

АНОТАЦІЯ

Манько Б.В. Особливості енергетичного забезпечення екзокринних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

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

Підшлункова залоза відіграє надзвичайно важливу роль у травленні та обміні речовин. Її ацинарні клітини забезпечують функції синтезу, накопичення та секреції травних ензимів. Проходження цих процесів є неможливим без значних запасів енергії у вигляді АТФ, поновлення яких у значній мірі відбувається завдяки функціонуванню мітохондрій.

Зміни фізіологічних станів як організму в цілому, так і окремих органів, впливають на здатність мітохондрій підтримувати енергетичний баланс у клітинах. Зокрема, на ацинарні клітини підшлункової залози впливають жирні та жовчні кислоти, активні форми кисню та продукти неокисного метаболізму алкоголю тощо. Одним з чинників, який змінює метаболічні процеси організму в цілому, є ожиріння, за якого зростає ризик не тільки серцево-судинних захворювань чи діабету, а й неалкогольної хвороби підшлункової залози, жовчнокам'яної хвороби та гострого панкреатиту. Основною причиною розвитку ожиріння вважають порушення балансу між кількістю енергії, що надходить в організм, та витрачається ним. Проте дані про порушення енергетичного обміну в ацинарних клітинах підшлункової залози за висококалорійних дієт є нечисельними, хоч сама проблема є надзвичайно актуальною.

Цінним методом біоенергетичних досліджень змін в метаболізмі ацинарних клітин підшлункової залози є реєстрації швидкості клітинного дихання. Цей перевірений часом метод дає змогу зареєструвати навіть найменші зміни у процесах дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях. Проте аналіз записаних сигналів є досить часозатратним, складним і суб'єктивним

процесом. Наприклад, найчастіше використовувана візуальна оцінка полярограми є хоч простим та інтуїтивно зрозумілим інструментом для досвідченого науковця, та все ж таки суб'єктивним, ненадійним і погано відтворюваним, якщо використовується без експертного розуміння методу. Створення нових, сучасних методів автоматизації обрахунків дає змогу не тільки зекономити час, а й мінімізувати вплив численних чинників на якість отриманого результату.

Встановлення достовірного результату про проходження метаболічних процесів у клітинах також неможливе без оцінки життєдіяльності цих клітин. Актуальним є перевірка існуючих методів за нормальних та патологічних станів, зокрема таких, як дія жовчних кислот на ацинарні клітини підшлункової залози.

Зважаючи на вищевказані аргументи, дослідження енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів, з використанням нових додаткових методів в оцінці життєдіяльності та опрацюванні отриманих сигналів, дають змогу покращити розуміння таких процесів, перевірити наявні моделі, а також розробити практичні рішення для подальших досліджень.

Метою роботи було дослідити особливості енергетичного забезпечення ацинарних клітин за зміни дієти та інших функціональних станів.

У дисертаційній роботі запропоновано програмне рішення у вигляді алгоритму для аналізу записів полярографічних досліджень, а також представлені результати перевірки такого алгоритму. Авторське програмне рішення складається з декількох компонентів, які необхідні для аналізу псевдолінійних кривих, поліноміальних кривих невідомого ступеня з невеликою крутизною, а також складних кривих з двох лінійних ділянок, які з'єднані між собою поліномом третього порядку. У межах таких випадків полярографічних записів сформовано три завдання: пошук ділянки з максимальною швидкістю, пошук ділянки з мінімальною швидкістю та пошук найбільш лінійного фрагменту з наступним обчисленням швидкості.

На початкових етапах алгоритму реалізована ще одна важлива функція – очищення записаної полярограми від артефактів та шумів різної природи. Завдяки використанню високочутливих приладів для реєстрації сигналу, не тільки покращився кількісний і якісний збір даних, але і збільшилась кількість проблемних ділянок із спотвореним сигналом внаслідок дії різноманітних чинників. Такі ділянки бувають у вигляді артефактів – рідкісних суттєвих змін з великою амплітудою, осциляційних шумів – ритмічних змін сигналу, не пов'язаних із досліджуваним явищем, а також звичайних шумів – частих несуттєвих змін із невеликою амплітудою. Різні види спотворення сигналу, а також їх комбінації можуть суттєво впливати на проведення аналізу запису. А тому їх видалення є необхідним кроком для подальшого визначення швидкості зміни показника відповідно до завдання.

Перевірка роботи алгоритму була здійснена як на штучно генерованих даних з відомою швидкістю та доданими спотвореннями, так і на реальних записах полярографічних досліджень дихання ізольованих мітохондрій печінки та ацинарних клітин підшлункової залози. Дві наявні варіації виконання обчислення швидкості дихання – алгоритм поліноміальної регресії та човниковий алгоритм – показали задовільні результати у всіх трьох завданнях під час перевірки на штучно генерованих даних. Аналогічний результат було отримано внаслідок порівняння даних, які розраховані із використанням алгоритмів, із медіаною оцінок, зроблених чотирма експертами. Окрема варто зазначити про наявність помітної різниці у розрахунках експертів, що тільки підтверджує наявність суб'єктивного впливу експериментатора на аналіз полярографічних записів.

Дослідження залежності роз'єданого дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози від життєдіяльності клітин показали, що доцільно використовувати в експериментах лише препарати ацинусів підшлункової залози з високою життєздатністю (> 95 % трипаннегативні), щоб уникнути ефекту негативного метаболічного зсуву, пов'язаного з препаратами нижчої якості. Менш інформативною і недостатньо чутливою є звичайна оцінка

оптимальної концентрації протонофора (ще один параметр, який часто використовується у дослідженнях), коли сусідні значення швидкості дихання дуже близькі один до одного. Додатково, дискретний характер цього параметра робить статистичний аналіз досить проблематичним.

Тому був запропонований новий параметр – стабільність роз'єданого дихання. Він визначається як співвідношення швидкості дихання за високих і низьких концентрацій FCCP. Ми встановили, що стабільність роз'єданого дихання, тобто здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість дихання зі збільшенням концентрації протонофора, є тим вищою, чим більша життєздатність клітин ізольованих ацинусів підшлункової залози. Пропонуємо використовувати стабільність роз'єданого дихання як новий метаболічний функціональний тест для доповнення існуючих методів оцінки життєздатності клітин.

Однією з найпоширеніших форм гострого панкреатиту є біліарний панкреатит. За цих умов жовчні кислоти потрапляють у протоки підшлункової залози і взаємодіють з ацинарними клітинами. Показано, що наявність у середовищі жовчної кислоти TLC-S (tauro lithocholic acid 3-sulfate, сульфат тауролітохолевої кислоти) у концентрації 0,5 ммоль/л за використання як субстрату окиснення глюкози, пірувату чи аланіну суттєво не впливає на частку живих клітин після двох і чотирьох годин інкубації. Коли ж до середовища додавали TLC-S у концентрації 2 ммоль/л, частка живих клітин значно зменшувалася. Це зменшення залежало від наявного у середовищі субстрату окиснення і було найменш вираженим за окиснення пірувату.

Залежність впливу TLC-S на мембранний потенціал мітохондрій від субстрату окиснення дає підстави говорити про складніші механізми, аніж механістичне руйнування біологічних мембран.

Також було зареєстровано зниження мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози після преінкубації з жовчною кислотою TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л, яке залежало від субстрату окиснення. Зокрема, за наявності глюкози мембранний потенціал мітохондрій зменшився на

9,8 % ($P < 0,05$, $n=3$), а у присутності аланіну (на тлі глюкози) – на 23,5 % ($P < 0,05$, $n=4$). Коли ж до середовища додавали піруват (на тлі глюкози), мембранний потенціал мітохондрій під впливом TLC-S вірогідно не змінювався. Очевидно, зареєстроване зменшення мембранного потенціалу може бути спричинене одним або комбінацією кількох процесів:

- 1) інгібуванням аланінамінотрансферази;
- 2) зменшенням рівня α -кетоглутарату;
- 3) порушенням окиснення глутамату, що утворюється у реакції трансамінування аланіну.

Інші ймовірні механізми зменшення мембранного потенціалу мітохондрій за дії TLC-S у низьких концентраціях є малоімовірними, оскільки зареєстровані зміни мали би бути однаковими за використання різних субстратів окиснення.

Встановлено, що короткочасна високожирова та/або високовуглеводна дієта тривалістю 7 тижнів не впливає на масу тіла чи масу печінки тварин відносно контролю. Статистично достовірне збільшення маси вісцерального жиру зареєстровано у групі тварин, що перебували на дієті із збільшеною часткою жирів та вуглеводів.

Концентрації холестеролу ліпопротеїнів високої і низької щільності, тригліцеридів і глюкози плазми крові дослідних тварин також не відрізнялись відносно контролю на час завершення дієти. Проте концентрація загального холестеролу була більшою в обох дослідних групах.

У дослідних тварин не зареєстровано змін (відносно контрольної групи) швидкості дихання ізольованих мітохондрій печінки за окиснення сукцинату, суміші глутамату з малатом та 3-гідроксибутиту. Розраховані індекси дихального контролю ізольованих мітохондрій печінки були в діапазоні 3,9–5,6, що свідчить про високу спряженість процесів дихання і окисного фосфорилування та високу якість мітохондріальних препаратів усіх груп тварин. Одночасно, якоїсь залежності дихальних контролів від дієт, на якій перебували тварини, встановити не вдалося.

У дослідженнях на ізольованих ацинусах підшлункової залози щурів

встановлено зменшення швидкості базального дихання у тварин на високожировій дієті. Максимальна швидкість роз'єданого дихання збільшилася за окиснення 3-гідроксибутирату відносно швидкості дихання за окиснення глюкози – незалежно від дослідної групи. Це може свідчити про утилізацію кетонових тіл мітохондріями ацинусів підшлункової залози.

Встановлено, що мембранний потенціал мітохондрій та автофлуоресценція НАД(Ф)Н ацинарних клітин підшлункової залози не залежали від досліджених дієт тварин. Автофлуоресценція НАД(Ф)Н ацинарних клітин зростала за окиснення 3-гідроксибутирату, але не залежала за окиснення усіх досліджуваних субстратів від дієти тварин.

Отже, можна зробити висновок, що досліджувані дієти практично не впливають на мітохондріальні функції підшлункової залози. Невелике зниження базального дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози за високожировою дієту не супроводжувалося змінами інших процесів у мітохондріях.

Ключові слова: підшлункова залоза, ацинарні клітини, дієта, ожиріння, вісцеральний жир, життєздатність, мітохондрії, мітохондріальне дихання, мембранний потенціал мітохондрій, жовчна кислота TLC-S (сульфат тауролітохолової кислоти), FCCP, субстрати окиснення, печінка, кров, алгоритм

SUMMARY

Manko B.V. Peculiarities of pancreatic exocrine cells energy supply upon various functional states. – 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 pancreas plays an extremely important role in digestion and metabolism. Its acinar cells perform the functions of synthesizing, storing, and secreting digestive enzymes. The progression of these processes is impossible without significant energy reserves in the form of ATP, the restoration of which largely occurs through the functioning of mitochondria.

Changes in physiological states, both in the organism as a whole and in individual organs, affect the ability of mitochondria to maintain energy balance in cells. Specifically, acinar cells of the pancreas are influenced by fatty acids, bile acids, reactive oxygen species, and products of non-oxidative alcohol metabolism. One factor that alters the metabolic processes of the entire organism is obesity, which increases the risk not only of cardiovascular diseases and diabetes but also of non-alcoholic pancreatic disease, gallstone, and acute pancreatitis. Obesity is primarily attributed to an imbalance between the energy intake into the body and its expenditure. However, data on disruptions in the energy metabolism of acinar cells of the pancreas under a high-calorie diet are scarce, despite the issue being highly relevant.

A valuable method for bioenergetic research on changes in the metabolism of pancreatic acinar cells is the registration of cellular respiration rate. This well-established method allows for the detection of even the smallest changes in respiration and oxidative phosphorylation processes in mitochondria. However, the analysis of recorded signals is a time-consuming, complex, and subjective process. For instance, the commonly used visual assessment of a polarogram is a simple and intuitive tool for an experienced scientist, yet it remains subjective, unreliable, and poorly reproducible without expert understanding of the method. The development of new, modern

methods for automation of calculations not only saves time but also minimizes the impact of numerous factors on the quality of the obtained result.

Obtaining a credible result regarding the progression of metabolic processes in cells is also impossible without assessing the viability of these cells. It is pertinent to evaluate existing methods under normal and pathological conditions, including the effects of bile acids on pancreatic acinar cells.

Considering the aforementioned arguments, investigating the energy supply of pancreatic acinar cells under different functional states using new additional methods for assessing viability and processing obtained signals allows for an improved understanding of these processes. It helps validate existing models and develop practical solutions for further research.

The aim of the study was to explore the peculiarities of the energy supply of acinar cells under changes in diet and other functional states.

The dissertation proposes a software solution in the form of an algorithm for the analysis of polarographic studies, and the results of testing such an algorithm are presented. The author's software solution consists of several components necessary for the analysis of pseudo-linear curves, polynomial curves of unknown degree with a small slope, and complex curves with two linear segments connected by a third-order polynomial. Within the framework of such cases of polarographic records, three tasks were formulated: finding a section with maximum rate, finding a section with minimum rate, and finding the most linear fragment with subsequent rate calculation.

At the initial stages of the algorithm, another important function is implemented – cleaning the recorded polarogram from artifacts and noises of various nature. The use of highly sensitive instruments for signal registration not only improved the quantitative and qualitative data collection but also increased the number of problematic areas with distorted signals due to various factors. Such areas can be artifacts – rare significant changes with a large amplitude, oscillatory noise – rhythmic signal changes not related to the studied phenomenon, and common noise – frequent insignificant changes with a small amplitude. Different types of signal distortion, as well as their combinations, can significantly affect the analysis of the record.

Therefore, their removal is a necessary step for further determining the rate of the indicator change according to the task.

The algorithm's performance was tested on artificially generated data with a known slopes and added distortions, resembling those obtained from real records of polarographic studies of isolated liver mitochondria respiration or pancreatic acinar cell studies. Two available variations of respiratory rate calculation – polynomial regression algorithm and shuttle algorithm – showed excellent results in all three tasks during testing on artificially generated data. A similar result was obtained by comparing the data calculated using the algorithms with the median of calculations made by four experts. It is worth noting the noticeable difference in the experts' calculations, confirming the subjective human influence on the analysis of polarographic records.

The research on the dependence of uncoupled respiration of isolated pancreatic acini on cell viability showed that it is advisable to use only acinar preparations with high viability (> 95% trypan-negative) in experiments to avoid the negative metabolic shift associated with lower-quality preparations. The conventional assessment of the optimal concentration of protonophore (a parameter commonly used in mitochondrial and whole-cell studies) is challenging when adjacent respiration rate values are very close to each other. In addition, the discrete nature of this parameter makes statistical analysis of its change in various experimental settings quite problematic. Therefore, a new parameter, "uncoupled respiration stability," was proposed. It is defined as the ratio of respiration rates at high and low concentrations of FCCP. It was found that the stability of uncoupled respiration, i.e., the ability of mitochondria to maintain a high respiration rate with an increasing concentration of protonophore, is higher when the viability of isolated pancreatic acini cells is greater. The stability of uncoupled respiration is suggested to be used as a new metabolic functional test to complement existing methods for assessing cell viability.

One of the most common forms of acute pancreatitis is biliary pancreatitis. In these conditions, bile acids enter the pancreatic ducts and interact with acinar cells. It has been shown that the presence of the bile acid tauro lithocholic acid 3-sulfate (TLC-

S) at a concentration of 0.5 mmol/L in the environment, when used as a substrate for the oxidation of glucose, pyruvate, or alanine, significantly does not affect the fraction of live cells after two and four hours of incubation. However, when TLC-S was added to the environment at a concentration of 2 mmol/L, the fraction of live cells decreased significantly. This decrease depended on the available substrate for oxidation and was least pronounced during pyruvate oxidation.

The dependence of the effect of TLC-S on the mitochondrial membrane potential on the substrate of oxidation suggests more complex mechanisms than mere mechanistic disruption of biological membranes.

A decrease in the mitochondrial membrane potential of acinar cells of the pancreas after pre-incubation with the bile acid TLC-S at a concentration of 0.5 mmol/L was also detected, depending on the substrate of oxidation. Specifically, in the presence of glucose, the mitochondrial membrane potential decreased by 9.8% ($P < 0.05$, $n=3$), and in the presence of alanine (on the background of glucose), it decreased by 23.5% ($P < 0.05$, $n=4$). However, when pyruvate was added to the environment (on the background of glucose), the mitochondrial membrane potential under the influence of TLC-S likely did not change. Apparently, the detected decrease in the mitochondrial membrane potential can be caused by one or a combination of several processes:

1. Inhibition of alanine aminotransferase;
2. Decrease in the level of α -ketoglutarate;
3. Disruption of the oxidation of glutamate formed in the alanine transamination reaction.

Other possible mechanisms of decreasing the mitochondrial membrane potential under the action of TLC-S at low concentrations are unlikely, as the registered changes would be the same using different oxidation substrates.

It was established that a short-term high-fat and/or high-carbohydrate diet for a duration of 7 weeks does not affect the body weight or liver mass of the animals compared to the control group. A statistically significant increase in visceral fat mass

was recorded in the group of animals on a diet with an increased proportion of fats and carbohydrates.

The concentrations of high-density and low-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and blood glucose in the plasma of the experimental animals also did not differ from the control at the end of the diet. However, the total cholesterol concentration was slightly higher in both experimental groups.

No changes in the respiration rate of isolated liver mitochondria from the animals on high-fat or high-fat and high-sugar diets (compared to the control group) during the oxidation of succinate, a mixture of glutamate with malate, and 3-hydroxybutyrate were detected. The calculated respiratory control ratios (RCRs) of isolated liver mitochondria ranged from 3.9 to 5.6, indicating a high coupling of respiration and oxidative phosphorylation and high-quality mitochondrial preparations in all groups of animals. At the same time, no dependence of respiratory controls on the diets of the animals were found.

In studies on isolated pancreatic acini of rats, a reduction in the basal respiration rate was observed in animals on a high-fat diet. The maximum rate of uncoupled respiration increased during the oxidation of 3-hydroxybutyrate compared to the respiration rate during glucose oxidation, regardless of the experimental group. This proves the ability of pancreatic acinar cells to oxidize the ketone bodies.

It was found that the membrane potential of mitochondria and autofluorescence of NAD(P)H in pancreatic acinar cells did not depend on the studied diets. The autofluorescence of NAD(P)H in acinar cells increased during the oxidation of 3-hydroxybutyrate irrespectively of the diets. Therefore, it can be concluded that the studied diets largely do not affect the mitochondrial functions of the pancreas. The slight reduction in the basal respiration of isolated pancreatic acini on a high-fat diet was not accompanied by changes in other parameters of mitochondrial oxidation.

Key words: ncreas, acinar cells, diet, obesity, visceral fat, cell viability, mitochondria, mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential, bile acid TLC-S (tauro lithocholic acid sulfate), FCCP, oxidation substrates, liver, blood, algorithm

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. **Manko V.V.**, Kozopas N.M., Mazur H.M., Voityk A.M., Manko B.O., Manko V.V. Bioenergetic functions of mitochondria in liver, pancreatic acinar cells, and sperm cells of rats fed short-term high-fat or high-fat high-sugar diets // Ukr. Biochem. J. – 2023. – Vol. 95, № 5. – P. 51–60. – DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj95.05.051>
2. Zub A., **Manko V.V.**, Manko B.O., Manko V.V., Babsky A. Uncoupled respiration stability of isolated pancreatic acini as a novel functional test for cell vitality // Studia Biologica. – 2023. – Vol. 17, № 3. – P. 243–252. – DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1703.735>
3. **Манько Б.В.** Життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози та рівень мембранного потенціалу мітохондрій за дії жовчевої кислоти TLC-S // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2023. – № 89 (2023). – С. 85–92. – DOI: <http://dx.doi.org/10.30970/vlubs.2023.89>

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Manko V.V.**, Manko B.O., Babsky A. Automatic analysis of biological suspensions oxygen consumptions signals // XIX Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 90-річчю від дня народження академіка НАН України, професора Шеляга-Сосонка Юрія Романовича (Львів, 26–28 квітня 2023 року) : Збірник тез. – Львів, 2023. – P. 188–189.
2. Войтик А.М., Іккерт О.В., **Манько Б.В.** Вплив високого вмісту жирів і вуглеводів у раціоні на окиснення субстратів ЦТК у печінці щурів // XVIII Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», присвячена 195-річчю від дня народження Юліуса Планера (Львів, 6–7 жовтня 2022 р. : Збірник тез. – Львів, 2022. – С. 121–122.

3. **Манько Б.В.**, Сідорова О., Манько Б.О., Манько В.В. Мембранний потенціал мітохондрій як критерій оцінки адаптаційної здатності мітохондрій // XIV Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», (Львів, 10–12 квітня 2018 року) : Збірник тез. – Львів, 2018. – С. 287–288.
4. Манько В.В., Манько Б.О., Сідорова О.О., Мазур Г.М., **Манько Б.В.** Алкоголь за хронічного введення на тлі високо жирної дієти порушує мітохондріальні дихання панкреатитів, але не гепатоцитів // Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології : Тези доповідей VIII Міжнародної наукової конференції, присвяченої 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 17–20 жовтня 2017 р.). – Київ, 2017. – С. 69.