреатичних ацинусах

Гістидин бере участь у синтезі та розщепленні білків. Існує кілька шляхів метаболізму цієї амінокислоти. Катаболізм гістидину здебільшого відбувається через утворення уроканату, який перетворюється до глутамату. Другорядний шлях деградації гістидину опосередковується гістидинамінотрансферазою, яка перетворює амінокислоту на імідазолпіруват, що призводить до виробництва аспартату. Гістидин може бути донором одновуглецевих груп для реметилування гомоцистеїну та синтезу пуринів і тимідилату. Гістидин відіграє особливо важливу роль в активному центрі ферментів, таких як серинові протеази (наприклад, трипсин), де він є членом каталітичної тріади. Надлишок гістидину може перетворюватися на *транс*-уроканат за допомогою гістидази у печінці та шкірі [26].

Добавки гістидину та гістидинвмісних дипептидів досліджуються для запобігання втоми під час інтенсивних фізичних навантажень і для лікування розладів, пов'язаних зі старінням, метаболічного синдрому, atopічного дерматиту, виразок, запальних захворювань кишечника, очних захворювань і неврологічних розладів [77].

Гістидин у надвисокій дозі (8 г/кг) викликав гострий панкреатит у мишей [83; 205]. Оскільки механізм пошкодження ацинарних клітин за впливу гістидину пов'язаний з мітохондріальними процесами, а саме з циклофілін D-залежним відкриттям МПТП [83], ми досліджували вплив амінокислоти на тлі ендогенних субстратів або глюкози на швидкість поглинання кисню .

Використання ANOVA з повторами з коригованим пост-hoc t-тестами Голм-Бонферроні не виявило впливу гістидину на тлі ендогенних субстратів дихання панкреатичних ацинусів щурів (рис. 3.8 А). Гістидин на тлі глюкози статистично вірогідно змінював швидкість поглинання кисню. За окиснення гістидину у концентрації 5 ммоль/л швидкість дихання, стимульованого FCCP у концентрації 2 мкмоль/л, зростала на 36,9 % ($P < 0,05$) відносно контролю (рис. 3.8 Б).

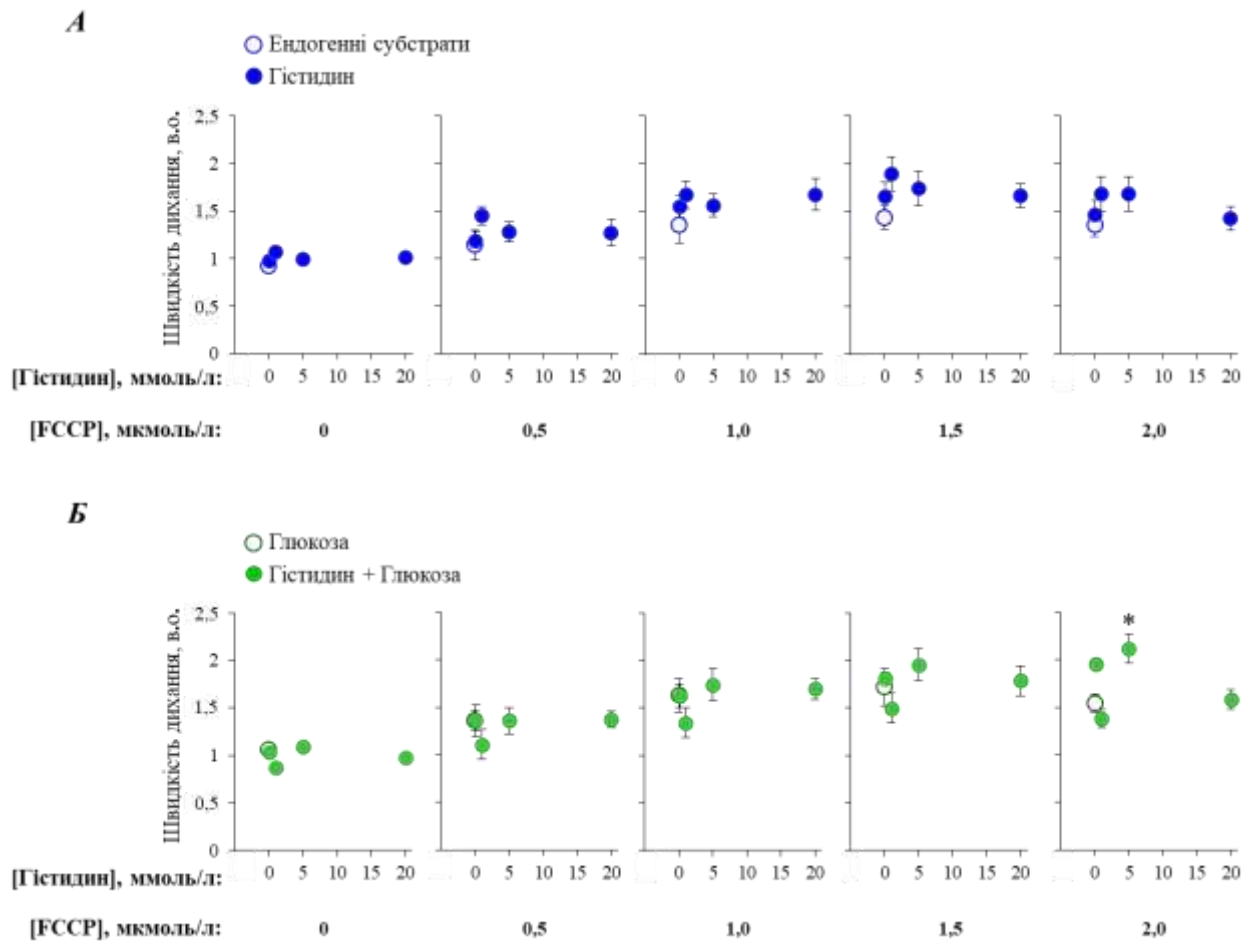


Рис. 3.8. Вплив гістидину на швидкість базального ($[FCCP] = 0$) і роз'єданого ($[FCCP] = 0,5-2$ мкмоль/л) дихання панкреатичних ацинусів щурів у базовому позаклітинному розчині без (А) або з (Б) глюкозою: $[глюкоза] = 10$ ммоль/л; $[гістидин] = 0,1, 1, 5$ чи 20 ммоль/л; білі точки позначають контроль (без гістидину); * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 7$

Кінетичний аналіз не виявив залежності швидкості реакції від концентрації гістидину як на тлі ендогенних субстратів, так і на тлі глюкози, а поодинокий ефект гістидину на дихання ми вважаємо несуттєвим (імовірно, хибно позитивним).

Отримані нами результати свідчать, що гістидин, як на тлі ендогенних субстратів, так і глюкози суттєво не впливає на мітохондріальне окиснення ацинарних клітин підшлункової залози.

Підсумки до розділу

Дослідження швидкості дихання за впливу амінокислот показало, що глютамінова кислота, глютамін, аланін, лізин і аспарагінова кислота можуть окиснюватись у мітохондріях ацинарних клітин підшлункової залози. Ми не знайшли достатніх доказів того, що аспарагін, аргінін або гістидин використовуються як джерело енергії мітохондріями ацинарних клітин підшлункової залози, незважаючи на спорадичний невеликий статистично значущий вплив на споживання кисню.

Доступність глюкози як основного джерела енергії зменшила внесок лізину, аланіну та аспартату, але не глютамінової кислоти і глютаміну, у швидкість роз'єданого дихання панкреатичних ацинусів.

Представлені вище результати опубліковано у матеріалах конференцій [2; 4].

3.2. Ефект глутаміну на ацинарні клітини за стимуляції секреторними агентами

Стимулятори секреції використовують Ca^{2+} -сигнальний каскад, щоб запускати та регулювати секрецію ферментів і рідини в панкреатичних ацинусах. Внутрішньоклітинні Ca^{2+} -сигнали стимулюють генерацію АТФ і контролюють нормальну секрецію, але можуть стати критичним тригером у патогенезі панкреатиту. Гіперстимуляція секреторагами викликає аномальне глобальне та стійке підвищення $[\text{Ca}^{2+}]$. Токсичні Ca^{2+} -сигнали індукують передчасну активацію внутрішньоклітинних ферментів, мітохондріальну дисфункцію, порушення аутофагії, вакуолізацію та некроз, що сприяє патогенезу гострого панкреатиту [37].

Ми припустили, що глутамін може захищати ацинарні клітини підшлункової залози від негативної дії секреторагов. Раніше ми показали, що глутамін може вступати в процеси окиснення в панкреатичних ацинусах. Мітохондріальний глутамін катаболізується до глутамату. Глутамат перетворюється на α -кетоглутарат, який може брати участь у ЦТК сприяючи утворенню відновлених еквівалентів і синтезу АТФ.

Ми вивчали вплив глутаміну на функціонування панкреатичних ацинусів за стимуляції секреторагами. Як контроль ми використовували піруват, про захисні властивості якого вже відомо з даних літератури. Піруват сприяє відновленню рівня АТФ і запобігає некрозу ацинарних клітин підшлункової залози [111; 147].

3.2.1. Вплив пірувату і глутаміну на дихання та життєздатність панкреатичних ацинусів за стимуляції ХЦК

Відомо, що ХЦК у низьких і помірних концентраціях (5 і 10 μM) має стимулюючу дію на передачу панкреатичних Ca^{2+} -сигналів, секрецію та виробництво АТФ у мітохондріях, тоді як ХЦК у високих концентраціях (2 nM) може спричинити пошкодження клітин [187].

Ми досліджували вплив глютаміну та пірувату на мітохондріальне дихання і життєздатність панкреатичних ацинусів за стимуляції ХЦК у помірній (0,1 нмоль/л) і високій концентрації (10 нмоль/л).

Панкреатичні ацинуси попередньо інкубували в модифікованому розчині з вибраними субстратами окиснення і з ХЦК у концентрації 0,1 нмоль/л протягом 30 хв, а потім вносили до дихальної камери (під час вимірювання також був наявний ХЦК). Перші 3-4 хв реєстрували базальне дихання, потім титрували FCCP (0,5–1,5 мкмоль/л) для того, щоб викликати роз'єднання дихання і виявити максимальну дихальну ємність мітохондрій.

Ми встановили, що базальна і максимальна швидкість дихання панкреатичних ацинусів зростала під дією ХЦК лише за окиснення пірувату (рис. 3.9). Зниження рівня роз'єданого дихання на 20,7 % ($P < 0,05$) було викликане ХЦК, коли в розчині був наявний лише глютамін (рис. 3.9).

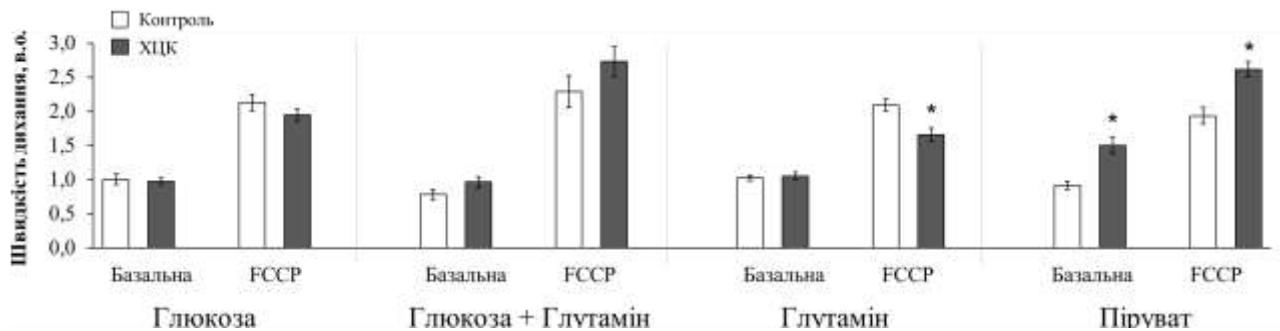


Рис. 3.9. Вплив субстратів окиснення на базальну і максимальну швидкість дихання ізольованих панкреатичних ацинусів у базовому позаклітинному розчині (30 хв) за стимуляції ХЦК; FCCP додавали в комірку для дихання; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [глутамін] = 2 ммоль/л; [ХЦК] = 0,1 нмоль/л; двофакторний аналіз ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні: * – $P < 0,05$; $n = 6$

Далі ми вивчали вплив ХЦК у високій концентрації (10 нмоль/л) на морфологію і життєздатність панкреатичних ацинусів. Клітини інкубували з ХЦК у базовому зовнішньоклітинному розчині за 37 °С впродовж 60 хв.

Виявлено, що ХЦК викликав блебінг плазматичної мембрани панкреатичних ацинусів, але не інтенсифікував некроз, на що вказує відсутність стійкого фарбування DAPI (рис. 3.10). DAPI не проникав через плазматичну мембрану живих клітин. Фарбування аннексином V було виявлено в клітинах з фарбуванням DAPI, але не в клітинах з блебами плазматичної мембрани, що свідчить про відсутність апоптозу (рис. 3.10).

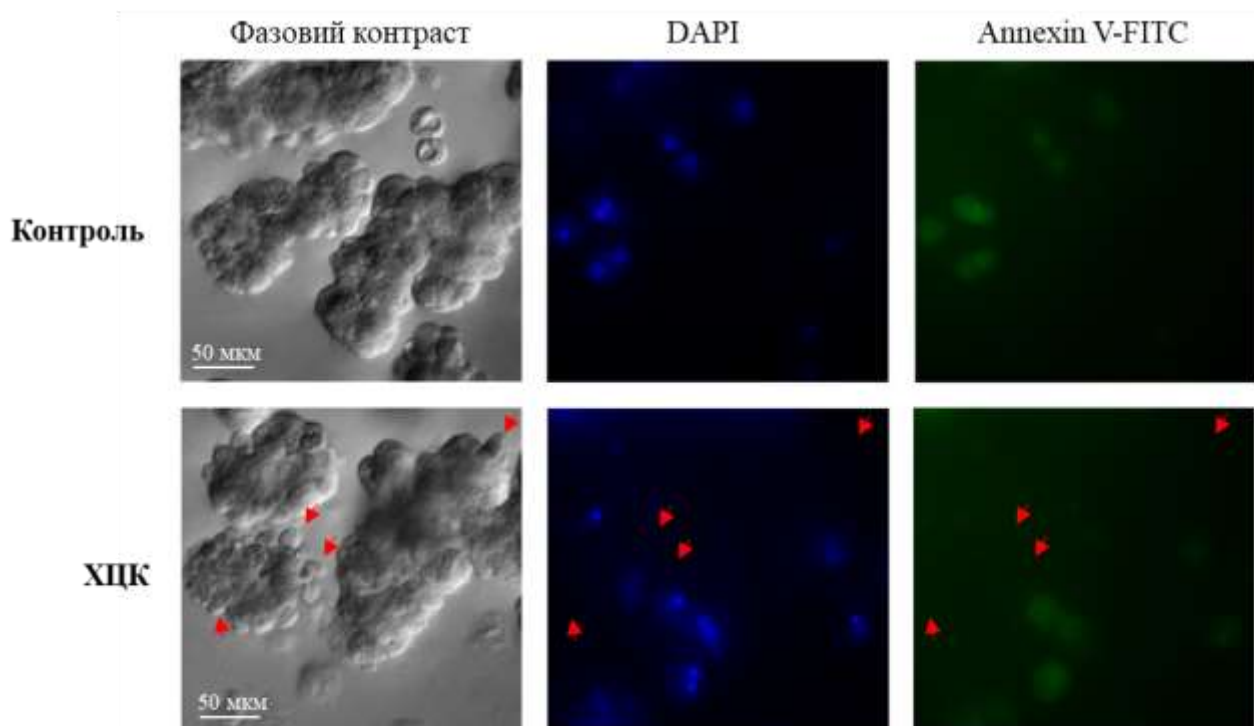


Рис. 3.10. Морфологія і життєздатність ізольованих панкреатичних ацинусів у базовому розчині за гіперстимуляції ХЦК впродовж 60 хв. Стрілки позначають клітини з блебами та очевидною відсутністю фарбування DAPI / аннексином V; [ХЦК] = 10 нмоль/л; n = 3

Інкубація панкреатичних ацинусів з ХЦК у високій концентрації (10 нмоль/л) протягом 30 хв спричинила зменшення роз'єданого дихання на 23,8 % ($P < 0,05$) відносно контролю. Однак не було виявлено жодного впливу на базальне дихання (рис. 3.11 Б).

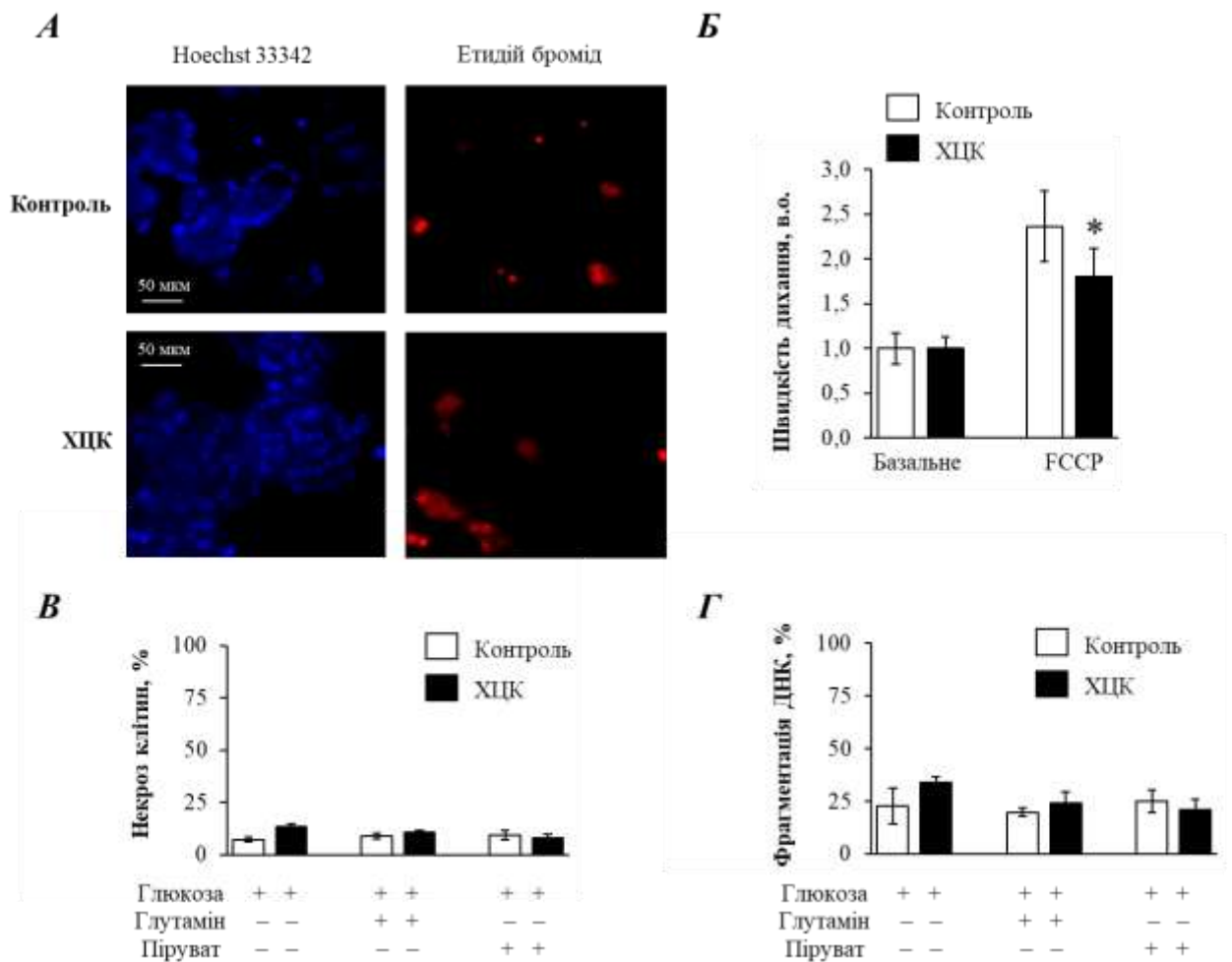


Рис. 3.11. Гіперстимуляція ХЦК не впливає на життєздатність, але пригнічує роз'єднане дихання панкреатичних ацинусів. Клітини інкубували із зазначеними субстратами впродовж 60 хв, фарбували Hoechst 33342 і етидій бромідом (A), далі оцінювали рівень некрозу (B) і фрагментацію ДНК (дифеніламіновий метод Бертона) (Г); швидкість дихання реєстрували після 30 хв інкубації в базовому середовищі (Б); FCCP додавали в комірку для дихання; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [глутамін] = 2 ммоль/л; [ХЦК] = 10 нмоль/л; двофакторний аналіз ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні: * – P < 0,05; n = 3-6

У іншій серії експериментів ми перевірили чи глютамін або піруват захищають ацинарні клітини підшлункової залози від некрозу або апоптозу за гіперстимуляції ХЦК.

Не було виявлено збільшення некрозу, оціненого за допомогою комбінації фарбування Hoechst 33342 (який проникав крізь плазматичну мембрану живих клітин на відміну від DAPI) і етидій бромідом, незалежно від наявності глютаміну чи пірувату в розчині (рис. 3.11 *A, B*). Ми не виявили ознак апоптозу, оціненого за фрагментацією ДНК, використовуючи дифеніламіновий метод Бертона (рис. 3.11 *Г*).

Крім цього, використовуючи метод ДНК-електрофорезу у агарозному гелі, ми не спостерігали фрагментації у нормі та за гіперстимуляції ХЦК, як за інкубації панкреатичних ацинусів з глюкозою, так і з глютаміном чи піруватом на тлі глюкози (рис. 3.12).

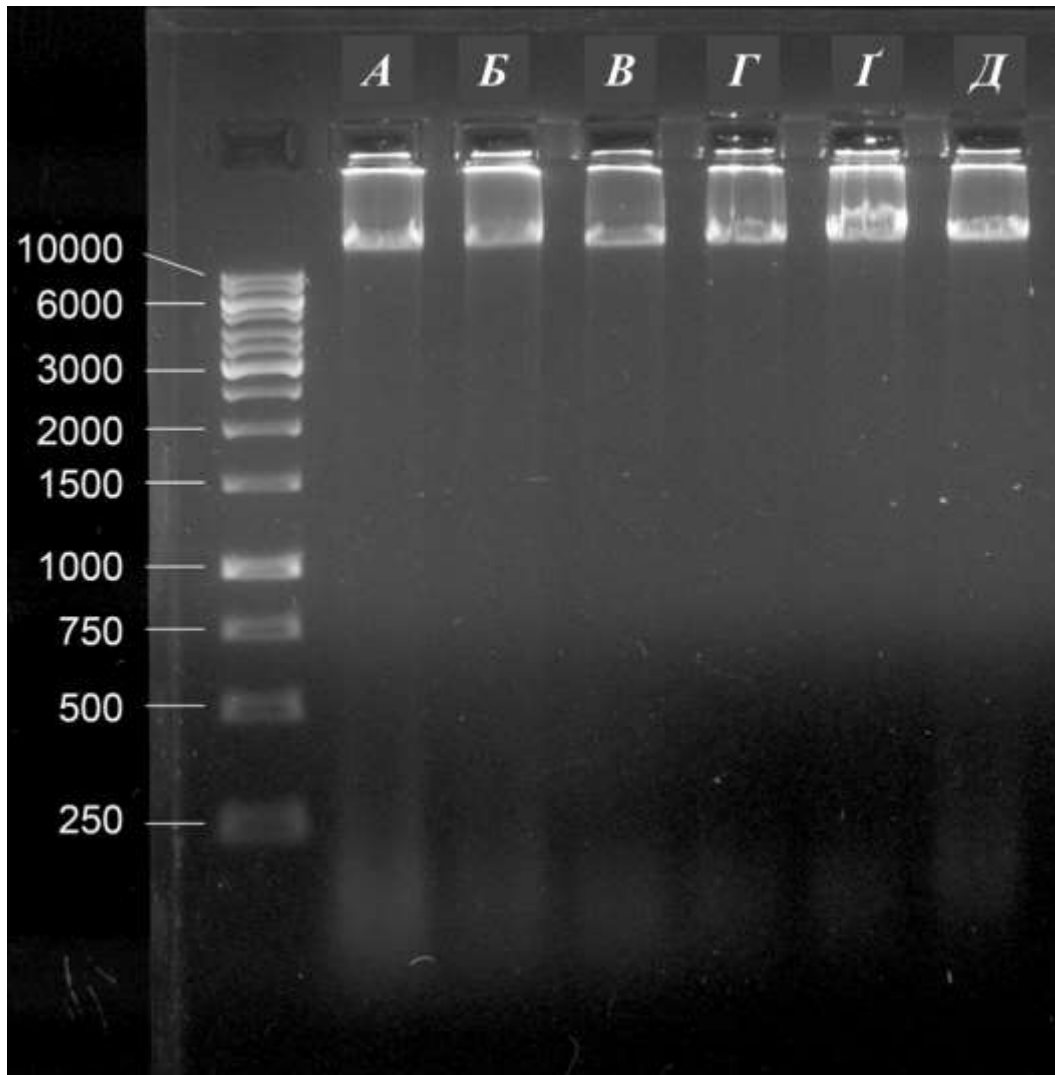


Рис. 3.12. Електрофорез загальної ДНК ізольованих панкреатичних ацинусів інкубованих 60 хв у модифікованому базовому зовнішньоклітинному розчині з глюкозою (А); піруватом і глюкозою (Б); глютаміном і глюкозою (В); глюкозою і ХЦК (Г); піруватом, глюкозою і ХЦК (Г); глютаміном, глюкозою і ХЦК (Д); [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [глютамін] = 2 ммоль/л, [ХЦК] = 10 нмоль/л; n = 3

У нашому дослідженні піруват і глютамін показали різні ефекти на мітохондріальне окиснення в ацинарних клітинах підшлункової залози.

Піруват потрібен для респіраторної відповіді на стимуляцію такими активаторами секреції як АХ або ХЦК. Відомо, що мітохондрії реагують на дію секретогогів збільшенням швидкості дихання, деполяризацією мембрани,

збільшенням кількості НАДН і виробництвом АТФ для компенсації енергетичних витрат [187; 189].

Ми продемонстрували, що піруват необхідний для підвищення як базального, так і максимального роз'єданого дихання за стимуляції ХЦК у концентрації 0,1 нмоль/л впродовж 30 хв. Ймовірним механізмом дії є активація піруватдегідрогенази Ca^{2+} , який вивільняється з внутрішньоклітинних запасів, що підтверджується прямим спостереженням кореляції між сигналами Ca^{2+} і мітохондріальними параметрами [187; 188; 189], а також впливом Ca^{2+} на кінетику дихання, за окиснення пірувату у пермеабілізованих ацинарних клітинах підшлункової залози [112].

Швидкість дихання за окиснення глютаміну на тлі глюкози не змінювалась за помірної стимуляції ХЦК (0,1 нмоль/л). Однак глютамін був необхідний для зменшення роз'єданого дихання за помірної стимуляції ХЦК (коли наявний лише глютамін) і за гіперстимуляції ХЦК (10 нмоль/л) (за наявності у середовищі глюкози, пірувату та глютаміну).

3.2.2. Вплив аміаку та глютаміну на мітохондріальне дихання панкреатичних ацинусів

Підшлункова залоза використовує велику кількість абсорбованого глютаміну для синтезу травних ферментів [159]. У 1955 році було виявлено, що дефіцит глютаміну в інкубаційному середовищі призводить до загибелі клітин [50]. Під час катаболізму глютаміну утворюється аміак, який може бути токсичним для клітин. У мітохондріях нейронів за печінкової енцефалопатії аміак викликає утворення вільних радикалів, відкриття МПТП, порушення окисного фосфорилування і набряк [135; 175].

Нами було встановлено, що глютамін окиснюється в ацинарних клітинах підшлункової залози. Далі ми перевірили чи за утилізації глютаміну в мітохондріях панкреатичних ацинусів утворюються токсичні концентрації аміаку.

Відомо, що ацинарні клітини підшлункової залози відповідають на стимуляцію секреторними агентами збільшенням інтенсивності дихання [113]. АХ (10 мкмоль/л) вносили у полярографічну комірку для того, щоб перевірити функціональну здатність клітин реагувати на дію секретогогів. Базальну швидкість дихання оцінювали протягом 4 хвилин.

Додавання АХ у полярографічну комірку сприяло інтенсифікації дихання панкреатичних ацинусів на 15,9 %, порівняно з базальною швидкістю дихання протягом 1 хв після введення АХ, проте ця різниця не була статистично достовірною (рис. 3.13).

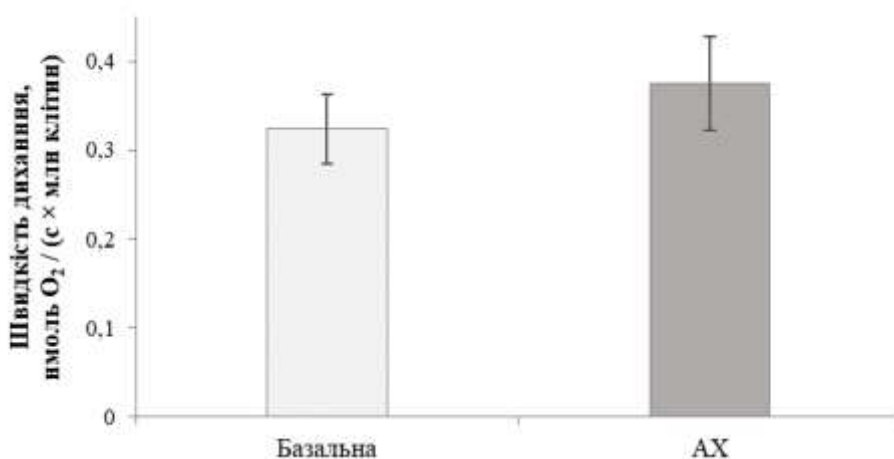


Рис. 3.13. Швидкість дихання цілісних панкреатичних ацинусів за окиснення глюкози у нормі та після стимуляції ацетилхоліном: [глюкоза] = 10 ммоль/л, [АХ] = 10 мкмоль/л; n = 4

Далі ми оцінювали вплив аміаку та глутаміну на мітохондріальне дихання. У контролі панкреатичні ацинуси інкубували в базовому позаклітинному середовищі з глюкозою (10 ммоль/л). У дослідах NH₄Cl (5 ммоль/л) або глутамін (2 ммоль/л) додавали в середовище інкубації з глюкозою. АХ (10 мкмоль /л) або ХЦК (0,1 нмоль/л) вносили до розчину для стимуляції секретії. Клітини інкубували за 37 °С протягом 30 хв. Після цього, реєстрували базальну швидкість дихання. Максимальну швидкість дихання стимулювали додаванням до клітин FCCP у концентрації 0,5, 1, 1,5, 2 мкмоль/л.

АХ та ХЦК не впливали на базальну та FCCP-стимульовану швидкість дихання (рис. 3.14). Ймовірно, що час інкубації був занадто довгим, щоб стимулююча дія секретогогів збереглася. Пік секреції ацинарними клітинами підшлункової залози припадає на перші 5 хв за оптимальних (середніх) концентрацій секретогогів [145]. Є дані, що АХ і ХЦК підвищували максимальну швидкість дихання протягом 15 хв інкубації, але в середовищі обов'язково був наявний піруват [1].

Базальна швидкість дихання панкреатичних ацинусів під впливом NH_4Cl зменшилась на 13,1–20,2 % ($P < 0,05$), порівняно з інтенсивністю дихання за окиснення глюкози, і це зниження спостерігалось як у нормальному стані, так і під дією секретогогів (рис. 3.14 А). Глутамін не впливав на базальну швидкість дихання (рис. 3.14 А).

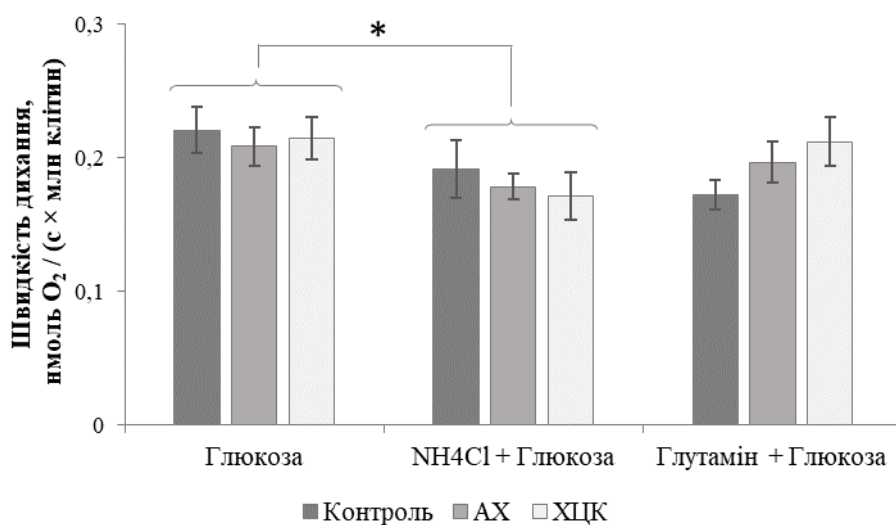
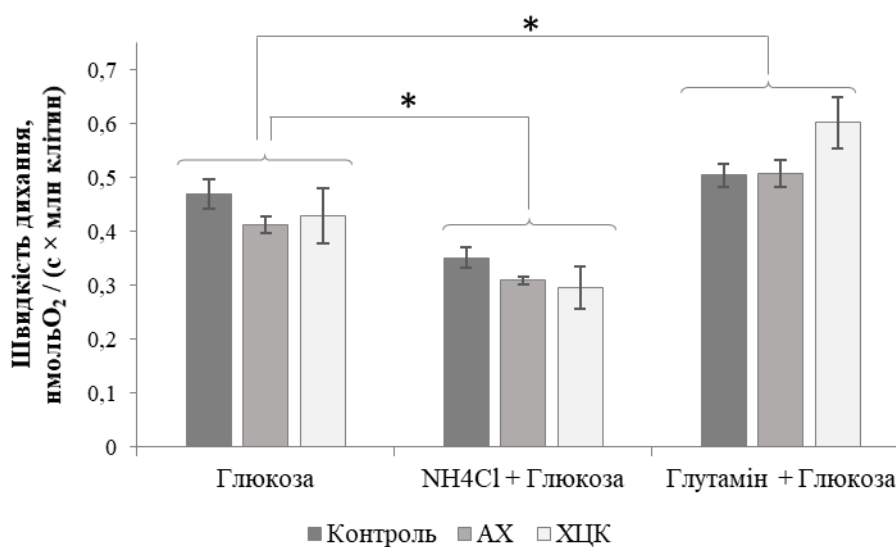
A**B**

Рис. 3.14. Вплив субстратів окиснення і NH_4Cl на базальну (А) і максимальну (Б) швидкість дихання ізольованих панкреатичних ацинусів у базовому позаклітинному розчині (30 хв) із субстратами та секретогогами; FCCP додавали в комірку для дихання; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [глутамін] = 2 ммоль/л, [NH_4Cl] = 5 ммоль/л, [AX] = 10 мкмоль/л, [XCC] = 0,1 нмоль/л; двофакторний аналіз ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні: * – $P < 0,05$; $n = 5$

Під час окиснення глютаміну максимальна швидкість дихання збільшувалась на 7,6–40,4 % ($P < 0,05$), порівняно з контролем, незалежно від ефекту АХ або ХЦК (рис. 3.14 Б). NH_4Cl знижував максимальну швидкість FCCP-стимульованого дихання у контролі та під впливом АХ або ХЦК на 24,8–31,0 % ($P < 0,05$), порівняно з контролем за окиснення глюкози (рис. 3.14 Б).

Механізм токсичності аміаку в значній мірі вивчений на тканинах мозку, оскільки гіперамоніємія безпосередньо пов'язана зі спектром невропатологічних станів. Гіперамоніємія пригнічує активність мітохондріальних дегідрогеназ, що викликає втрату мембранного потенціалу мітохондрій та підвищення рівня активних форм кисню в ізольованих мітохондріях печінки та мозку [135; 175]. Аміак у патогенній концентрації (2 ммоль/л) є потужним інгібітором мітохондріального комплексу α -кетоглутаратдегідрогенази мозку. У патологічних концентраціях (10–20 мкмоль/л) активність мітохондріальної NAD^+ - і NADP^+ -зв'язаної ізоцитратдегідрогенази, NAD^+ -зв'язаної малатдегідрогенази і NAD^+ -зв'язаної ізоцитратдегідрогенази печінки [102]. У мітохондріях печінки виявлено зниження рівня проміжних продуктів ЦТК, цитрату, α -кетоглутарату і малату, під впливом аміаку [191]. Натомість низькі концентрації хлориду амонію (> 1 ммоль/л) стимулюють утворення глюкози з глютаміну в мітохондріях або ізольованих клітинах печінки [90]. Аміак також викликає морфологічні аномалії мітохондрій, відкриття МПТП, що призводить до набряку мітохондрій і загибелі клітин шляхом апоптозу або некрозу [191].

Результати наших досліджень підтвердили, що аміак у патологічних концентраціях негативно впливає на дихальні процеси мітохондрій підшлункової залози. У експерименті аміак зменшував адаптаційну здатність мітохондрій незалежно від впливу секретогогів. Це можна пояснити тим, що патологічний ефект аміаку опосередковується підвищенням рівня цитозольної $[\text{Ca}^{2+}]$ [71; 89]. Мітохондріальне накопичення Ca^{2+} погіршує мітохондріальне дихання, зменшує синтез АТФ і збільшує утворення вільних радикалів, що

призводить до посилення окиснювального стресу. Додаткове збільшення цитозольної $[Ca^{2+}]$ під дією АХ або ХЦК не інтенсифікувало токсичної дії аміаку.

Під час окисного фосфорилування метаболіти глутаміну беруть участь у генерації донорів електронів, таких як НАДН або ФАДН₂, і синтезі ГДФ і АТФ. Інтенсивний метаболізм глутаміну в мітохондріях астроцитів за допомогою фосфат-активованої глутамінази призводить до гіперпродукції аміаку [175]. Але, як показує наше дослідження, катаболізм глутаміну в підшлунковій залозі сприяє підвищенню адаптивності мітохондрій навіть за підвищеної $[Ca^{2+}]$ та, очевидно, не призводить до накопичення аміаку у токсичних концентраціях.

Підсумок до розділу

За стимуляції панкреатичних ацинусів ХЦК у помірній концентрації (0,1 нмоль/л), піруват підвищує базальну і максимальну швидкість дихання, тоді як глутамін знижує швидкість роз'єданого окиснення. За наявності у середовищі інкубації глутаміну, пірувату і глюкози разом з ХЦК у високій концентрації (10 нмоль/л) максимальна швидкість знижується. Піруват і глутамін не впливають на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози за гіперстимуляції ХЦК.

Інкубація ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози з NH_4Cl здійснює негативний вплив на мітохондрії незалежно від стимуляції АХ або ХЦК. Токсична кількість аміаку, необхідна для таких шкідливих наслідків, очевидно, не утворюється через окиснення глутаміну навіть за стимуляції ацинарних клітин секретогогами.

Представлені вище результати опубліковано у статтях [114; 209] та матеріалах конференцій [54; 66].

3.3. Життєздатність панкреатичних ацинусів за впливу амінокислот у високій концентрації

Дослідження панкреатиту у людей та на експериментальних моделях показали, що ацинарні клітини гинуть як шляхом апоптозу, так і некрозу. Ці два основних типи загибелі клітин відрізняються морфологічно та біохімічно [64]. Ключовими молекулярними етапами апоптичного шляху є вивільнення цитохрому с з мітохондрій і активація каспаз. Важливо, що за апоптозу зберігається цілісність плазматичної мембрани, тоді як некротична клітина вивільняє свій вміст, пошкоджуючи сусідні клітини та сприяючи запаленню [58].

Паренхіматозний некроз є основним ускладненням панкреатиту, і більша кількість некротичних клітин пов'язана з гіршим прогнозом захворювання [143]. Цікаво, що важкість панкреатиту на тваринних моделях прямо корелює зі ступенем некрозу і обернено – апоптозу.

Мітохондрії відіграють центральну роль у регуляції загибелі клітин, оскільки пермеабілізація мітохондріальної мембрани є універсальним тригером як некрозу, так і апоптозу [64]. Втрата $\Delta\psi_m$ призводить до зниження рівня АТФ, нездатності підтримувати іонні градієнти через плазматичну мембрану і, зрештою, до некрозу. Мітохондріальна пермеабілізація також запускає апоптичний шлях через вивільнення резидентного білка мітохондрій цитохрому с [98]. Потрапляючи в цитозоль, цитохром с взаємодіє з каспазами та активує їх, що призводить до апоптичних подій [58].

Утворення блебів на плазматичній мембрані ініціюється комбінацією подій, які включають локальне порушення взаємодії мембрани та актинової кори, що призводить до швидкого випинання мембрани в результаті внутрішнього гідростатичного тиску клітини. Найчастіше блеби спостерігаються за апоптозу, але також можуть супроводжувати такі процеси, як поділ, рух чи інвазія клітин [53].

Зважаючи на неповне розуміння механізмів впливу амінокислот на підшлункову залозу, ми вважали за доцільне оцінити їхній ефект у високій концентрації (20 ммоль/л) на життєздатність та морфологію панкреатичних ацинусів.

3.3.1. Вживаність та морфологія панкреатичних ацинусів за короткотривалої інкубації з амінокислотами у високій концентрації

Життєздатні панкреатичні ацинуси виділяли з нормальної підшлункової залози щура. Одразу після виділення життєздатність клітин була в межах 93–97 %; ацинуси не виявляли значних морфологічних проблем, таких як утворення блебів. Виділені клітини інкубували у базовому позаклітинному розчині з глюкозою без інших субстратів окиснення або з глюкозою та досліджуваною амінокислотою за 37 °С в CO₂-інкубаторі впродовж двох годин.

Встановлено, що через 2 год інкубації у контролі (лише глюкоза) 18 % ацинарних клітин підшлункової залози загинуло шляхом некрозу (рис. 3.15). За дії аланіну та глутаміну на тлі глюкози кількість некротичних клітин знизилась на 54 % ($P < 0,05$) і 46 % ($P < 0,05$) відповідно, порівняно з впливом глюкози (рис. 3.15). Наявність у середовищі аргініну або лізину спричинило статистично вірогідне підвищення рівня некрозу на 39 % ($P < 0,05$) і 70 % ($P < 0,05$) відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.15). Після інкубації клітин із аспарагіновою кислотою частка некротичних клітин була вищою на 53 % ($P < 0,05$), ніж із аспарагіном.

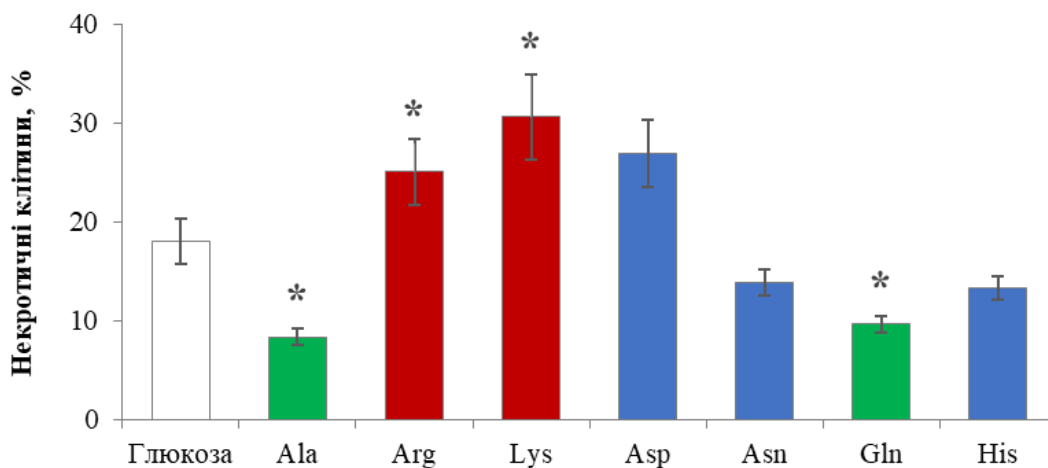


Рис. 3.15. Частка некротичних ацинарних клітин підшлункової залози (за порушенням цілісності мембрани) за умов інкубації 2 год у базовому позаклітинному середовищі за впливу амінокислот у високій концентрації на тлі глюкози; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [амінокислота] = 20 ммоль/л; * – статистично вірогідна різниця відносно контролю з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 6-7$

За інкубації панкреатичних ацинусів з амінокислотами у концентрації 20 ммоль/л не було виявлено збільшення клітинного блебінгу відносно контролю (рис. 3.16 А, Б). Цікаво, що глутамін (а не будь-яка інша амінокислота) викликав майже дворазове збільшення середньої площі клітин порівняно з контролем за інкубації лише з глюкозою (рис. 3 16 В, Г).

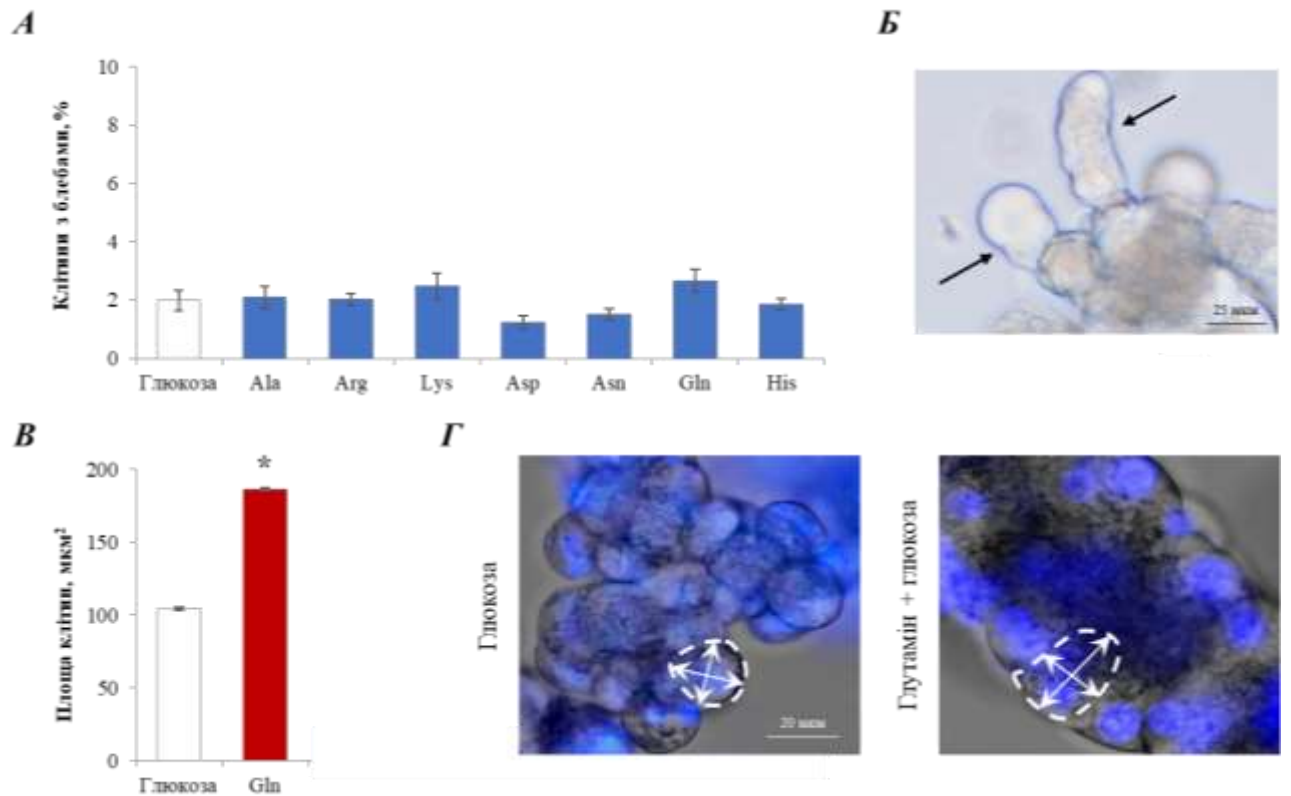


Рис. 3.16. Морфологія ацинарних клітин підшлункової залози за умов інкубації 2 год у базовому позаклітинному середовищі за впливу амінокислот у високій концентрації на тлі глюкози: кількість клітин з блебами (А); стрілки вказують на блеби (Б); вплив глутаміну на середню площу клітин (В); світлова мікроскопія ацинусів підшлункової залози з нашарованим флуоресцентним зображенням (Г); [глюкоза] = 10 ммоль/л, [амінокислота] = 20 ммоль/л; * – статистично значуща різниця порівняно з впливом глюкози з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 6-7$

Результати цього експерименту довели, що відсутність джерела амінокислот у позаклітинному розчині згубно діє на ацинарні клітини підшлункової залози. У наступному досліді ми протестували вплив

досліджуваних амінокислот (20 ммоль/л) на життєздатність панкреатичних ацинусів у середовищі DMEM, що містило ряд різних амінокислот і вітамінів.

Ми встановили, що за 2 год інкубації з глюкозою кількість некротичних клітин зменшилась і становила 11 % (рис. 3.17 А). Внесення у середовище інкубації DMEM досліджуваних амінокислот у концентрації 20 ммоль/л статистично вірогідно не змінювало відсоток клітин, що загинули шляхом некрозу, порівняно з додаванням лише глюкози (рис. 3.17 А, додаток Б).

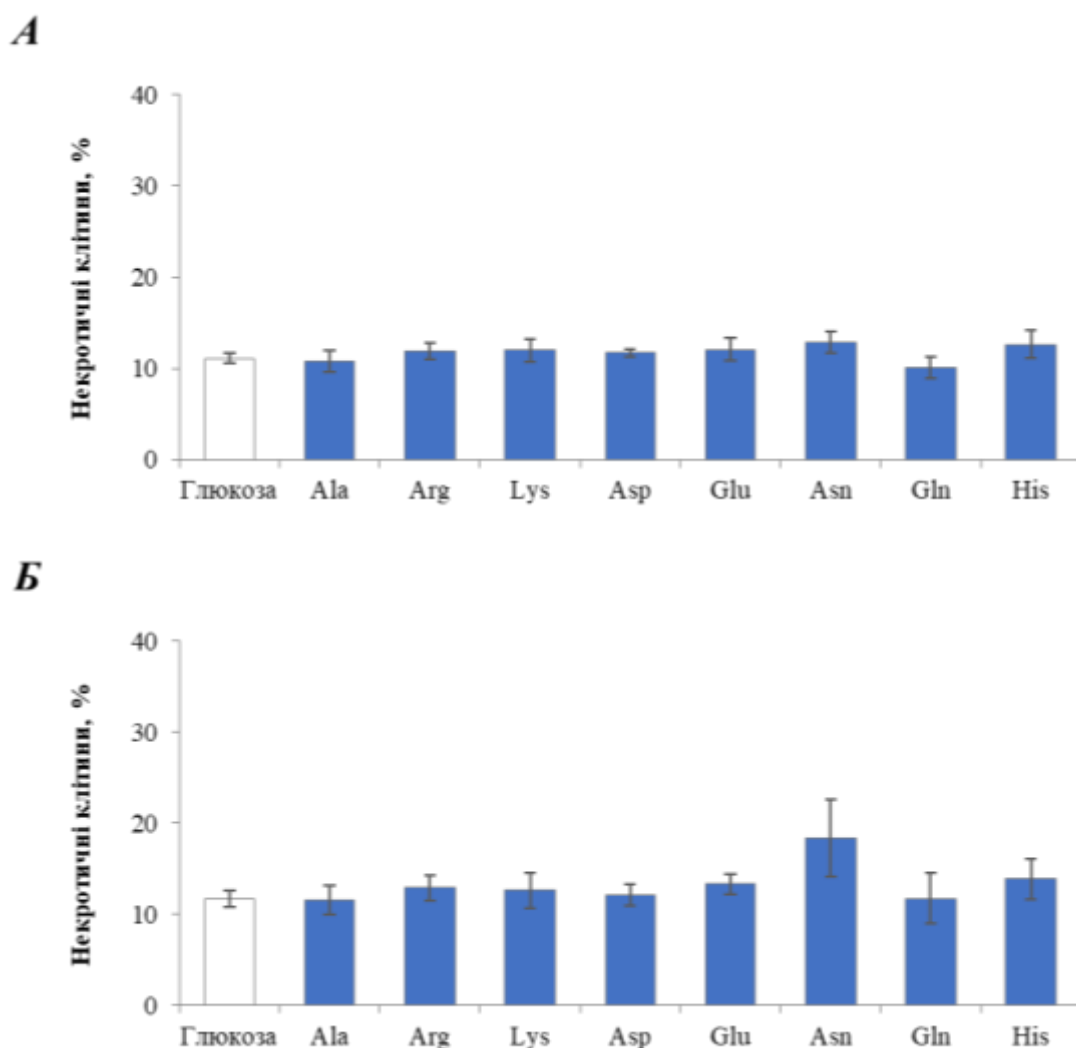


Рис. 3.17. Частка некрозу ацинарних клітин підшлункової залози (за порушенням цілісності мембрани) за умов інкубації 2 (А) і 4 год (Б) у середовищі DMEM за впливу амінокислот у високій концентрації на

тлі глюкози; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [амінокислота] = 20 ммоль/л; n = 8

Через 4 год інкубації кількість некротичних клітин майже не змінилась, у контролі вона становила 12 % (рис. 3.17 *Б*). Амінокислоти не впливали на процеси некрозу у порівнянні з контролем (рис. 3.17 *Б*, додаток Б).

Прогресуюче утворення блебів спостерігалось за наявності у середовищі інкубації глутаміну як на 2 год, так і на 4 год (рис. 3.18 *А, Б*). Значне збільшення клітинного блебінгу було виявлено після 2 год, але не 4 год інкубації з аспартатом (рис. 3.18 *А, Б*). Глутамін, знову ж таки, викликав набрякання клітин після 2 і 4 год інкубації (рис. 3.18 *В, Г*).

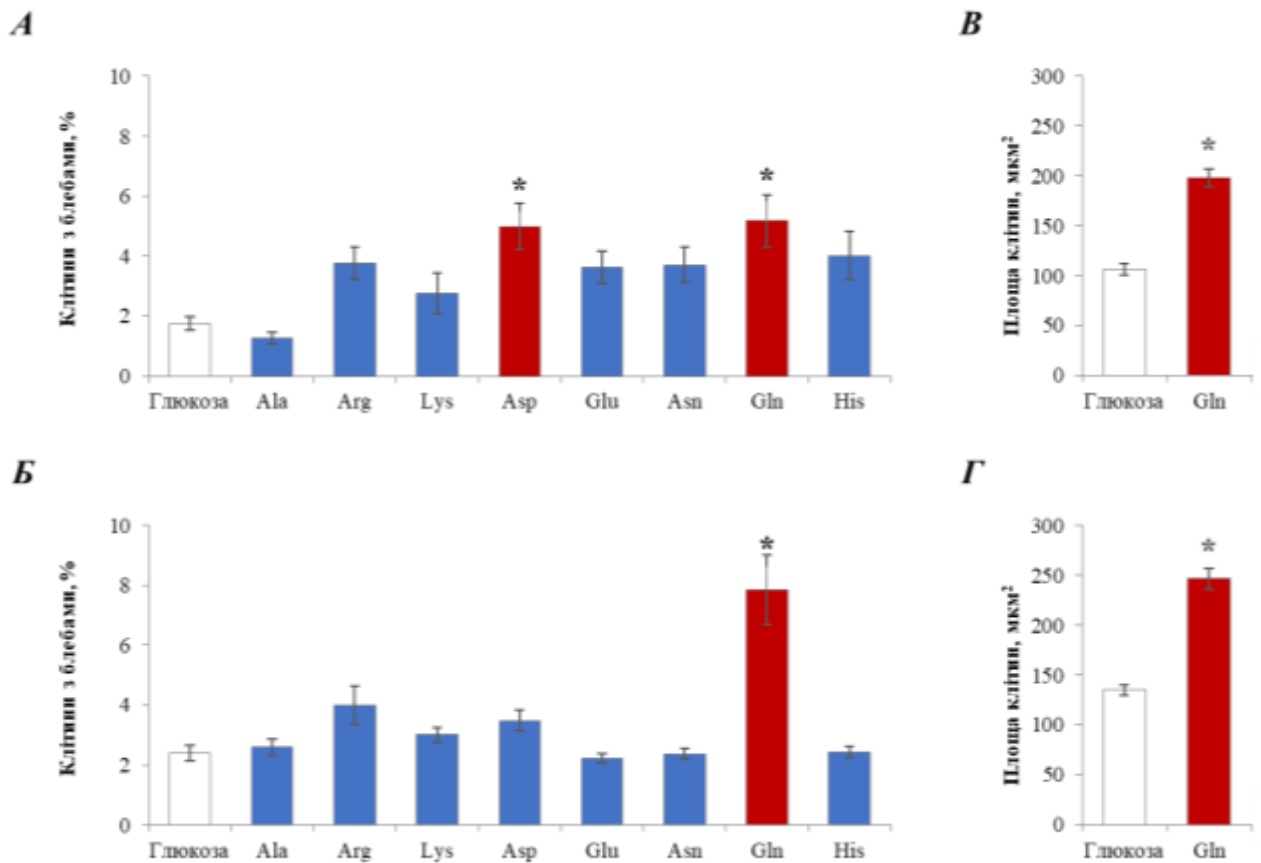


Рис. 3.18. Морфологія ацинарних клітин підшлункової залози за умов інкубації 2 і 4 год у середовищі DMEM за впливу амінокислот у високій концентрації на тлі глюкози: кількість клітин з блебами через 2 год (*А*) і 4 год (*Б*); вплив глутаміну на середню площу клітин за 2 год (*В*)

і 4 год (*I*); [глюкоза] = 10 ммоль/л, [амінокислота] = 20 ммоль/л; * – статистично значуща різниця порівняно з впливом глюкози з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 8$

Під час апоптозу хроматин зазнає фазової зміни від гетерогенної, генетично активної мережі, до інертної висококонденсованої форми, яка фрагментується і упаковується в апоптичні тіла [178]. У нашому дослідженні ми використовували флуоресцентну мікроскопію для детекції клітин з ущільненням ядерного хроматину на ранній стадії апоптозу та з ядерною фрагментацією – на пізній стадії.

За 2 і 4 год інкубації панкреатичних ацинусів у середовищі з глюкозою кількість клітин на ранньому та пізньому етапі апоптозу була дуже низькою і становила менше 1 % (рис.3.19 *A, B*). За впливу досліджуваних амінокислот у концентрації 20 ммоль/л частка клітин, які гинули шляхом апоптозу, статистично вірогідно не відрізнялась від контролю (рис. 3.19 *A, B*).

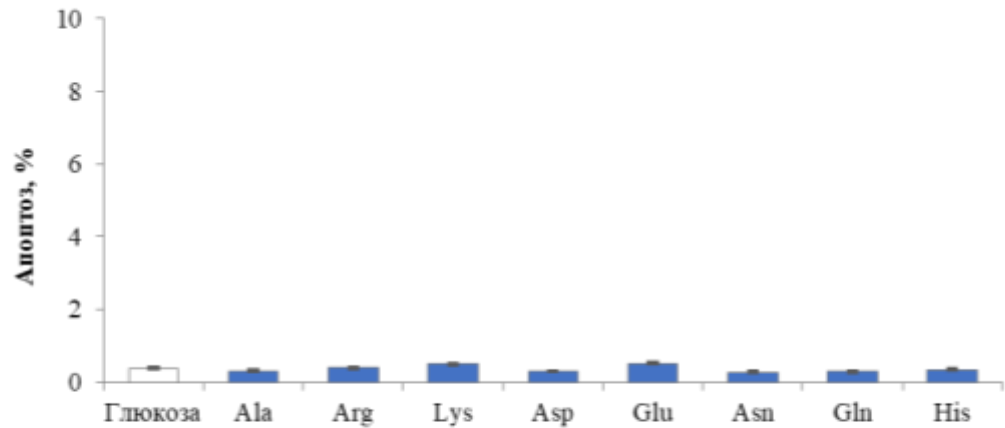
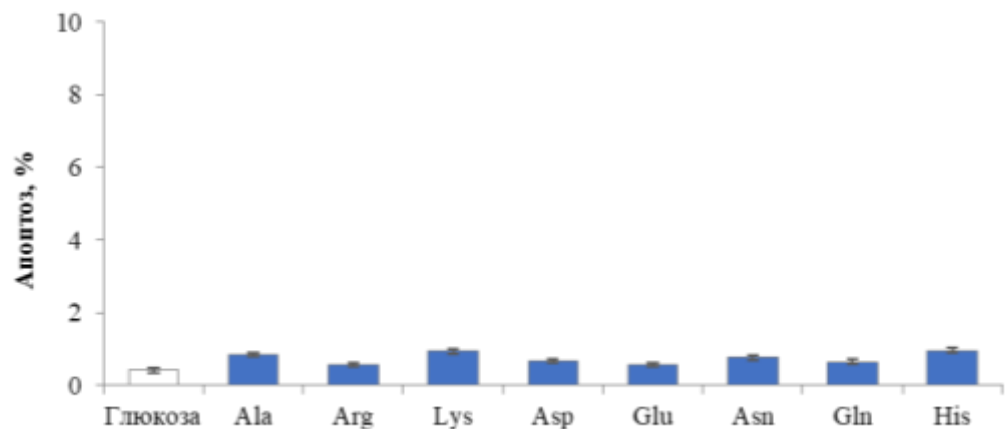
A**Б**

Рис. 3.19. Частка апоптозу ацинарних клітин підшлункової залози (за наявності конденсованих або фрагментованих ядер) за умов інкубації 2 год (А) і 4 год (Б) у середовищі DMEM за впливу амінокислот у високій концентрації на тлі глюкози; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [амінокислота] = 20 ммоль/л; n = 8

Отже, ацинарні клітини за умов короткотривалої інкубації *in vitro* гинуть здебільшого шляхом некрозу. Утворення блебів спостерігається за дії аспартату і глутаміну. Крім того, глутамін викликає збільшення площі ацинарних клітин підшлункової залози.

3.3.2. Ефект амінокислот у високій концентрації на життєздатність ацинарних клітин за довготривалої інкубації

Через 24 год інкубації, за впливу глюкози, шляхом некрозу загинуло 25 % ацинарних клітин підшлункової залози щурів (рис. 3.20). Аланін і гістидин не змінювали життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози (рис. 3.20, додаток Б). Додавання аспарагіну, аспарагінової і глутамінової кислоти у середовище інкубації спричинило збільшення кількості некротичних клітин до 43 %, 42 % і 34 % відповідно (рис. 3.20, додаток Б). Аргінін, лізин і глутамін за довготривалого впливу призводили до некротичної смерті 100 % клітин (рис. 3.20, додаток Б).

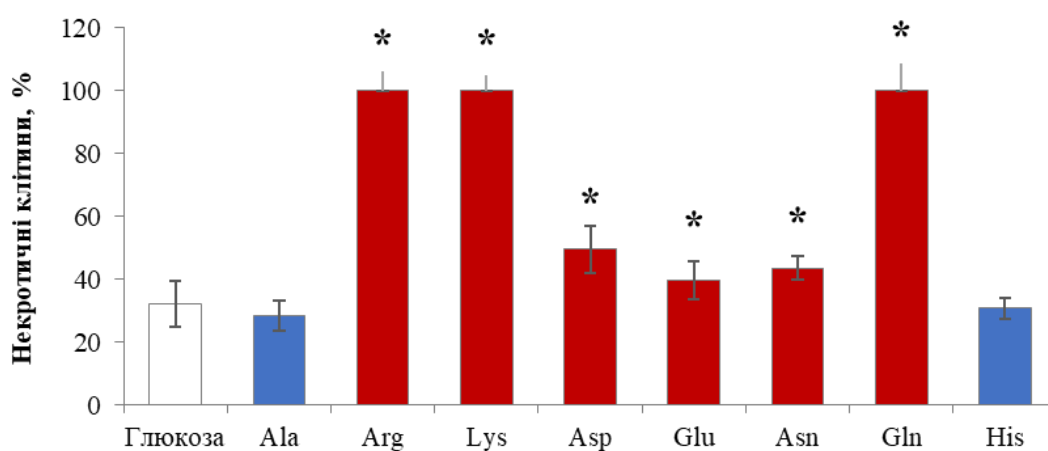


Рис. 3.20. Частка некрозу ацинарних клітин підшлункової залози (за порушенням цілісності мембрани) за довготривалої інкубації (24 год) у середовищі DMEM за впливу амінокислот у високій концентрації на тлі впливу глюкози; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [амінокислота] = 20 ммоль/л; * – статистично значуща різниця порівняно з впливом глюкози з $P < 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; $n = 7$

Використання методу ДНК-електрофорезу у агарозному гелі підтвердило фрагментацію ДНК за некротичним типом. Найбільш інтенсивна фрагментація ДНК спостерігалась за впливу аргініну, лізину та глутаміну на тлі впливу глюкози (рис. 3.21).

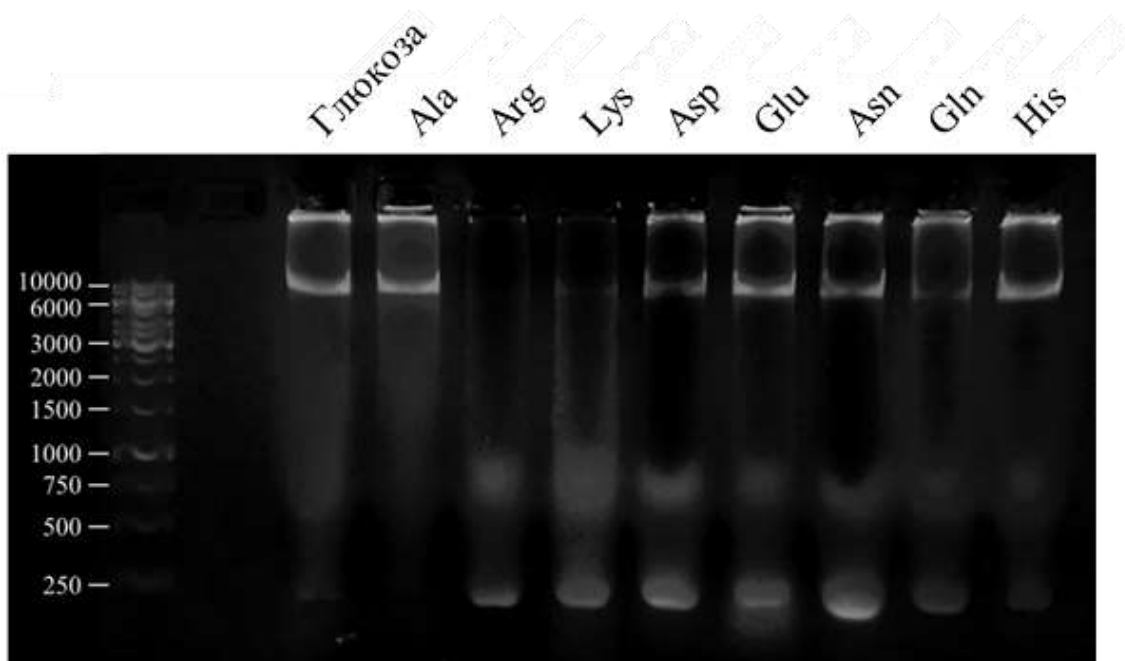


Рис. 3.21. Фрагментація ДНК ацинарних клітин підшлункової залози показана за допомогою електрофорезу в агарозному гелі за довготривалої інкубації (24 год) у середовищі DMEM за дії амінокислот у високій концентрації на тлі впливу глюкози; [глюкоза] = 10 ммоль/л, [амінокислота] = 20 ммоль/л; n=3

Отже, за довготривалої інкубації аргінін, лізин і глутамін спричиняють некротичну загибель панкреатичних ацинусів, тоді як аланін і гістидин не змінюють життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози.

Підсумок до розділу

Серед усіх перевірених амінокислот лише аланін і гістидин не знижують життєздатності панкреатичних ацинусів. Аспарагін, аспартат і глутамат збільшують кількість мертвих клітин у середовищі після довготривалої інкубації. Як і очікувалось, аргінін і лізин сприяють некротичній загибелі ацинарні клітини *in vitro*. Глутамін у концентрації 20 ммоль/л викликає блебінг і набрякання клітин, а також призводить до некрозу.

Представлені вище результати опубліковано у матеріалах конференцій [2; 170; 210].

3.4. Вплив натрій пірувату на гострий L-аргінін-індукований панкреатит

Тваринні моделі гострого панкреатиту, викликаного основними амінокислотами, широко використовуються для вивчення патологічних процесів у підшлунковій залозі [16; 205]. Одноразове введення 5 г/кг L-аргініну спричиняє селективний некроз ацинарних клітин [129; 174]. Патологічні механізми L-аргінінового панкреатиту залишаються недостатньо вивченими.

Багато доклінічних досліджень панкреатиту зосереджені на відновленні біоенергетичної функції мітохондрій [88; 132; 169]. Окиснювальний субстрат піруват *in vitro* посилює АТФ-продуктивну здатність мітохондрій та захищає ацинарні клітини підшлункової залози від токсичних речовин [111; 147]. Високий рівень пірувату швидко накопичується в підшлунковій залозі, порівняно з іншими органами, після внутрішньовенного введення [165], що робить його привабливою сполукою для лікування гострого панкреатиту. Показано, що внутрішньовенне введення натрій пірувату позитивно впливає на стан за церулеїн-індукованого панкреатиту у щурів [207].

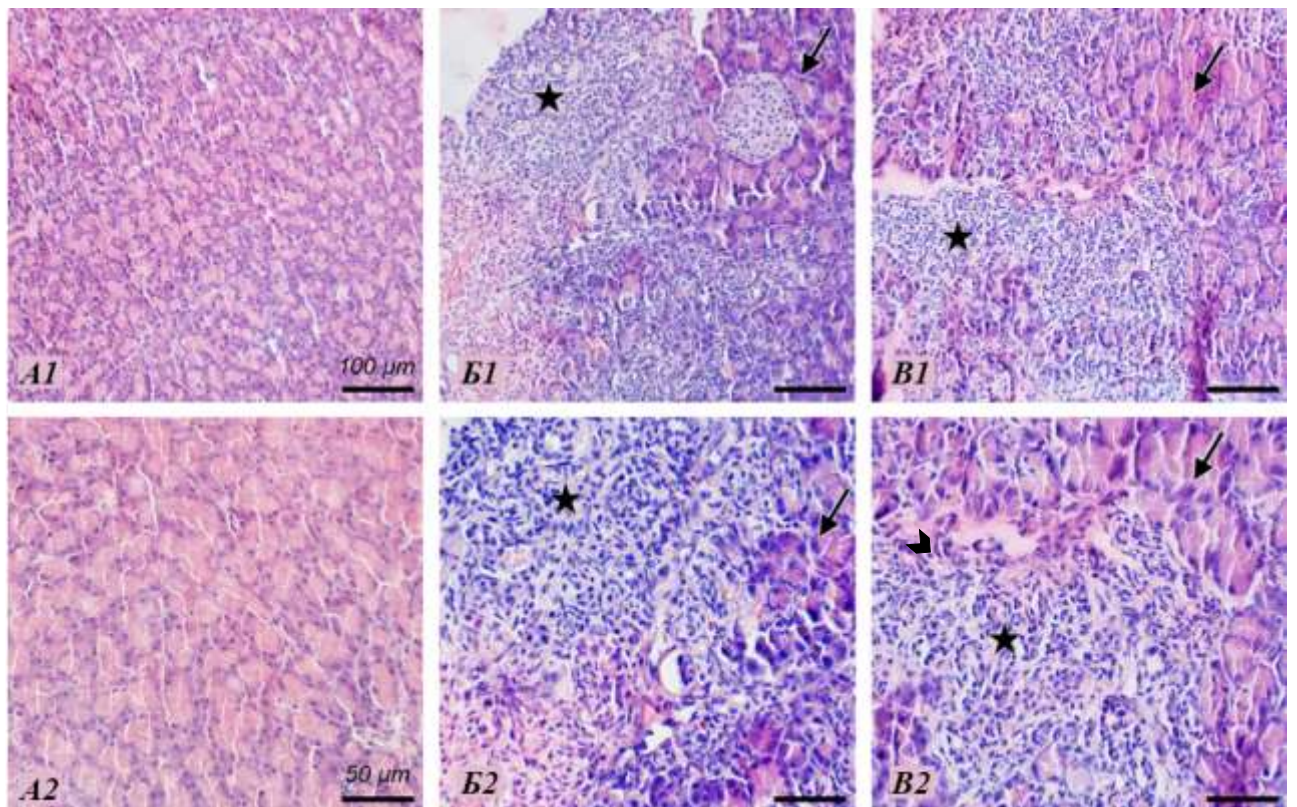
Ми припускаємо, що натрій піруват може мати терапевтичний ефект на L-аргінін-індукований панкреатит у щурів через нормалізацію мітохондріальних функцій.

3.4.1. Ефект натрій пірувату на морфологічні та ультраструктурні зміни підшлункової залози за гострого панкреатиту

Відомо, що L-аргінін у високих дозах викликає гострий панкреатит у щурів [129]. Ми робили дві внутрішньоочеревинні ін'єкції L-аргінін-HCl у дозі 2,5 г/кг маси тіла (загальна доза 5 г/кг маси тіла). Натрій піруват вводили через 72 год після першої ін'єкції L-аргініну. Тварини отримували три ін'єкції натрій пірувату (1 г/кг маси тіла на добу) впродовж чотирьох діб. Контрольні тварини отримували фізрозчин.

Щоб оцінити пошкодження підшлункової залози, вимірювали активність амілази плазми крові перед ін'єкцією L-аргініну та через 3, 5 і 8 днів після ін'єкції. На жаль, ми не виявили будь-яких змін активності амілази. Ймовірно, пік активності ферменту в плазмі був пропущений. У щурів активність амілази в сироватці збільшується через 12 годин після ін'єкції L-аргініну, досягає максимуму через 24 години і знижується через 48 годин [176], на відміну від мишей, у яких найвища активність амілази спостерігається через 72 години після ін'єкції L-аргініну [152].

Щоб підтвердити розвиток панкреатиту, після умертвіння тварин, проводили гістологічне дослідження підшлункової залози. У контрольних тварин ацинарні клітини підшлункової залози мали нормальну морфологію, змін у паренхімі та системі проток не виявлено (рис. 3.22 *A1, A2*). У підшлунковій залозі тварин з гострим панкреатитом, індукованим L-аргініном, незалежно від введення натрій пірувату в усіх випадках виявлено атипові клітини, що, ймовірно, є ознакою фіброзу (рис. 3.22 *B1, B2, B1, B2*). Ознак лейкоцитарної інфільтрації, некрозу, набряку чи крововиливу не виявлено, очевидно, через пізнє обстеження (через 7 днів після очікуваного епізоду панкреатиту) (рис. 3.22 *B1, B2, B1, B2*).



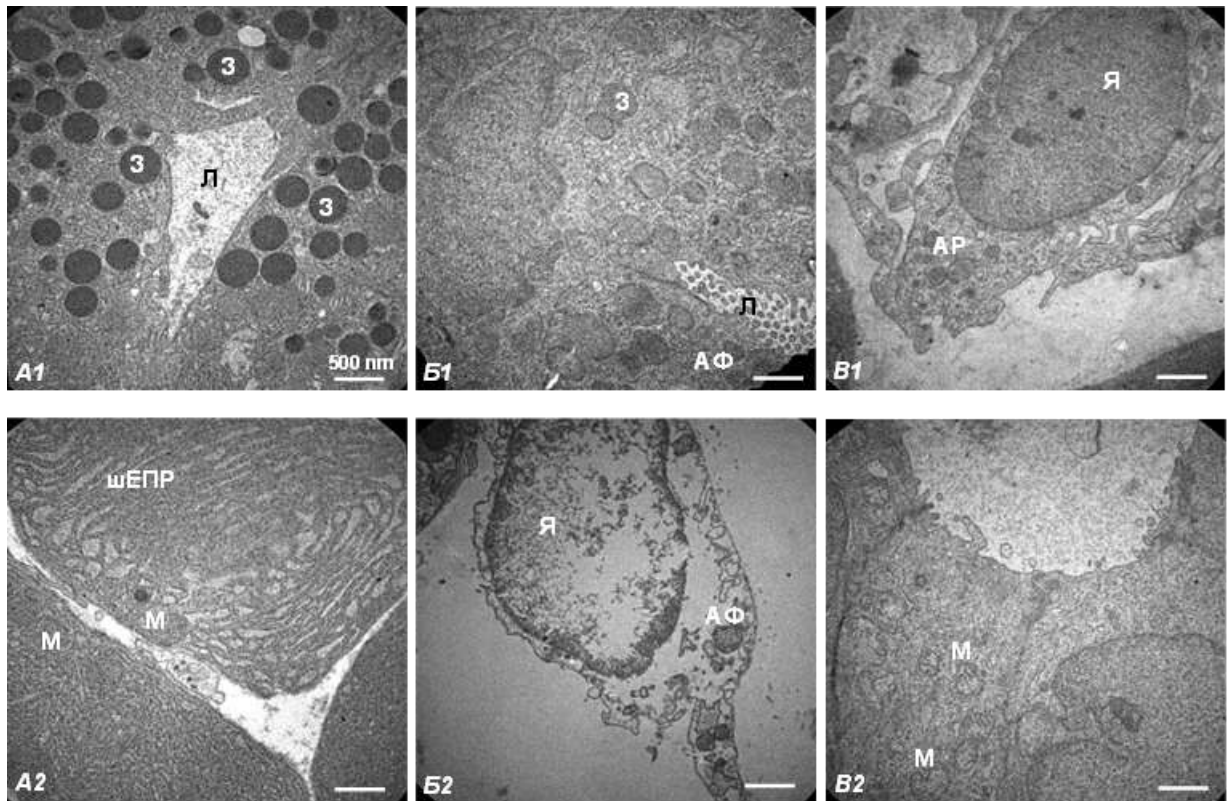
Контроль

L-аргініновий панкреатит

**L-аргініновий панкреатит
+ Натрій піруват**

Рис. 3.22. Гістологія підшлункової залози. Нормальна тканина у контрольній групі (A) і фіброз (зірочка) з ділянками інтактною тканини (стрілка) у групі L-аргінін-індукованого панкреатиту (B) і за впливу натрій пірувату (B). Масштаб = 100 мкм і 50 мкм; n = 3

Для більш детального вивчення тканини підшлункової залози була проведена електронна мікроскопія. У контрольних тварин ультраструктура ацинарних клітин була повністю нормальною з гетерохроматичними ядрами, інтактними мітохондріями, правильно розташованими паралелями шорсткого ЕПР та зимогенними гранулами біля апікальної частини ацинарних клітин (рис. 3.23 A1, A2). У тварин з панкреатитом цитоплазма та ядра деяких ацинарних клітин підшлункової залози повністю розпалися, в інших випадках спостерігали мітохондрії з дегенерованими кристами, скупчення аутофагосом або неапикальну локалізацію зимогенних везикул (рис. 3.23 B1, B2).



Контроль

L-аргініновий панкреатит

L-аргініновий панкреатит

+ Натрій піруват

Рис. 3.23. Електронна мікроскопія ацинарних клітин у контролі (A1, A2), за L-аргінін-індуковано гострого панкреатиту (B1, B2) і за впливу натрій пірувату (B1, B2). Зимогенна везикула (З), люмен (Л), шорсткий ЕПР (шЕПР), мітохондрія (М), ядро (Я), автофагосома (АФ). Масштаб = 500 нм; n = 3

Встановлено, що введення натрій пірувату не покращувало морфологію підшлункової залози за гострого панкреатиту (рис. 3.22 B1, B2, рис. 3.23 B1, B2).

3.4.2. Зміна концентрації амінокислот у плазмі крові щурів з гострим панкреатитом за впливу натрій пірувату

Рівень незамінних амінокислот у плазмі крові щурів із L-аргінін-індукованим експериментальним гострим панкреатитом значно знизився (табл. 3.1): метіоніну – на 26,8 % (P < 0,05), фенілаланіну – на 40,1 % (P < 0,05),

триптофану – на 49,2 % ($P < 0,05$), лейцину та ізолейцину – на 30,0 % ($P < 0,05$), валіну – на 11,4 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. У тварин з панкреатитом після введення натрій пірувату рівні метіоніну, фенілаланіну та триптофану були значно вищими порівняно з групою панкреатиту без лікування (табл. 3.1). Цікаво, що рівень лізину в плазмі не змінювався у всіх групах тварин.

Таблиця 3.1

Рівень амінокислот у плазмі крові щурів

Амінокислота	Контроль (мкмоль/л)	L-аргініновий панкреатит (мкмоль/л)	Натрій піруват (мкмоль/л)
Незамінні:			
Метіонін	45,37 ± 3,82	33,22 ± 5,15 *	39,52 ± 4,06 #
Фенілаланін	82,68 ± 5,80	49,56 ± 5,00 *	77,48 ± 8,89 #
Триптофан	192,38 ± 18,16	97,65 ± 13,73 *	150,43 ± 22,20 *#
Лейцин + Ізолейцин	302,20 ± 75,70	211,59 ± 26,71 *	245,38 ± 45,06
Валін	96,65 ± 7,27	85,66 ± 6,76 *	80,84 ± 9,90 *
Лізін	158,02 ± 22,70	143,01 ± 13,80	139,04 ± 11,17
Замінні:			
<i>Трансамінування / дезамінування:</i>			
Аланін	220,70 ± 32,65	263,53 ± 55,97	276,22 ± 48,01
Глутамін	711,75 ± 32,24	662,07 ± 62,32	942,57 ± 114,95 #
Глутамат	114,50 ± 11,15	158,41 ± 12,23 *	150,00 ± 21,05 *
Аспарагін	92,33 ± 12,21	65,49 ± 14,49 *	73,66 ± 8,39 *
Аспартат	126,02 ± 17,90	187,37 ± 14,77 *	131,41 ± 10,25 #
<i>Інші:</i>			
Аргінін	311,75 ± 19,13	342,24 ± 12,15	309,50 ± 49,05
Орнітин	267,54 ± 18,84	148,20 ± 42,84 *	232,14 ± 46,93 #
Серин	173,85 ± 11,16	101,52 ± 5,11 *	207,35 ± 24,07 *#
Цистеїн	373,31 ± 57,86	312,22 ± 48,93	277,47 ± 29,97 #

Цистин	70,91 ± 11,28	47,22 ± 10,07 *	64,53 ± 16,59 *
Таурин	131,85 ± 16,39	111,47 ± 19,22	119,18 ± 16,30

Примітка. Результати представлено як абсолютні дані (мкмоль/л, середнє ± SD), ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні: статистично вірогідна різниця відносно контролю (*) та відносно L-аргінінового панкреатиту (#) з $P \leq 0,05$; n = 6

Концентрація замінних амінокислот у плазмі крові також змінилася у щурів з експериментальним панкреатитом (табл. 3.1): рівень аспарагіну достовірно знизився на 29,1 % ($P < 0,05$), незначне зниження глутаміну не було статистично значущим, тоді як рівень продуктів дезамінування цих амінокислот – аспартату та глутамату збільшився на 48,7 % ($P < 0,05$) і 38,3 % ($P < 0,05$) відповідно. Введення натрій пірувату тваринам з L-аргінін-індукованим панкреатитом спричинило значне зниження аспартату на 29,9 % ($P < 0,05$) та зростання глутаміну на 42,4 % ($P < 0,05$) відносно рівня цих амінокислот у тварин з панкреатитом (табл. 3.1). Концентрація аргініну в плазмі крові щурів з панкреатитом не змінювалася, тоді як рівень його метаболіту в циклі сечовини – орнітину знизився на 44,6 % ($P < 0,05$) у тварин з панкреатитом (табл. 3.1). Натрій піруват відновив вміст орнітину в плазмі до контрольного рівня. У тварин з панкреатитом серед амінокислот, які, як відомо, пов'язані з метаболізмом пірувату, лише серин і цистин знизилися на 41,6 % ($P < 0,05$) і 33,4 % ($P < 0,05$) відповідно, тоді як концентрація аланіну залишалась схожою до контролю (табл. 3.1). Застосування натрій пірувату значно підвищувало концентрацію серину в плазмі крові тварин з L-аргінін-індукованим панкреатитом – до рівня, вищого за контроль, при незначному зниженні рівня цистеїну (табл. 3.1). Таурин у плазмі не змінився у всіх групах тварин (табл. 3.1).

У нашому дослідженні важливо відрізнити прямі метаболічні ефекти введення L-аргініну та натрій пірувату від ознак панкреатиту. Оскільки ми вимірювали вміст амінокислот у плазмі крові через 7 днів після ін'єкції L-аргініну,

вважаємо, що всі прямі ефекти метаболізму амінокислоти повинні були припинитися. Дійсно, наші результати відрізняються від даних, отриманих одразу після ін'єкції L-аргініну щурам [27; 180]. Через 30 хвилин після ін'єкції амінокислоти, аргінін, орнітин і таурин значно підвищувались у плазмі крові, глутамат зменшився, але рівні інших амінокислот не змінилися [27]. В іншому дослідженні використовували ту саму дозу L-аргініну, що й ми, і показали, що через 24 години рівні L-аргініну та орнітину впали нижче контрольних значень [180]. Крім того, концентрація більшості інших незамінних (метіонін, фенілаланін, валін, лізин) і замінних (глутамін, аспартат, серин і аланін) амінокислот була нижчою, ніж у контролі, лише частково нагадуючи результати нашого дослідження. Ці зміни супроводжувалися ураженням підшлункової залози [180]. Таким чином, зміни рівня амінокислот у плазмі крові через 8 днів після введення L-аргініну пов'язані з пошкодженням підшлункової залози, яке спостерігалось в нашому дослідженні.

Повідомлялося, що у плазмі крові пацієнтів з гострим та хронічним панкреатитом спостерігаються низькі концентрації незамінних амінокислот: метіоніну, лейцину, ізолейцину та валіну [60; 162]. Рівень лізину знижується лише за довготривалих уражень підшлункової залози у пацієнтів із хронічним панкреатитом [60]. Раніше показано, що рівень метіоніну, фенілаланіну, лізину та валіну в сироватці крові зменшився у щурів через 24 години після ін'єкції L-аргініну [27; 180]. У нашому дослідженні у тварин з гострим панкреатитом виявлено зниження незамінних амінокислот, крім лізину.

Ми припустили, що зниження незамінних амінокислот за панкреатиту пов'язане з голодуванням тварин, оскільки панкреатит часто призводить до втрати ваги через зменшення споживання їжі (викликане болем та / або постійним зловживанням алкоголем) та розладом травлення. Але є дані, які суперечать нашій гіпотезі. Повідомлялося, що під час голодування підвищуються рівні незамінних амінокислот з розгалуженим ланцюгом [5; 80] через зміни метаболічних процесів у м'язах [78]. Зниження кількості незамінних амінокислот за гострого панкреатиту

може бути пов'язане з порушенням секреції та активації протеолітичних ферментів (трипсиногену, хімотрипсину, еластази та інших) і порушення енергетичного обміну в мітохондріях ацинарних клітин підшлункової залози. Крім того, в умовах запалення посилюється катаболізм білків у скелетних м'язах.

Гострий панкреатит людини був пов'язаний з негативним балансом азоту, що корелює з важкістю захворювання [22]. Трансамінування незамінних амінокислот є ключовим процесом підтримки азотистого балансу. Підвищене дезамінування амінокислот за панкреатиту може бути адаптивною реакцією організму на дефіцит субстратів окиснення. Зниження рівня глутаміну в сироватці крові та підвищення рівня глутамату пов'язане з діабетом 2 типу людини [109] та гострим панкреатитом [161; 162]. Рівень аспарагіну знизився в крові хворих на гострий панкреатит [162]. У нашому експерименті на тваринах з L-аргінін-індукованим панкреатитом рівень глутаміну в плазмі був нормальним, рівень аспарагіну знижувався, але рівні аспартату і глутамату підвищувалися.

Зниження рівня глутаміну в плазмі крові може бути пов'язане з використанням цієї амінокислоти інфільтративними імунними клітинами підшлункової залози. За умов травматичних станів глутамін інтенсивно поглинається макрофагами, нейтрофілами та лімфоцитами [133] і бере участь як в енергетичному метаболізмі, так і в регуляції експресії генів, впливаючи на проліферацію клітин, синтез цитокінів і поверхневі рецептори [38].

Підвищений рівень аспартату зі зниженою концентрацією аспарагіну за гострого панкреатиту може бути наслідком активації аспарагінази та пригнічення активності аспарагінсинтази [131].

За гострого панкреатиту рівень АТФ в ацинарних клітинах підшлункової залози значно знижується [46]. Порушення функціонального стану мітохондрій робить відновлення синтезу АТФ практично неможливим. Зниження метаболічної активності в ацинарних клітинах підшлункової залози та активація запалення за гострого панкреатиту призводять до дефіциту енергетичних субстратів і посилення катаболізму деяких амінокислот. За умов, коли співвідношення аланін :

серин збільшується, утворюються 1-дезоксисфінголіпіди, які є цитотоксичними для ацинарних клітин підшлункової залози та сприяють важкості гострого панкреатиту у діабетичних мишей [33]. За нашими даними, у тварин з гострим панкреатитом серед амінокислот, які катаболізуються до пірувату, знижувалися рівні серину та цистину в плазмі крові.

Рівень аланіну знижується у пацієнтів і щурів з гострим панкреатитом [162; 180].

Піруват, аніонна форма 2-оксо-пропіонової кислоти, відіграє ключову роль у метаболізмі, будучи кінцевим продуктом гліколізу та вихідним субстратом для ЦТК. Він також є ефективним поглиначем активних форм кисню та перекису водню. Однак використання пірувату як терапевтичного засобу обмежене через відносно низьку стабільність у водному розчині [92]. Для вивчення дії пірувату використовують його більш стабільну форму етилпіруват [171]. Однак потенційно шкідливий вплив етанолу, що виділяється в результаті ефірного розщеплення етилпірувату, може обмежити концентрацію субстрату. Тому в нашому дослідженні використовувався натрій піруват як безпечний терапевтичний засіб. Раніше було показано, що натрій піруват більш ефективний, ніж етилпіруват, у лікуванні геморагічного шоку у щурів [168].

Встановлено, що піруват нормалізував рівень більшості незамінних амінокислот у плазмі крові, ймовірно, завдяки покращенню зовнішньосекреторної функції підшлункової залози. Введення натрій пірувату тваринам з гострим панкреатитом знижувало концентрацію глутаміну, але відновлювало нормальний рівень аспарагіну. Аспарагін є амідом L-аспартату. У людини він синтезується з оксалоацетату, субстрату ЦТК, рівень якого, очевидно, відновлюється під впливом натрій пірувату [123]. Натрій піруват відновлював рівень серину і цистеїну, ймовірно, впливаючи на анаболізм цих амінокислот. Серин утворюється під час катаболізму гліцину, а цистеїн синтезується з гомоцистеїну і серину. Обидві амінокислоти катаболізуються до пірувату [192; 204]. Нормалізація мітохондріальних процесів, відновлення клітинного рівня АТФ разом із

відсутністю дефіциту субстратів окиснення під впливом натрій пірувату може знижувати потребу клітини в катаболізмі амінокислот, що призводить до підвищення їхньої концентрації в крові. Аланін транспортується в кров з багатьох тканин, переважно з м'язів, в яких він виробляється з пірувату [56]. Під час тренування вироблення аланіну м'язами збільшується [11], однак раніше було показано, що прийом натрій пірувату за годину до тренування не впливає на концентрацію аланіну в крові [138]. У нашому дослідженні рівень аланіну залишився незмінним у всіх трьох групах. Рівень орнітину нормалізувався під впливом пірувату, але біохімічний механізм цього впливу залишається незрозумілим.

Підсумки до розділу

Введення натрій пірувату повністю або частково нормалізувало концентрацію амінокислот у плазмі крові щурів з L-аргінін-індукованим гострим панкреатитом, але не впливало на важкість гострого панкреатиту.

Представлені результати опубліковано у статті [208] та матеріалах конференцій [34].

РОЗДІЛ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

У цій дисертаційній роботі досліджено вплив амінокислот у різних концентраціях на дихання та життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози. Одержані нами результати свідчать, що ефект деяких амінокислот на панкреатичні ацинуси реалізується через мітохондріальне окиснення (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Вплив (% від контролю) амінокислот на частоту роз'єданого дихання

		Амінокислота (ммоль/л)				Амінокислота (ммоль/л) + глюкоза (10 (ммоль/л))			
		0,1	1	5	20	0,1	1	5	20
		Глутамат				Глутамат + глюкоза			
ФССТР, МКМОЛЬ/ Л	0	-	17,98	14,20	-2,08	-	1,41	-3,09	-3,79
	0,5	-	20,72 *	21,01 *	41,65 *	-	18,73	19,92	31,66
	1	-	23,31	58,65 *	107,36 *	-	30,94 *	34,15 *	66,82 *
	1,5	-	34,37 *	91,40 *	168,49 *	-	36,56 *	45,49 *	95,83 *
	2	-	36,25	114,38 *	192,74 *	-	62,58 *	87,04 *	130,7 *
		Глутамін				Глутамін + глюкоза			
ФССТР, МКМОЛЬ/ Л	0	7,30	3,34	11,23	-5,97	-23,07	-10,07	-12,15	-12,95
	0,5	-3,57	-4,60	-1,48	-16,28	-16,40	-5,18	-11,34	-3,11
	1	-1,61	-0,87	-1,17	-14,92	-11,35	-8,79	-13,12	-9,56
	1,5	1,62	18,09	11,42	-5,92	-7,63	6,32	1,75	7,45
	2	20,42	44,60 *	47,25 *	23,87	1,75	41,32 *	32,46 *	31,09 *
		Аланін				Аланін + глюкоза			
ФССТР, МКМОЛЬ/ Л	0	4,36	1,15	-3,94	-13,58	-2,99	-12,06	-4,34	7,64
	0,5	16,50 *	-3,11	0,07	-3,73	6,96	5,60	-12,24	-3,28
	1	7,56	10,28	12,45	-3,55	-4,91	-7,93	-15,50	-3,86
	1,5	15,96	19,25	41,19 *	11,91	-2,93	6,76	-5,22	11,57
	2	30,77	49,55	95,84 *	77,25 *	17,84	34,75	38,87	75,04 *
		Лізін				Лізін + глюкоза			
ФССТР, МКМОЛЬ/ Л	0	4,07	-3,40	0,62	0,06	8,10	4,27	-1,48	2,06
	0,5	1,50	-4,54	-7,91	14,39	4,55	-5,76	-7,84	1,42
	1	-7,63	-9,34	-1,31	11,85	-0,29	-14,00	-3,96	0,29
	1,5	17,42	4,08	51,39 *	42,59 *	-1,08	-11,66	17,67	9,40
	2	8,43	3,13	15,59	52,33 *	13,65	8,85	43,27 *	40,21
		Аспарат				Аспарат + глюкоза			
ФССТР,	0	-3,15	6,81	0,52	-7,17	-16,11	-2,23	-4,66	-23,33

МКМОЛЬ/ Л	0,5	1,39	1,30	6,82	-2,33	-12,02	-3,33	-4,40	-23,58
	1	9,75	17,27	22,66	7,39	-10,43	2,01	5,77	-7,55
	1,5	6,84	19,02	35,73 *	24,47	-20,59	-9,48	0,38	3,42
	2	8,43	16,28	42,99 *	26,94	-27,99 *	-15,51	1,50	10,72
		Аспарагін				Аспарагін + глюкоза			
ФССР, МКМОЛЬ/ Л	0	6,57	2,99	-7,26	-12,22	-11,00	-3,65	-15,37	-20,57
	0,5	4,52	2,93	10,05	16,21	-10,75	-5,17	-14,05	-19,71
	1	7,97	17,62	23,34	26,56	-8,04	-6,93	-6,43	-10,58
	1,5	10,16	20,97	24,90	19,00	-8,09	-4,11	5,41	-7,76
	2	13,39	27,38	23,51	-1,21	-12,37	-6,16	8,58	-9,68
		Аргінін				Аргінін + глюкоза			
ФССР, МКМОЛЬ/ Л	0	-3,13	4,78	5,61	8,08	10,72	17,51	20,47	10,52
	0,5	-2,53	3,91	18,36	20,14	3,73	5,24	7,68	2,83
	1	-6,46	8,37	22,34 *	2,78	5,32	1,90	8,64	-4,99
	1,5	3,94	23,33	18,69	-7,33	-14,27	-2,59	8,63	-19,99
	2	-6,60	18,63	2,56	-4,88	-8,56	-12,34	13,59	-18,04
		Гістидин				Гістидин + глюкоза			
ФССР, МКМОЛЬ/ Л	0	5,33	16,01	7,32	9,27	-2,28	-17,82	2,51	-8,24
	0,5	3,71	27,13	11,98	11,36	-0,17	-18,75	-0,04	0,97
	1	13,69	23,13	14,98	23,30	-0,25	-17,72	6,94	4,29
	1,5	14,76	31,80	21,35	16,06	5,15	-13,03	13,63	3,80
	2	7,51	23,97	24,12	4,56	26,45	-10,62	36,89 *	2,25

Примітка. Червоний – зниження відносно контролю, зелений – підвищення відносно контролю, білий – близько до контрольного рівня. Жирний шрифт – статистично вірогідна різниця відносно контролю (*) з $P \leq 0,05$ за даними двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні; n=5-9

На основі отриманих результатів та даних літератури пропонуємо узагальнюючу схему шляхів окиснення амінокислот у мітохондріях та їхнього впливу на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози (рис. 4.1).

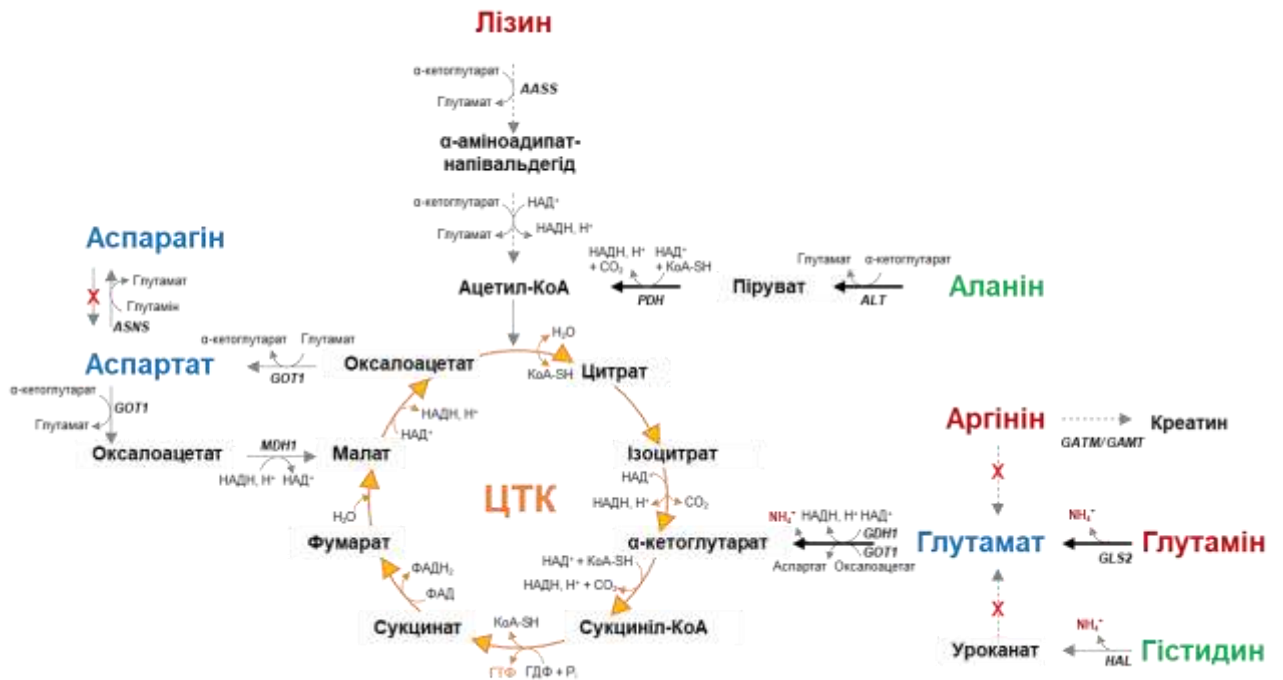


Рис. 4.1. Схема метаболічних шляхів амінокислот у панкреатичних ацинусах: зелений шрифт – безпечні амінокислоти; червоний шрифт – амінокислоти, які спричиняють загибель клітин; блакитний шрифт – амінокислоти, які дещо знижують життєздатність (за порушенням цілісності плазматичної мембрани); жирними стрілками позначено реакції швидкого окиснення амінокислот; перекреслені стрілки – реакції не відбуваються в панкреатичних ацинусах; AASS – альфа-аміноадипінова напівальдегідсинтаза, ALT – аланінамінотрансфераза, ASNS – аспарагінсинтаза, GATM – гуанідіноацетат N-метилтрансфераза, GAMT – гліцинамідінотрансфераза, GDH1 – глутаматдегідрогеназа 1, GLS2 – глутаміназа 2, GOT1 – аспартаттрансаміназа 1, HAL – гістидин-аміакліаза, MDH1 – малатдегідрогеназа, PDH – піруватдегідрогеназний комплекс

Експеримент із роз'єднаним диханням був розроблений для того, щоб продемонструвати здатність або нездатність мітохондрій у ацинарних клітинах підшлункової залози окиснювати досліджувані амінокислоти в умовах

надзвичайної потреби у відновлювальних еквівалентах. Такі умови можуть частково імітувати патологічний стан ацинарних клітин під час гострого панкреатиту, як зі зниженим потенціалом мітохондріальної мембрани, так і з нестачею утворення АТФ. Якщо амінокислота у високій концентрації не впливає на споживання кисню за таких умов, можна зробити висновок, що мітохондрії значною мірою не здатні окиснювати цю амінокислоту. У протилежному випадку позитивний вплив амінокислоти на роз'єднане 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.

Ми встановили, що глютамінова кислота, глютамін, аланін, лізин і аспарагінова кислота можуть окиснюватись в мітохондріях ацинарних клітин підшлункової залози. З'ясовано, що здатність вступати у процеси мітохондріального дихання для деяких амінокислот залежить від наявності у середовищі інкубації альтернативних субстратів окиснення. Вплив аланіну, лізину і аспарагінової кислоти на швидкість поглинання кисню дещо зменшується за наявності глюкози. Тоді як ефект глютамату і глютаміну не залежить від доступності альтернативних джерел енергії.

Ми дослідили, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози щурів не можуть окиснювати аспарагін, аргінін і гістидин. Це підтверджується даними про відсутність експресії у підшлунковій залозі ключових ферментів катаболізму цих амінокислот. Підшлункова залоза експресує перший фермент шляху катаболізму гістидину – гістидин-аміакліазу [101], але немає даних про експресію уроканази / уроканатгідратази 1 або гістидиндекарбоксилази. Не знайдено даних літератури про наявність аспарагінази в підшлунковій залозі. Кілька шляхів метаболізму аргініну не функціонують у здоровій підшлунковій залозі (наприклад, ферменти аргініндекарбоксилази, аргінази та NO-синтази), за

винятком шляху синтезу креатину з доведеною експресією аргінін-гліцинамідінотрансферази та гуанідіноацетат-N-метилтрансферази [41; 52]. Однак цей шлях безпосередньо не призводить до мітохондріального окиснення.

Стимулятори панкреатичної секреції у високій концентрації викликають токсичне підвищення $[Ca^{2+}]$. Аномальні Ca^{2+} -сигнали призводить до дисфункції ацинарних клітин підшлункової залози, сприяючи пошкодженню мітохондрій [37]. Ми вивчали захисний ефект глутаміну у фізіологічній концентрації на мітохондріальне дихання і життєздатність панкреатичних ацинусів за стимуляції секретогогами у помірній (0,1 нмоль/л) і високій концентрації (10 нмоль/л).

Встановлено, що глутамін знижує FCCP-стимульовану швидкість дихання за стимуляції клітин ХЦК у концентрації 0,1 нмоль/л. За наявності у середовищі інкубації глутаміну разом з іншими субстратами окиснення (піруват і глюкоза) за дії ХЦК у високій концентрації (10 нмоль/л) швидкість роз'єданого окиснення знижується. Показано, глутамін не впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози за гіперстимуляції ХЦК.

Ми припустили, що негативний ефект глутаміну на мітохондріальне дихання може бути пов'язаний з гіперпродукцією аміаку в результаті катаболізму глутаміну до глутамату.

З'ясовано, що окиснення глутаміну на тлі глюкози в підшлунковій залозі сприяє зростанню швидкості роз'єданого дихання навіть за підвищеної $[Ca^{2+}]$, зумовленої стимуляцією секреторними агентами. Очевидно, що катаболізм глутаміну у концентрації 2 ммоль/л не пов'язаний з утворенням аміаку в токсичних концентраціях.

Незначне зниження глутаміну в плазмі крові за гострого панкреатиту в щурів у нашому дослідженні, а також у пацієнтів з гострим панкреатитом у інших дослідженнях [161; 162] може бути пов'язане з дефіцитом засвоєння глутаміну, що виникає через атрофію слизової оболонки кишечника, порушення кишкового бар'єру та імунних функцій [182].

Амінокислоти широко застосовують як харчові добавки. Спортсмени використовують амінокислоти та їх похідні для збільшення м'язової маси і відстрочення настання втоми. Люди також споживають амінокислоти для підтримки імунної системи, покращення пам'яті, пом'якшення депресії, запобігання головного болю та допомоги хворим на безсоння [79]. Аланіл-глутамін дипептид [200] і лізин [8] показали позитивний вплив на стан за гострого панкреатиту у людини і тварин. Ми дослідили вплив амінокислот у високій концентрації (20 ммоль/л) на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози.

Нами встановлено, що аланін і гістидин є безпечними для панкреатичних ацинусів, тому що вони не змінюють кількість мертвих клітин за довготривалої інкубації. Аланін може реалізувати захисний вплив через катаболізм до пірувату за допомогою аланін-трансамінази [122]. Піруват *in vitro* посилює окиснювальну та АТФ-продуктивну здатність мітохондрій і захищає ацинарні клітини підшлункової залози від токсичних речовин [147].

У нашому дослідженні рівень аланіну не змінювався у плазмі крові тварин з L-аргініновим панкреатитом. Проте результати досліджень у людей з гострим панкреатитом показали зниження рівня амінокислоти [161; 162]. Цей ефект може бути зумовлений катаболізмом аланіну в печінці для забезпечення достатнього рівня АТФ [124]. Враховуючи високу окисну здатність і безпечність аланіну для ацинарних клітин підшлункової залози, аланін може бути потенційним кандидатом для дослідження терапевтичного ефекту за гострого панкреатиту.

Ми дослідили, що аспарагін, аспартат і глутамінова кислота дещо збільшують кількість мертвих клітин у середовищі після довготривалої інкубації.

Ми показали, що у плазмі крові тварин з L-аргінін-індукованим гострим панкреатитом знижується рівень аспарагіну і підвищується рівень глутамату і аспартату. Ймовірно, за панкреатиту порушується як всмоктування, так і синтез

аспарагіну. Ми припускаємо, що підвищення глутамату може бути пов'язаним з посиленням процесів трансамінування амінокислот за гострого панкреатиту. Дані про рівень аспартату у плазмі крові – суперечливі. У людей з гострим панкреатитом рівень аспартату залишається незмінним. Достеменно не відомо, які саме тканини є джерелом глутамату та аспартату за гострого панкреатиту у щурів.

Лізин і аргінін за довготривалого впливу призводять до некротичної загибелі всіх панкреатичних ацинусів у середовищі інкубації. Ці результати узгоджуються з даними літератури, оскільки лізин і аргінін використовують у тваринних моделях гострого панкреатиту [17; 205].

Найбільш несподіваним результатом нашого дослідження є некротична загибель ацинарних клітинах підшлункової залози за довготривалого впливу глутаміну. Раніше було показано, що *in vivo* глутамін посилює апоптоз ацинарних клітин у щурів із важким гострим панкреатитом [199]. Очевидно, механізм загибелі клітин відрізняється від некрозу, індукованого лізином або аргініном. Глутамін викликав значне набрякання клітин і блебінг з подальшим некрозом. Цікаво, що глутамат, прямий метаболіт глутаміну, не викликав таких шкідливих ефектів у ацинарних клітинах підшлункової залози. Відомо, що глутамін спонтанно розкладається в розчинах, утворюючи аміак [142]. Глутамін також бере участь в набряку астроцитів, викликаному аміаком [6], але ці механізми потребують подальших досліджень. Ми припускаємо, що накопичення аміаку є основною причиною набряку та некрозу ацинарних клітин підшлункової залози, індукованого глутаміном у високій концентрації (20 ммоль/л).

Мітохондрії підшлункової залози мишей і щурів з експериментальним гострим панкреатитом демонструють знижену здатність генерувати мембранний потенціал [18]. Тому важливо знайти субстрати окиснення, які сприятимуть відновленню окиснювальної здатності мітохондрій і збільшенню виробництва АТФ для захисту ацинарних клітин. Ми припустили, натрій

піруват позитивно впливатиме на L-аргінін-індукований гострий панкреатит у щурів.

Встановлено, що піруват не змінює морфологію підшлункової залози, але нормалізує рівень амінокислот у плазмі крові.

За нормальних умов концентрація амінокислот у плазмі крові коливається у фіксованих межах. У здорових людей склад вільних амінокислот у плазмі крові залежить від багатьох факторів, наприклад дієти, фізичної активності, добового ритму тощо. За панкреатиту рівень амінокислот у плазмі крові змінюється [161; 162] через дефіцит травних ферментів [47], порушення всмоктування в кишечнику або системне запалення [164].

Ми припускаємо, що натрій піруват сприяє 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 з дії пірувату можна пояснити покращенням зовнішньосекреторної функції підшлункової залози і, як наслідок, інтенсифікації розщеплення білків в процесі травлення. Рівень серину і цистеїну нормалізувався, ймовірно, через підвищення анаболізму цих амінокислот з пірувату [192; 204].

Отримані результати підтверджують позитивний вплив натрій пірувату *in vivo* на функціонування ацинарних клітин підшлункової залози за амінокислот-індукованого гостро панкреатиту.

Отже, амінокислоти впливають на енергетичні процеси ацинарних клітин підшлункової залози як за фізіологічних, так і за патологічних умов, а використання окремих амінокислот та інших субстратів окиснення може бути корисним для корекції мітохондріальної дисфункції за гострого панкреатиту.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі експериментально обґрунтовано вплив амінокислот на енергетичне забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози.

На основі аналізу отриманих результатів зроблено такі висновки:

1. Глутамінова кислота, глутамін, аланін, лізин і аспарагінова кислота залучені в мітохондріальні процеси окиснення у ацинарних клітинах підшлункової залози. Глутамінова кислота і глутамін зумовлюють прискорення роз'єданого дихання як за відсутності альтернативних субстратів окиснення, так і за наявності глюкози. За окиснення аланіну, лізину і аспарагінової кислоти, наявність глюкози в середовищі інкубації дещо знижує ефект амінокислот на швидкість мітохондріального дихання. Аспарагін, аргінін і гістидин не окиснюються в мітохондріях ацинарних клітин підшлункової залози.

2. Глутамін знижує швидкість роз'єданого мітохондріального дихання, але не впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози за стимуляції ХЦК у помірній (0,1 нмоль/л) і високій концентрації (10 нмоль/л). NH_4Cl *in vitro* негативно впливає на мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози незалежно від стимуляції АХ або ХЦК. За окиснення глутаміну максимальна швидкість дихання збільшується навіть за стимуляції ацинарних клітин секретогогами, що свідчить про те, що токсична кількість аміаку не утворюється.

3. За короткотривалого впливу амінокислот у високій концентрації (20 ммоль/л) *in vitro* ацинарні клітини гинуть здебільшого шляхом некрозу. За довготривалої інкубації аспарагін, аспарагінова кислота і глутамат збільшують частку некротичних клітин, тоді як аргінін, лізин і глутамін призводять до некротичної загибелі усіх клітин в інкубаційному середовищі. Аланін і гістидин не змінюють життєздатності панкреатичних ацинусів. Глутамін у високій

концентрації викликає блебінг і набряк, а також призводить до некрозу ацинарних клітин підшлункової залози.

4. На моделі L-аргінін-індукованого гострого панкреатиту встановлено, що введення натрій піруват *in vivo* відновлює нормальний рівень метіоніну, фенілаланіну, триптофану, глутаміну, аспартату, орнітину, серину і цистеїну у плазмі крові, але не викликає явного покращення морфології підшлункової залози.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білонога, О. О., Манько, Б. О., Манько, В. В. (2019). Вплив ацетилхоліну та холецистокініну на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. *Фізіологічний журнал*, 65(4), 73–81.
2. Зуб, А., Манько, Б.О., Манько, В.В. (2019). Залучення амінокислот у процеси мітохондріального дихання впливає на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози щурів. [Тези доповіді]. Матеріали чергового VIII з'їзду Українського біофізичного товариства. Київ, Україна, 33.
3. Манько Б. О., Волошин, Д., Манько В. В. (2013). Дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, 61, 172–179.
4. Якубовська, А., Манько, Б.О., Манько, В.В. (2019). Вплив аргініну і лізину на адаптаційну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів. [Тези доповіді]. 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.
5. Adibi, S. (1971). Interrelationships between level of amino acids in plasma and tissues during starvation. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 221(3). <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.221.3.829>
6. Albrecht, J., Zielińska, M., & Norenberg, M. D. (2010). Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochemical Pharmacology*, 80(9), 1303–1308. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.07.024>
7. Alhan, E., Usta, A., Türkyılmaz, S., Kural, B. V., & Erçin, C. (2015). Effects of glutamine alone on the acute necrotizing pancreatitis in rats. *Journal of Surgical Research*, 193(1). <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.07.029>
8. Al-Malki, A. L. (2015). Suppression of acute pancreatitis by L-lysine in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0729-x>

9. Araya, S., Kuster, E., Gluch, D., Mariotta, L., Lutz, C., Reding, T. V., Graf, R., Verrey, F., & Camargo, S. M. R. (2018). Exocrine pancreas glutamate secretion help to sustain enterocyte nutritional needs under protein restriction. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00135.2017>
10. Arutla, M., Raghunath, M., Deepika, G., Jakkampudi, A., Murthy, H. V. V., Rao, G. V., Reddy, D. N., & Talukdar, R. (2019). Efficacy of enteral glutamine supplementation in patients with severe and predicted severe acute pancreatitis—A randomized controlled trial. *Indian Journal of Gastroenterology*, 38(4), 338–347. <https://doi.org/10.1007/s12664-019-00962-7>
11. Babij, P., Matthews, S. M., & Rennie, M. J. (1983). Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 50(3). <https://doi.org/10.1007/BF00423246>
12. Baker, P. F., & Knight, D. E. (1978). Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. *Nature*, 276(5688), 620–622. <https://doi.org/10.1038/276620a0>
13. Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landázuri, M. O., & Enríquez, J. A. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metabolism*, 16(3). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.015>
14. Biancur, D. E., Paulo, J. A., Małachowska, B., Quiles Del Rey, M., Sousa, C. M., Wang, X., Sohn, A. S. W., Chu, G. C., Gygi, S. P., Harper, J. W., Fendler, W., Mancias, J. D., & Kimmelman, A. C. (2017). Compensatory metabolic networks in pancreatic cancers upon perturbation of glutamine metabolism. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms15965>
15. Biczó, G., Hegyi, P., Berczi, S., Dósa, S., Hracskó, Z., Varga, I. S., Iványi, B., Venglovecz, V., Wittmann, T., Takács, T., & Rakonczay, Z. (2010). Inhibition of

- arginase activity ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas*, 39(6). <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181d371f8>
16. Biczó, G., Hegyi, P., Dósa, S., Balla, Z., Venglovecz, V., Iványi, B., Wittmann, T., Takács, T., & Rakonczay, Z. (2011). Aliphatic, but not imidazole, basic amino acids cause severe acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas*, 40(3). <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31820a598a>
 17. Biczó, G., Hegyi, P., Dósa, S., Shalbuyeva, N., Berczi, S., Sinervirta, R., Hracskó, Z., Siska, A., Kukor, Z., Jármai, K., Venglovecz, V., Varga, I. S., Iványi, B., Alhonen, L., Wittmann, T., Gukovskaya, A., Takács, T., & Rakonczay, Z. (2011). The crucial role of early mitochondrial injury in L-lysine-induced acute pancreatitis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(10). <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4065>
 18. Biczó, G., Vegh, E. T., Shalbuyeva, N., Mareninova, O. A., Elperin, J., Lotshaw, E., Gretler, S., Lugea, A., Malla, S. R., Dawson, D., Ruchala, P., Whitelegge, J., French, S. W., Wen, L., Husain, S. Z., Gorelick, F. S., Hegyi, P., Rakonczay, Z., Gukovsky, I., & Gukovskaya, A. S. (2018). Mitochondrial dysfunction, through impaired autophagy, leads to endoplasmic reticulum stress, deregulated lipid metabolism, and pancreatitis in animal models. *Gastroenterology*, 154(3). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.012>
 19. Binet, Q., Dufour, I., Agneessens, E., Debongnie, J.-C., Aouattah, T., Covas, A., Coche, J.-C., & De Koninck, X. (2018). The second case of a young man with L-arginine-induced acute pancreatitis. *Clinical Journal of Gastroenterology*, 11(5). <https://doi.org/10.1007/s12328-018-0862-4>
 20. Bolender, R. P. (1974). Stereological analysis of the guinea pig pancreas. *Journal of Cell Biology*, 61(2). <https://doi.org/10.1083/jcb.61.2.269>
 21. Bott, A. J., Shen, J., Tonelli, C., Zhan, L., Sivaram, N., Jiang, Y.-P., Yu, X., Bhatt, V., Chiles, E., Zhong, H., Maimouni, S., Dai, W., Velasquez, S., Pan, J.-A., Muthalagu, N., Morton, J., Anthony, T. G., Feng, H., Lamers, W. H., Murphy, D. J., Guo, J. Y., Jin, J., Crawford, H. C., Zhang, L., White, E., Lin, R. Z., Su, X., Tuveson, D. A., & Zong, W.-X. (2019). Glutamine anabolism plays a critical role in pancreatic cancer

- by coupling carbon and nitrogen metabolism. *Cell Reports*, 29(5), 1287-1298.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.056>
22. Bouffard, Y. H., Delafosse, B. X., Annat, G. J., Viale, J. P., Bertrand, O. M., & Motin, J. P. (1989). Energy expenditure during severe acute pancreatitis. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 13(1). <https://doi.org/10.1177/014860718901300126>
23. Boyle, J. (2005). Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>
24. Braun, R. J., Sommer, C., Leibiger, C., Gentier, R. J. G., Dumit, V. I., Paduch, K., Eisenberg, T., Habernig, L., Trausinger, G., Magnes, C., Pieber, T., Sinner, F., Dengjel, J., van Leeuwen, F. W., Kroemer, G., & Madeo, F. (2015). Accumulation of basic amino acids at mitochondria dictates the cytotoxicity of aberrant ubiquitin. *Cell Reports*, 10(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.009>
25. Brosnan, J. T., da Silva, R. P., & Brosnan, M. E. (2011). The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids*, 40(5), 1325–1331. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0853-y>
26. Brosnan, M. E., & Brosnan, J. T. (2020). Histidine metabolism and function. *The Journal of Nutrition*, 150, 2570S–2575S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa079>
27. Buchmann, I., Milakofsky, L., Harris, N., Hofford, J. M., & Vogel, W. H. (1996). Effect of arginine administration on plasma and brain levels of arginine and various related amino compounds in the rat. *Pharmacology*, 53(3). <https://doi.org/10.1159/000139424>
28. Buchwalow, I., Schnekenburger, J., Tiemann, K., Samoilova, V., Bankfalvi, A., Poremba, C., Schleicher, C., Neumann, J., & Boecker, W. (2013). L-arginine-NO-cGMP signalling pathway in pancreatitis. *Scientific Reports*, 3(1), 1899. <https://doi.org/10.1038/srep01899>

29. Gattiker, C., Poncet, N., Pellegrini, G., Roth, E., Cheng, J., Verrey, F., & Camargo, S. M. (2018). Poster Communications: Role of neutral amino acid transporter LAT1 in acute pancreatitis regeneration. *Proc Physiol Soc.*
30. Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Shannon, R. J., Hirst, J., & Walker, J. E. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(43). <https://doi.org/10.1074/jbc.M607135200>
31. Chang, T. W., & Goldberg, A. L. (1978). The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, *253*(10). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34855-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34855-X)
32. Chatila, A. T., Bilal, M., & Guturu, P. (2019). Evaluation and management of acute pancreatitis. *World Journal of Clinical Cases*, *7*(9), 1006–1020. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i9.1006>
33. Chen, R., Hornemann, T., Štefanić, S., Schraner, E. M., Zuellig, R., Reding, T., Malagola, E., Henstridge, D. C., Hills, A. P., Graf, R., & Sonda, S. (2020). Serine administration as a novel prophylactic approach to reduce the severity of acute pancreatitis during diabetes in mice. *Diabetologia*, *63*(9). <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05156-x>
34. Chipak, S., Zub, A., Ostapiv, 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. [Abstract]. 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.
35. Chu, S.-H. W., & Hegsted, D. M. (1976). Adaptive response of lysine and threonine degrading enzymes in adult rats. *The Journal of Nutrition*, *106*(8), 1089–1096. <https://doi.org/10.1093/jn/106.8.1089>
36. Coltorti, M., di Simone, A., & Budillon, G. (1966). Histidase and urocanase activities of liver and plasma. Correlations between tissue enzyme levels and plasmatic

- increases during human and mouse viral hepatitis. *Clinica Chimica Acta*, 13(5), 568–573. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(66\)90160-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(66)90160-4)
37. Criddle, D. N., McLaughlin, E., Murphy, J. A., Petersen, O. H., & Sutton, R. (2007). The pancreas misled: signals to pancreatitis. *Pancreatology*, 7(5–6), 436–446. <https://doi.org/10.1159/000108960>
38. Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine: metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients*, 10(11), 1564. <https://doi.org/10.3390/nu10111564>
39. Cunningham, G. A., Mcclenaghan, N. H., Flatt, P. R., & Newsholme, P. (2005). L-alanine induces changes in metabolic and signal transduction gene expression in a clonal rat pancreatic β -cell line and protects from pro-inflammatory cytokine-induced apoptosis. *Clinical Science*, 109(5), 447–455. <https://doi.org/10.1042/CS20050149>
40. Fukushima, D., Doi, H., Fukushima, K., Katsura, K., Ogawa, N., Sekiguchi S., Fujimori, K., Sato, A., Satomi, S., Ishida, K., & Fukushima., K. (2010). Glutamate exocrine dynamics augmented by plasma glutamine and the distribution of amino acid transporters of the rat pancreas. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 61(3), 265–271.
41. da Silva, R. P., Clow, K., Brosnan, J. T., & Brosnan, M. E. (2014). Synthesis of guanidinoacetate and creatine from amino acids by rat pancreas. *British Journal of Nutrition*, 111(4), 571–577. <https://doi.org/10.1017/S0007114513003012>
42. Dandare, S. U., Ezeonwumelu, I. J., Shinkafi, T. S., Magaji, U. F., Adio, A. A., & Ahmad, K. (2021). L-alanine supplementation improves blood glucose level and biochemical indices in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45(1). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13590>
43. Longnecker D. S. (2021). Anatomy and histology of the pancreas. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*, <https://doi.org/10.3998/panc.2021.01>
44. Dijk, D. P. J., Horstman, A. M. H., Smeets, J. S. J., Dulk, M., Grabsch, H. I., Dejong, C. H. C., Rensen, S. S., Olde Damink, S. W. M., & Loon, L. J. C. (2019). Tumour-specific and organ-specific protein synthesis rates in patients with pancreatic

- cancer. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 10(3).
<https://doi.org/10.1002/jcsm.12419>
45. Divecha, N., Banfić, H., & Irvine, R. F. (1993). Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. *Cell*, 74(3), 405–407. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80041-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80041-C)
46. Dixit, A., Cheema, H., George, J., Iyer, S., Dudeja, V., Dawra, R., & Saluja, A. K. (2019). Extracellular release of ATP promotes systemic inflammation during acute pancreatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 317(4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00395.2018>
47. Domínguez-Muñoz, J. E. (2011). Pancreatic exocrine insufficiency: Diagnosis and treatment. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06600.x>
48. Dong, S., Zhao, Z., Li, X., Chen, Z., Jiang, W., & Zhou, W. (2022). Efficacy of glutamine in treating severe acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.865102>
49. Eadie, G. S. (1942). The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *Journal of Biological Chemistry*, 146(1), 85–93. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)72452-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72452-6)
50. Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122(3168). <https://doi.org/10.1126/science.122.3168.501>
51. Edison, E. E., Brosnan, M. E., Meyer, C., & Brosnan, J. T. (2007). Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney *in vivo*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(6), F1799–F1804. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00356.2007>
52. Emerald, B. S., Mohsin, S., D'Souza, C., John, A., El-Hasasna, H., Ojha, S., Raza, H., al-Ramadi, B., & Adeghate, E. (2022). Diabetes mellitus alters the immun-expression of neuronal nitric oxide synthase in the rat pancreas. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4974. <https://doi.org/10.3390/ijms23094974>

53. Fackler, O. T., & Grosse, R. (2008). Cell motility through plasma membrane blebbing. *The Journal of Cell Biology*, *181*(6), 879–884. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802081>
54. 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. [Abstract]. 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.
55. Felig, P. (1973). The glucose-alanine cycle. *Metabolism*, *22*(2). [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(73\)90269-2](https://doi.org/10.1016/0026-0495(73)90269-2)
56. Felig, P., & Wahren, J. (1971). Amino acid metabolism in exercising man. *Journal of Clinical Investigation*, *50*(12). <https://doi.org/10.1172/JCI106771>
57. Forstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, *33*(7), 829–837. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
58. Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation*, *14*(7), 1237–1243. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402148>
59. Gerasimenko, O., Gerasimenko, J., Tepikin, A., & Petersen, O. H. (1995). ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca^{2+} from the nuclear envelope. *Cell*, *80*(3), 439–444. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90494-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90494-8)
60. Girish, B. N., Rajesh, G., Vaidyanathan, K., & Balakrishnan, V. (2011). Alterations in plasma amino acid levels in chronic pancreatitis. *Journal of the Pancreas*, *12*(1), 11–18. <https://doi.org/10.6092/1590-8577/3377>
61. Goh, D. L. M., Patel, A., Thomas, G. H., Salomons, G. S., Schor, D. S. M., Jakobs, C., & Geraghty, M. T. (2002). Characterization of the human gene encoding α -

- aminoadipate aminotransferase (AADAT). *Molecular Genetics and Metabolism*, 76(3), 172–180. [https://doi.org/10.1016/S1096-7192\(02\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S1096-7192(02)00037-9)
62. Grimm, S. (2013). Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(5). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.09.009>
63. Guda, P., Guda, C., & Subramaniam, S. (2007). Reconstruction of pathways associated with amino acid metabolism in human mitochondria. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 5(3–4), 166–176. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60004-2](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60004-2)
64. Gukovskaya, A. S., & Gukovsky, I. (2011). Which way to die: the regulation of acinar cell death in pancreatitis by mitochondria, calcium, and reactive oxygen species. *Gastroenterology*, 140(7), 1876–1880. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.025>
65. Gukovsky, I., Pandol, S. J., & Gukovskaya, A. S. (2011). Organellar dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(10). <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4068>
66. Hadych A., Yakubovska A., Manko B.O., Manko V.V. (2019). Effects of glutamine and NH₄Cl on mitochondrial respiration of rat pancreatic acinar cells. [Abstract]. 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.
67. Hallen, A., Jamie, J. F., & Cooper, A. J. L. (2013). Lysine metabolism in mammalian brain: an update on the importance of recent discoveries. *Amino Acids*, 45(6), 1249–1272. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1590-1>
68. Hegyi, P. (2004). L-arginine-induced experimental pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 10(14). <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i14.2003>
69. Hegyi, P., Maléth, J., Venglovecz, V., & Rakonczay, Z. (2011). Pancreatic ductal bicarbonate secretion: challenge of the acinar acid load. *Frontiers in Physiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00036>

70. Hegyi, Peter, & Petersen, O. H. (2013). The exocrine pancreas: the acinar-ductal tango in physiology and pathophysiology. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 165. https://doi.org/10.1007/112_2013_14
71. Heidari, R. (2019). Brain mitochondria as potential therapeutic targets for managing hepatic encephalopathy. *Life Sciences*, 218. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.030>
72. Herrmann, M., Lorenz, H.-M., Voll, R., Grinke, M., Woith, W., & Kalden, J. R. (1994). A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Research*, 22(24), 5506–5507. <https://doi.org/10.1093/nar/22.24.5506>
73. Higashino, K., Fujioka, M., & Yamamura, Y. (1971). The conversion of L-lysine to saccharopine and α -aminoadipate in mouse. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 142(2). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(71\)90525-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(71)90525-X)
74. Higashino, Kazuya, Tsukada, K., & Lieberman, I. (1965). Saccharopine, a product of lysine breakdown by mammalian liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20(3). [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(65\)90361-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(65)90361-X)
75. Hinkle, P. C., Kumar, M. A., Resetar, A., & Harris, D. L. (1991). Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry*, 30(14). <https://doi.org/10.1021/bi00228a031>
76. Hofstee, B. H. J. (1952). Specificity of esterases. *Journal of Biological Chemistry*, 199(1), 357–364. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)44843-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)44843-0)
77. Holeček, M. (2020). Histidine in health and disease: metabolism, physiological importance, and use as a supplement. *Nutrients*, 12(3), 848. <https://doi.org/10.3390/nu12030848>
78. Holeček, M. (2020). Why are branched-chain amino acids increased in starvation and diabetes? *Nutrients*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/nu12103087>
79. Holeček, M. (2022). Side effects of amino acid supplements. *Physiological Research*, 29–45. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934790>
80. Holeček, M., & Mičuda, S. (2017). Amino acid concentrations and protein metabolism of two types of rat skeletal muscle in postprandial state and after brief starvation. *Physiological Research*. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933638>

81. Huang, H., Vandekeere, S., Kalucka, J., Bierhansl, L., Zecchin, A., Brüning, U., Visnagri, A., Yuldasheva, N., Goveia, J., Cruys, B., Brepoels, K., Wyns, S., Rayport, S., Ghesquière, B., Vinckier, S., Schoonjans, L., Cubbon, R., Dewerchin, M., Eelen, G., & Carmeliet, P. (2017). Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation. *The EMBO Journal*, *36*(16), 2334–2352. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695518>
82. Huang, W., Booth, D. M., Cane, M. C., Chvanov, M., Javed, M. A., Elliott, V. L., Armstrong, J. A., Dingsdale, H., Cash, N., Li, Y., Greenhalf, W., Mukherjee, R., Kaphalia, B. S., Jaffar, M., Petersen, O. H., Tepikin, A. v, Sutton, R., & Criddle, D. N. (2014). Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca²⁺-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. *Gut*, *63*(8). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-304058>
83. Huang, W., Chvanov, M., Criddle, D., Tepikin, A., & Sutton, R. (2013). L-histidine-but not L-arginine-induced acute pancreatitis in mice involves cyclophilin D-dependent opening of mitochondrial permeability transition pore. *Pancreatology*, *13*(3). <https://doi.org/10.1016/j.pan.2013.04.023>
84. Hutzler, J., & Dancis, J. (1968). Conversion of lysine to saccharopine by human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*, *158*(1). [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(68\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(68)90072-X)
85. Iwata, S. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science*, *281*(5373). <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.64>
86. Iwatsuki, N., & Petersen, O. H. (1978). Electrical coupling and uncoupling of exocrine acinar cells. *Journal of Cell Biology*, *79*(2). <https://doi.org/10.1083/jcb.79.2.533>
87. Iwatsuki, Noriyuki, & Petersen, O. H. (1979). Direct visualization of cell to cell coupling: transfer of fluorescent probes in living mammalian pancreatic acini. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *380*(3). <https://doi.org/10.1007/BF00582906>

88. Javed, M. A., Wen, L., Awais, M., Latawiec, D., Huang, W., Chvanov, M., Schaller, S., Bordet, T., Michaud, M., Pruss, R., Tepikin, A., Criddle, D., & Sutton, R. (2018). TRO40303 ameliorates alcohol-induced pancreatitis through reduction of fatty acid ethyl ester-induced mitochondrial injury and necrotic cell death. *Pancreas*, *47*(1). <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000953>
89. Jayakumar, A. R., Rama Rao, K. V., Tong, X. Y., & Norenberg, M. D. (2009). Calcium in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Journal of Neurochemistry*, *109*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05842.x>
90. Joseph, S. K., & McGivan, J. D. (1978). The effects of ammonium chloride and bicarbonate on the activity of glutaminase in isolated liver mitochondria. *Biochemical Journal*, *176*(3). <https://doi.org/10.1042/bj1760837>
91. Juhász, M. F., Vereczkei, Z., Ocskay, K., Szakó, L., Farkas, N., Szakács, Z., Zádori, N., Wilschanski, M., Pandol, S. J., Joly, F., Capurso, G., Arcidiacono, P. G., Izbéki, F., Czakó, L., Papp, M., Czopf, L., Hegyi, P., & Párniczky, A. (2022). The Effect of dietary fat content on the recurrence of pancreatitis (EFFORT): Protocol of a multicenter randomized controlled trial. *Pancreatology*, *22*(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2021.10.002>
92. Kao, K. K., & Fink, M. P. (2010). The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochemical Pharmacology*, *80*(2). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.03.007>
93. Keller, J. (2005). Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*, *54*, 1–28. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.065946>
94. Kishino, Y., & Kawamura, S. (1984). Pancreatic damage induced by injecting a large dose of arginine. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, *47*(1). <https://doi.org/10.1007/BF02890197>
95. Kitajima, S., & Kishino, Y. (1985). Pancreatic damage produced by injecting excess lysine in rats. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, *49*(1). <https://doi.org/10.1007/BF02912107>

96. Komatsu, M., Yazaki, M., Tanaka, N., Sano, K., Hashimoto, E., Takei, Y.-i., Song, Y.-Z., Tanaka E., Kiyosawa K., Saheki, T., Aoyama, T., & Kobayashi, K. (2008). Citrin deficiency as a cause of chronic liver disorder mimicking non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, *49*, 810–820. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.05.016>
97. Konstantinov, A. A., & Ruuge, E. K. (1977). Semiquinone Q in the respiratory chain of electron transport particles Electron spin resonance studies. *FEBS Letters*, *81*(1). [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80946-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80946-0)
98. Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, *87*(1), 99–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
99. Kröger, A., & Klingenberg, M. (1973). The kinetics of the redox reactions of ubiquinone related to the electron-transport activity in the respiratory chain. *European Journal of Biochemistry*, *34*(2). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02767.x>
100. Kui, B., Balla, Z., Végh, E. T., Pallagi, P., Venglovecz, V., Iványi, B., Takács, T., Hegyi, P., & Rakonczay, Z. (2014). Recent advances in the investigation of pancreatic inflammation induced by large doses of basic amino acids in rodents. *Laboratory Investigation*, *94*(2), 138–149. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.143>
101. Kumar, N., Rachagani, S., Natarajan, G., Crook, A., Gopal, T., Rajamanickam, V., Kaushal, J. B., Nagabhishek, S. N., Powers, R., Batra, S. K., & Saraswathi, V. (2023). Histidine enhances the anticancer effect of gemcitabine against pancreatic cancer via disruption of amino acid homeostasis and oxidant-antioxidant balance. *Cancers*, *15*(9), 2593. <https://doi.org/10.3390/cancers15092593>
102. Lai, J. C. K., & Cooper, A. J. L. (1991). Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: Differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme a derivatives. *Neurochemical Research*, *16*(7). <https://doi.org/10.1007/BF00965689>

103. Lankisch, P. G., Weber-Dany, B., Doobe, C., Finger, T., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B., Alteheld, B., & Stehle, P. (2006). Low plasma glutamine levels in severe acute pancreatitis justify glutamine substitution in critically ill pancreatitis patients. *Pancreas*, 33(4), 476. <https://doi.org/10.1097/00006676-200611000-00133>
104. Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P. M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, Á., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E., & Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 340(6140). <https://doi.org/10.1126/science.1230381>
105. Laugier, R., & Petersen, O. H. (1981). Two different types of electrogenic amino acid action on pancreatic acinar cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 641(1). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90585-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90585-X)
106. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62). <https://doi.org/10.3791/3923>
107. Lennard, R., & Singh, J. (1991). Secretagogue-evoked changes in intracellular free magnesium concentrations in rat pancreatic acinar cells. *The Journal of Physiology*, 435(1), 483–492. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1991.sp018520>
108. Lerch, M. M., & Gorelick, F. S. (2013). Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 144(6). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.12.043>
109. Liu, X. J., Li, S. L., Yin, L. L., Wang, W. C., Zhou, H. T., Jia, X. M., & Li, J. S. (2019). Protective effect of glutamine on intestinal mucosal injury in SD rats with severe acute pancreatitis. *Acta Medica Mediterranea*, 35(3), 1519–1524. https://doi.org/10.19193/0393-6384_2019_3_236
110. Manangi, M. K., Hoewing, S. F. A., Engels, J. G., Higgins, A. D., Killefer, J., Wilson, M. E., & Blemings, K. P. (2005). Lysine α -ketoglutarate reductase and lysine oxidation are distributed in the extrahepatic tissues of chickens. *The Journal of Nutrition*, 135(1), 81–85. <https://doi.org/10.1093/jn/135.1.81>

111. Manko, B. O., Bilonoha, O. O., & Manko, V. V. (2019). Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization. *The Ukrainian Biochemical Journal*, *91*(3). <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.034>
112. Manko, B. O., & Manko, V. V. (2013). Influence of Ca^{2+} on kinetic parameters of pancreatic acinar mitochondria in situ respiration. *The Ukrainian Biochemical Journal*, *85*(4), 48–60. <https://doi.org/10.15407/ubj85.04.048>
113. Manko, B. O., & Manko, V. V. (2013). Mechanisms of respiration intensification of rat pancreatic acini upon carbachol-induced Ca^{2+} release. *Acta Physiologica*, *208*(4). <https://doi.org/10.1111/apha.12119>
114. 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>
115. Manko, V. V. (2007). Use of Hill equation for kinetic analysis of Ca^{2+} -transporting systems of *Chironomus plumosus* larvae secretory cells. *Studia Biologica*, *1*(1), 5–18. <https://doi.org/10.30970/sbi.0101.004>
116. Mann, G. E., Norman, P. S., & Smith, I. C. (1989). Amino acid efflux in the isolated perfused rat pancreas: trans-stimulation by extracellular amino acids. *The Journal of Physiology*, *416*(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1989.sp017773>
117. Mann, G. E., & Peran, S. (1986). Basolateral amino acid transport systems in the perfused exocrine pancreas: sodium-dependency and kinetic interactions between influx and efflux mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *858*(2). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90331-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90331-7)
118. Márta, K., Szabó, A. N., Pécsi, D., Varjú, P., Bajor, J., Gódi, S., Sarlós, P., Mikó, A., Szemes, K., Papp, M., Tornai, T., Vincze, Á., Márton, Z., Vincze, P. A., Lankó, E., Szentesi, A., Molnár, T., Hágendorn, R., Faluhelyi, N., Battyáni, I., Kelemen, D., Papp, R., Miseta, A., Verzár, Z., Lerch, M. M., Neoptolemos, J. P., Sahin-Tóth, M., Petersen, O. H., & Hegyi, P. (2017). High versus low energy administration in the early phase of acute pancreatitis (GOULASH trial): protocol of a multicentre

randomised double-blind clinical trial. *BMJ Open*, 7(9).
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-015874>

119. Maruyama, Y., Inooka, G., Li, Y. X., Miyashita, Y., & Kasai, H. (1993). Agonist-induced localized Ca^{2+} spikes directly triggering exocytotic secretion in exocrine pancreas. *The EMBO Journal*, 12.
120. Matthews, D. E. (2020). Review of lysine metabolism with a focus on humans. *The Journal of Nutrition*, 150, 2548S-2555S. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa224>
121. Mauhin, W., Habarou, F., Gobin, S., Servais, A., Brassier, A., Grisel, C., Roda, C., Pinto, G., Moshous, D., Ghalim, F., Krug, P., Deltour, N., Pontoizeau, C., Dubois, S., Assoun, M., Galmiche, L., Bonnefont, J.-P., Ottolenghi, C., de Blic, J., Arnoux, J.-B., & de Lonlay, P. (2017). Update on lysinuric protein intolerance, a multi-faceted disease retrospective cohort analysis from birth to adulthood. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12, 3. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0550-8>
122. McCommis, K. S., Chen, Z., Fu, X., McDonald, W. G., Colca, J. R., Kletzien, R. F., Burgess, S. C., & Finck, B. N. (2015). Loss of mitochondrial pyruvate carrier 2 in the liver leads to defects in gluconeogenesis and compensation via pyruvate-alanine cycling. *Cell Metabolism*, 22(4), 682–694. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.028>
123. McCommis, K. S., Hodges, W. T., Brunt, E. M., Nalbantoglu, I., McDonald, W. G., Holley, C., Fujiwara, H., Schaffer, J. E., Colca, J. R., & Finck, B. N. (2017). Targeting the mitochondrial pyruvate carrier attenuates fibrosis in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 65(5). <https://doi.org/10.1002/hep.29025>
124. Meijer, A. J. (2003). Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *The Journal of Nutrition*, 133(6), 2057S-2062S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.6.2057S>
125. Saka, M., Tüzün, A., Ateş, Y., Bağcı, S., Karaeren N., & Dağalp K. (2004). Acute pancreatitis possibly due to arginine use: a case report. *Turk J Gastroenterol*, 15(1), 56–58.
126. Mikó, A., Erőss, B., Sarlós, P., Hegyi Jr, P., Márta, K., Pécsi, D., Vincze, Á., Bódis, B., Nemes, O., Faluhelyi, N., Farkas, O., Papp, R., Kelemen, D., Szentesi, A., Hegyi,

- E., Papp, M., Czakó, L., Izbéki, F., Gajdán, L., Novák, J., Sahin-Tóth, M., Lerch, M. M., Neoptolemos, J., Petersen, O. H., & Hegyi, P. (2019). Observational longitudinal multicentre investigation of acute pancreatitis (GOULASH PLUS): follow-up of the GOULASH study, protocol. *BMJ Open*, *9*(8). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-025500>
127. Milman, H. A., Cooney, D. A., & Young, D. M. (1979). Role of pancreatic L-asparagine synthetase in homeostasis of L-asparagine. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *236*(6), E746. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1979.236.6.E746>
128. Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology*, *62*(2). [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(76\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(76)90124-7)
129. Mizunuma, T., Kawamura, S., & Kishino, Y. (1984). Effects of injecting excess arginine on rat pancreas. *The Journal of Nutrition*, *114*(3). <https://doi.org/10.1093/jn/114.3.467>
130. Morris, S. M. (2006). Arginine: beyond protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(2), 508S-512S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.508S>
131. Mukherjee, A., Ahmed, N., Rose, F. T., Ahmad, A. N., Javed, T. A., Wen, L., Bottino, R., Xiao, X., Kilberg, M. S., & Husain, S. Z. (2020). Asparagine synthetase is highly expressed at baseline in the pancreas through heightened PERK signaling. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *9*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.08.003>
132. Mukherjee, R., Mareninova, O. A., Odinkova, I. V., Huang, W., Murphy, J., Chvanov, M., Javed, M. A., Wen, L., Booth, D. M., Cane, M. C., Awais, M., Gavillet, B., Pruss, R. M., Schaller, S., Molkenstin, J. D., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., Pandol, S. J., Gukovsky, I., Criddle, D. N., Gukovskaya, A. S., & Sutton, R. (2016). Mechanism of mitochondrial permeability transition pore induction and damage in the pancreas: inhibition prevents acute pancreatitis by protecting production of ATP. *Gut*, *65*(8). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308553>

133. Newsholme, P. (2001). Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *The Journal of Nutrition*, *131*(9), 2515S-2522S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2515S>
134. Nijtmans, L. G. J., Klement, P., Houštěk, J., & van den Bogert, C. (1995). Assembly of mitochondrial ATP synthase in cultured human cells: implications for mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1272*(3). [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00087-9](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00087-9)
135. Niknahad, H., Jamshidzadeh, A., Heidari, R., Zarei, M., & Ommati, M. M. (2017). Ammonia-induced mitochondrial dysfunction and energy metabolism disturbances in isolated brain and liver mitochondria, and the effect of taurine administration: relevance to hepatic encephalopathy treatment. *Clinical and Experimental Hepatology*, *3*. <https://doi.org/10.5114/ceh.2017.68833>
136. Odinkova, I. V., Sung, K.-F., Mareninova, O. A., Hermann, K., Evtodienko, Y., Andreyev, A., Gukovsky, I., & Gukovskaya, A. S. (2009). Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria. *Gut*, *58*(3). <https://doi.org/10.1136/gut.2007.147207>
137. Okun, J. G., Rusu, P. M., Chan, A. Y., Wu, Y., Yap, Y. W., Sharkie, T., Schumacher, J., Schmidt, K. v., Roberts-Thomson, K. M., Russell, R. D., Zota, A., Hille, S., Jungmann, A., Maggi, L., Lee, Y., Blüher, M., Herzig, S., Keske, M. A., Heikenwalder, M., Müller, O. J., & Rose, A. J. (2021). Liver alanine catabolism promotes skeletal muscle atrophy and hyperglycaemia in type 2 diabetes. *Nature Metabolism*, *3*(3). <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00369-9>
138. Olek, R., Kujach, S., Wnuk, D., & Laskowski, R. (2014). Single sodium pyruvate ingestion modifies blood acid-base status and post-exercise lactate concentration in humans. *Nutrients*, *6*(5). <https://doi.org/10.3390/nu6051981>
139. Oparaji, J.-A., Rose, F., Okafor, D., Howard, A., Turner, R. L., Orabi, A. I., Byersdorfer, C., Mi, Q., Ritchey, K., Lowe, M. E., & Husain, S. Z. (2017). Risk factors for asparaginase-associated pancreatitis. *Journal of Clinical*

140. Otto-Ślusarczyk, D., Graboń, W., & Mielczarek-Puta, M. (2016). Aminotransferaza asparaginianowa – kluczowy enzym w metabolizmie ogólnoustrojowym człowieka. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 70, 219–230. <https://doi.org/10.5604/17322693.1197373>
141. Owen, O. E., Kalhan, S. C., & Hanson, R. W. (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34). <https://doi.org/10.1074/jbc.R200006200>
142. Ozturk, S. S., & Palsson, B. O. (1990). Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. *Biotechnology Progress*, 6(2), 121–128. <https://doi.org/10.1021/bp00002a005>
143. Pandol, S. J., Saluja, A. K., Imrie, C. W., & Banks, P. A. (2007). Acute pancreatitis: bench to the bedside. *Gastroenterology*, 132(3), 1127–1151. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.055>
144. Parto, K., Kallajoki, M., Aho, H., & Simell, O. (1994). Pulmonary alveolar proteinosis and glomerulonephritis in lysinuric protein intolerance: Case reports and autopsy findings of four pediatric patients. *Human Pathology*, 25, 400–407. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(94\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0046-8177(94)90150-3)
145. Peikin, S. R., Rottman, A. J., Batzri, S., & Gardner, J. D. (1978). Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 235(6). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1978.235.6.E743>
146. Pena, L., & Burton, B. K. (2012). Survey of health status and complications among propionic acidemia patients. *The American Journal of Medical Genetics - Part A*, 158A, 1641–1646. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35387>
147. Peng, S., Gerasimenko, J. V., Tsugorka, T. M., Gryshchenko, O., Samarasinghe, S., Petersen, O. H., & Gerasimenko, O. V. (2018). Galactose protects against cell

- damage in mouse models of acute pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 128(9). <https://doi.org/10.1172/JCI94714>
148. Perides, G., Laukkarinen, J. M., Vassileva, G., & Steer, M. L. (2010). Biliary acute pancreatitis in mice is mediated by the G-protein-coupled cell surface bile acid receptor Gpbar1. *Gastroenterology*, 138(2). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.052>
149. Petersen, O. H, & Findlay, I. (1987). Electrophysiology of the pancreas. *Physiological Reviews*, 67(3). <https://doi.org/10.1152/physrev.1987.67.3.1054>
150. Petersen, O. H. (2012). Specific mitochondrial functions in separate sub-cellular domains of pancreatic acinar cells. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 464(1), 77–87. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1099-6>
151. Petersen, O. H., & Tepikin, A. v. (2008). Polarized calcium signaling in exocrine gland cells. *Annual Review of Physiology*, 70(1), 273–299. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100618>
152. Rajinder D., & Ashok K. S. (2012). L-arginine-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*.
153. Rakonczay, Z., Hegyi, P., Dósa, S., Iványi, B., Jármai, K., Biczó, G., Hracskó, Z., Varga, I. S., Karg, E., Kaszaki, J., Varró, A., Lonovics, J., Boros, I., Gukovsky, I., Gukovskaya, A. S., Pandol, S. J., & Takács, T. (2008). A new severe acute necrotizing pancreatitis model induced by L-ornithine in rats. *Critical Care Medicine*, 36(7). <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31817d7f5c>
154. Rasmussen, H. H. (2013). Nutrition in chronic pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 19(42), 7267. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7267>
155. Reitzer, L. (2004). Biosynthesis of glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. *EcoSal Plus*, 1(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.1.3>
156. Reynolds, E. S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17(1). <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>

157. Rinderknecht, H. (1986). Activation of pancreatic zymogens. *Digestive Diseases and Sciences*, 31(3). <https://doi.org/10.1007/BF01318124>
158. Rinderknecht H. (1993). Pancreatic secretory enzymes. *The Pancreas. Biology, Pathobiology, and Disease, 2nd Edn. Raven, New York*, 219–251.
159. Rooman, I., Lutz, C., Pinho, A. v., Huggel, K., Reding, T., Lahoutte, T., Verrey, F., Graf, R., & Camargo, S. M. R. (2013). Amino acid transporters expression in acinar cells is changed during acute pancreatitis. *Pancreatology*, 13(5), 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2013.06.006>
160. Rosenzweig, S. A., Miller, L. J., & Jamieson, J. D. (1983). Identification and localization of cholecystokinin-binding sites on rat pancreatic plasma membranes and acinar cells: a biochemical and autoradiographic study. *Journal of Cell Biology*, 96(5), 1288–1297. <https://doi.org/10.1083/jcb.96.5.1288>
161. Roth, E., Zöch, G., Schulz, F., Karner, J., Mühlbacher, F., Hamilton, G., Mauritz, W., Sporn, P., & Funovics, J. (1985). Amino acid concentrations in plasma and skeletal muscle of patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis. *Clinical Chemistry*, 31(8). <https://doi.org/10.1093/clinchem/31.8.1305>
162. Sandstrom, P., Trulsson, L., Gasslander, T., Sundqvist, T., von Döbeln, U., & Svanvik, J. (2008). Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis. *Amino Acids*, 35(1). <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0557-5>
163. Schagger, H. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8). <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>
164. Schrader, H., Menge, B. A., Belyaev, O., Uhl, W., Schmidt, W. E., & Meier, J. J. (2009). Amino acid malnutrition in patients with chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 38(4). <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318194fc7a>
165. Serrao, E. M., Kettunen, M. I., Rodrigues, T. B., Lewis, D. Y., Gallagher, F. A., Hu, D. E., & Brindle, K. M. (2018). Analysis of ¹³C and ¹⁴C labeling in pyruvate and lactate in tumor and blood of lymphoma-bearing mice injected with ¹³C- and ¹⁴C-labeled pyruvate. *NMR in Biomedicine*, 31(5). <https://doi.org/10.1002/nbm.3901>

166. Shah, A. M., Wang, Z., & Ma, J. (2020). Glutamine metabolism and its role in immunity, a comprehensive review. *Animals*, *10*(2), 326. <https://doi.org/10.3390/ani10020326>
167. Shalbueva, N., Mareninova, O. A., Gerloff, A., Yuan, J., Waldron, R. T., Pandol, S. J., & Gukovskaya, A. S. (2013). Effects of oxidative alcohol metabolism on the mitochondrial permeability transition pore and necrosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *Gastroenterology*, *144*(2), 437-446.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.037>
168. Sharma, P., & Mongan, P. D. (2010). Hypertonic sodium pyruvate solution is more effective than Ringer's ethyl pyruvate in the treatment of hemorrhagic shock. *Shock*, *33*(5). <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181cc02b3>
169. Shore, E. R., Awais, M., Kershaw, N. M., Gibson, R. R., Pandalaneni, S., Latawiec, D., Wen, L., Javed, M. A., Criddle, D. N., Berry, N., O'Neill, P. M., Lian, L.-Y., & Sutton, R. (2016). Small molecule inhibitors of cyclophilin D to protect mitochondrial function as a potential treatment for acute pancreatitis. *Journal of Medicinal Chemistry*, *59*(6). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01801>
170. 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. [Abstract]. 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.
171. Sims, C. A., Wattanasirichaigoon, S., Menconi, M. J., Ajami, A. M., & Fink, M. P. (2001). Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Critical Care Medicine*, *29*(8). <https://doi.org/10.1097/00003246-200108000-00003>
172. Singh, J., & Petersen, O. H. (1984). The effects of L-alanine and acetylcholine on membrane potential, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and $^{86}\text{Rb}^{+}$ efflux and amylase secretion in the isolated

- mouse pancreas. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 69(3). <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1984.sp002839>
173. Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M., & Rao, Z. (2005). Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121(7). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025>
174. Tani, S., Itoh, H., Okabayashi, Y., Nakamura, T., Fujii, M., Fujisawa, T., Koide, M., & Otsuki, M. (1990). New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 35(3). <https://doi.org/10.1007/BF01537416>
175. Tapper, E. B., Jiang, Z. G., & Patwardhan, V. R. (2015). Refining the ammonia hypothesis. *Mayo Clinic Proceedings*, 90(5). <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.03.003>
176. Tashiro, M., Schäfer, C., Yao, H., Ernst, S. A., & Williams, J. A. (2001). Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut*, 49(2). <https://doi.org/10.1136/gut.49.2.241>
177. Tomé, D., & Bos, C. (2007). Lysine requirement through the human life cycle. *The Journal of Nutrition*, 137(6). <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1642S>
178. Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y., & Earnshaw, W. C. (2007). Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Experimental Cell Research*, 313(16), 3635–3644. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.06.018>
179. Tóth, E., Maléth, J., Závogyán, N., Fanczal, J., Grassalkovich, A., Erdős, R., Pallagi, P., Horváth, G., Tretter, L., Bálint, E. R., Rakonczay, Z., Venglovecz, V., & Hegyi, P. (2019). Novel mitochondrial transition pore inhibitor *N*-methyl-4-isoleucine cyclosporin is a new therapeutic option in acute pancreatitis. *The Journal of Physiology*, 597(24), 5879–5898. <https://doi.org/10.1113/JP278517>

180. Trulsson, L., Sandström, P., Sundqvist, T., Smeds, S., Gasslander, T., & Svanvik, J. (2004). The influence of a load of L-arginine on serum amino acids and pancreatic apoptosis/proliferation and ATP levels in the rat. *Pancreas*, 29(4). <https://doi.org/10.1097/00006676-200411000-00165>
181. Tsai, C.-Y., Kilberg, M. S., & Husain, S. Z. (2020). The role of asparagine synthetase on nutrient metabolism in pancreatic disease. *Pancreatology*, 20(6), 1029–1034. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2020.08.002>
182. Tsujimoto, T., Shimizu, K., Hata, N., Takagi, T., Uejima, E., Ogura, H., Wasa, W., & Shimazu, T. (2017). Both high and low plasma glutamine levels predict mortality in critically ill patients. *Surgery Today*, 47(11), 1331–1338. <https://doi.org/10.1007/s00595-017-1511-0>
183. van Goudoever, J. B., Stoll, B., Henry, J. F., Burrin, D. G., & Reeds, P. J. (2000). Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.200371497>
184. Vanasco, V., Ropolo, A., Grasso, D., Ojeda, D. S., García, M. N., Vico, T. A., Orquera, T., Quarleri, J., Alvarez, S., & Vaccaro, M. I. (2021). Mitochondrial dynamics and VMP1-related selective mitophagy in experimental acute pancreatitis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.640094>
185. Virolle, M.-J., Morris, V. J., & Bibb, M. J. (1990). 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*, 5(5). <https://doi.org/10.1007/BF01578204>
186. von Blankenfeld, G., & Jauch, P. (1989). Amino acid specificity of the Na⁺/alanine cotransporter in pancreatic acinar cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 980(3). [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90330-1](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90330-1)
187. Voronina, S. G., Barrow, S. L., Gerasimenko, O. V., Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2004). Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane

- potential of pancreatic acinar cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27327–27338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311698200>
188. Voronina, S. G., Barrow, S. L., Simpson, A. W. M., Gerasimenko, O. V., da Silva Xavier, G., Rutter, G. A., Petersen, O. H., & Tepikin, A. V. (2010). Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology*, 138(5), 1976-1987.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.037>
189. Voronina, S., Sukhomlin, T., Johnson, P. R., Erdemli, G., Petersen, O. H., & Tepikin, A. (2002). Correlation of NADH and Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells. *The Journal of Physiology*, 539(1). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013134>
190. Wachstein, M., & Meisel, E. (1953). Equal effectiveness of L and D-ethionine in producing tissue damage in rats and mice. *Experimental Biology and Medicine*, 82(1). <https://doi.org/10.3181/00379727-82-20027>
191. Wang, B., Zhao, J., Guo, Z., Ma, J., Xu, H., & Jia, Z. (2015). Differential contributions of ammonia oxidizers and nitrite oxidizers to nitrification in four paddy soils. *The ISME Journal*, 9(5). <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.194>
192. Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., & Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. *Amino Acids*, 45(3). <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1493-1>
193. Watt, I. N., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Leslie, A. G. W., & Walker, J. E. (2010). Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1011099107>
194. Wen, L., Voronina, S., Javed, M. A., Awais, M., Szatmary, P., Latawiec, D., Chvanov, M., Collier, D., Huang, W., Barrett, J., Begg, M., Stauderman, K., Roos, J., Grigoryev, S., Ramos, S., Rogers, E., Whitten, J., Velicelebi, G., Dunn, M., Tepikin, A. v., Criddle, D. N., & Sutton, R. (2015). Inhibitors of ORAI1 prevent cytosolic calcium-associated injury of human pancreatic acinar cells and acute pancreatitis in 3 mouse models. *Gastroenterology*, 149(2). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.04.015>

195. Wikstrom, M. K. F. (1977). Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature*, 266(5599). <https://doi.org/10.1038/266271a0>
196. Williams, J. A., Korc, M., & Dormer, R. L. (1978). Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 235(5), E517-524. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1978.235.5.E517>
197. Wu, G., & Morris, S. M. (1998). Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336(1), 1–17. <https://doi.org/10.1042/bj3360001>
198. Wu, P., Li, L., & Sun, W. (2018). Efficacy comparisons of enteral nutrition and parenteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis: a meta-analysis from randomized controlled trials. *Bioscience Reports*, 38(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20181515>
199. Xu, X. F., Lou, W. H., Wang, D. S., Jin, D. Y., Ni, X. L., & Wu, Z. H. (2006). Influence of glutamine on pancreatic blood flow and apoptosis of pancreatic acinar in rats with severe acute pancreatitis. *Chinese Journal of Digestive Diseases*, 7(2), 121–126. <https://doi.org/10.1111/j.1443-9573.2006.00250.x>
200. Xue, P., Deng, L.-H., Xia, Q., Zhang, Z.-D., Hu, W.-M., Yang, X.-N., Song, B., & Huang, Z.-W. (2008). Impact of alanyl-glutamine dipeptide on severe acute pancreatitis in early stage. *World Journal of Gastroenterology*, 14(3). <https://doi.org/10.3748/wjg.14.474>
201. Yang, A. L. (2021). Nutrition and acute pancreatitis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(4), 836. <https://doi.org/10.3390/jcm10040836>
202. Yankovskaya, V. (2003). Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299(5607). <https://doi.org/10.1126/science.1079605>
203. Yelamanchi, S. D., Jayaram, S., Thomas, J. K., Gundimeda, S., Khan, A. A., Singhal, A., Keshava Prasad, T. S., Pandey, A., Somani, B. L., & Gowda, H. (2016). A pathway map of glutamate metabolism. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10(1), 69–75. <https://doi.org/10.1007/s12079-015-0315-5>

204. Yin, J., Ren, W., Yang, G., Duan, J., Huang, X., Fang, R., Li, C., Li, T., Yin, Y., Hou, Y., Kim, S. W., & Wu, G. (2016). L-cysteine metabolism and its nutritional implications. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500031>
205. Zhang, X., Jin, T., Shi, N., Yao, L., Yang, X., Han, C., Wen, L., Du, D., Szatmary, P., Mukherjee, R., Liu, T., Xia, Q., Criddle, D. N., Huang, W., Chvanov, M., & Sutton, R. (2019). Mechanisms of pancreatic injury induced by basic amino acids differ between L-arginine, L-ornithine, and L-histidine. *Frontiers in Physiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01922>
206. Zheng, Y.-M. (2006). Glutamine dipeptide for parenteral nutrition in abdominal surgery: A meta-analysis of randomized controlled trials. *World Journal of Gastroenterology*, *12*(46). <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i46.7537>
207. Ziolkowski, W., Wierzba, T. H., Kaczor, J. J., Olek, R. A., Wozniak, M., Kmiec, Z., Mysliwski, A., & Antosiewicz, J. (2008). Intravenous sodium pyruvate protects against cerulein-induced acute pancreatitis. *Pancreas*, *37*(2). <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31816726e7>
208. 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>
209. 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>
210. Zub, A., Manko, B.O., & Manko, V.V. (2022). Viability of pancreatic acinar cells under the influence of amino acids in high concentration. [Abstract]. 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.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ 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> (Здобувач самостійно виконала всю експериментальну частину досліджень, статистично опрацювала отримані дані, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).
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> (Scopus, Q2). (Здобувач виконала частину експериментальних досліджень, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).
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> (Scopus, Q2). (Здобувач виконала експериментальну частину досліджень, взяла активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).

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 NH_4Cl 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.**, Ostapiv, 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.

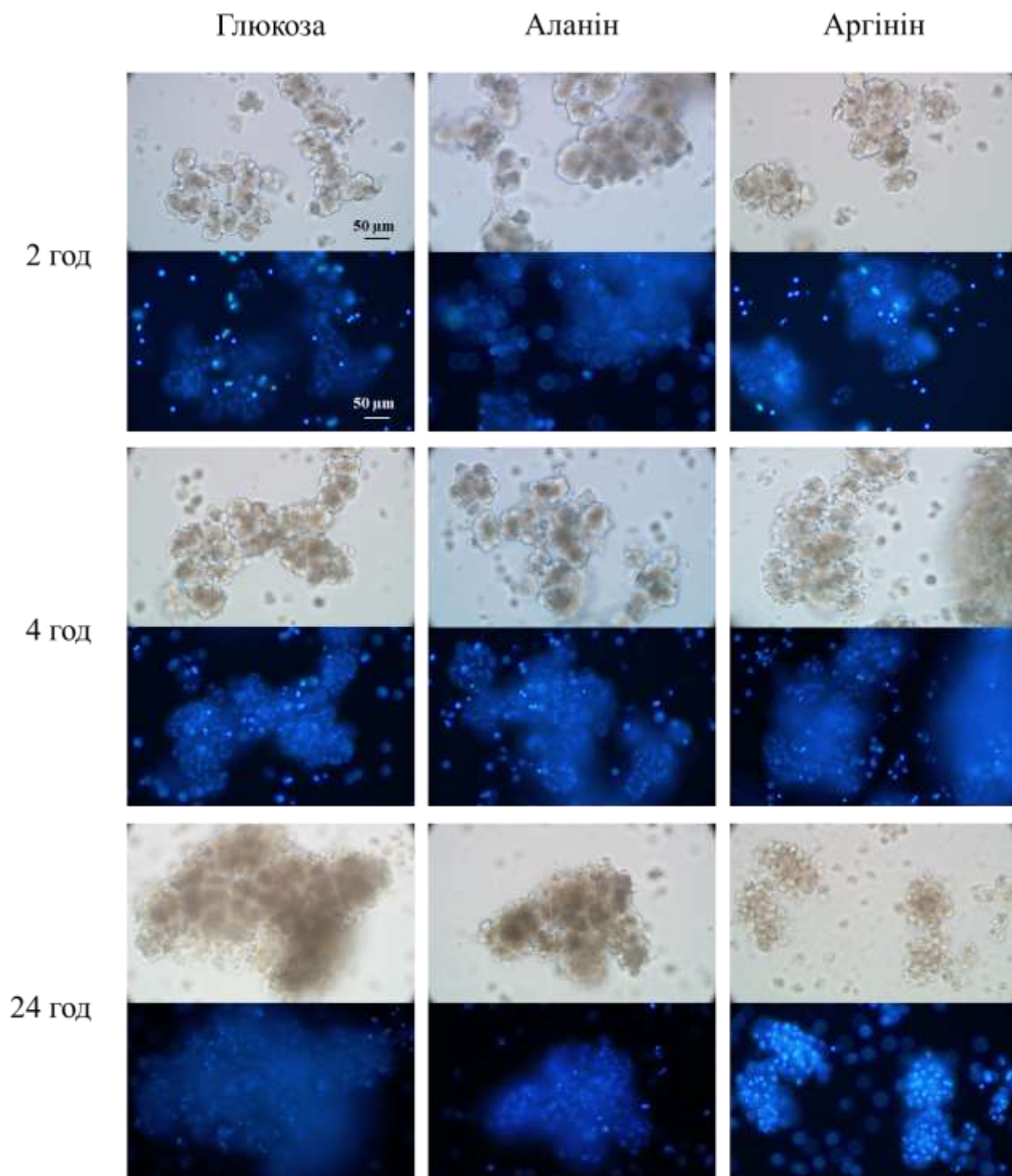
Відомості про апробацію результатів дисертації:

1. Звітна наукова конференція біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка, Львів, лютий 2018, 2019, 2020, 2021 р. (очна форма участі, усна доповідь).
2. XV, XVI та XVIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 2019, 2020, 2022 р. (очна форма участі, усна доповідь).
3. XX з’їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, 27-30 травня Київ, 2019 р. (очна форма участі, усна доповідь).
4. VIII з’їзд Українського біофізичного товариства, Київ, 12-15 листопада 2019 р. (очна форма участі, усна доповідь).
5. II Міжнародна міждисциплінарна дослідницька конференції “Young Science Beyond Borders”, Польща, 1-2 червня 2023 р. (заочна форма участі, усна доповідь).

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

ДОДАТОК Б

Життєздатність панкреатичних ацинусів за впливу амінокислот у концентрації 20 ммоль/л за інкубації у середовищі DMEM впродовж 2, 4 та 24 год; верхні фотографії – світлова мікроскопія, нижні – флуоресцентна мікроскопія з фарбуванням етидій бромідом і Hoechst 33342; шкала = 50 мкм.

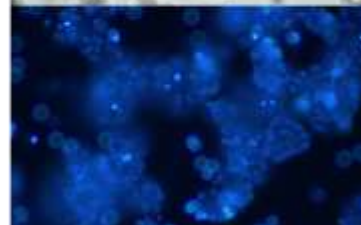
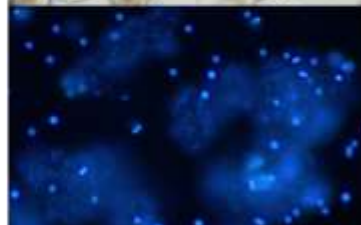
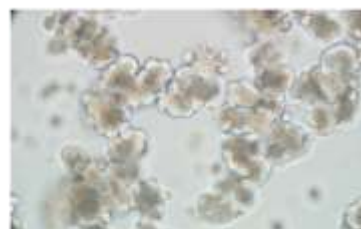


Лізин

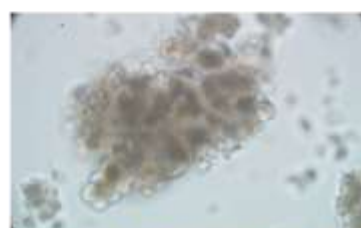
Аспаргат

Глутамат

2 год



4 год



24 год

