

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАНЬКО БОГДАН ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 612.34:612.26:577.23:57.087

ДИСЕРТАЦІЯ
ОСОБЛИВОСТІ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЕКЗОКРИННИХ
КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЗА РІЗНИХ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ
СТАНІВ

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

_____ Манько Б.В.

Науковий керівник: **Бабський Андрій Мирославович**, доктор біологічних
наук, професор

Львів – 2023

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 вилучення 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 обрахунку 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 (tauroolithocholic 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 високожирової дієти 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 taurolithocholic 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 (taurolithocholic 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 B.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 B.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 B.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.

ЗМІСТ

| | |
|---|-----------|
| ВСТУП..... | 20 |
| Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ..... | 26 |
| 1.1. Фізіологічні особливості енергетичного забезпечення підшлункової залози..... | 26 |
| 1.1.1. Особливості функціонування мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози..... | 26 |
| 1.1.2. Регуляція секреції підшлункової залози..... | 29 |
| 1.1.3. Біоенергетичні процеси ацинарних клітин під дією активних речовин..... | 31 |
| 1.2. Основи дослідження впливу дієт на ацинарні клітини..... | 32 |
| 1.3. Складність цифрового аналізу біологічних сигналів та полярограм..... | 35 |
| Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 39 |
| 2.1. Умови утримання та основні засади поводження із тваринами при проведенні фізіологічних досліджень..... | 39 |
| 2.2. Модель хронічного дослідження..... | 39 |
| 2.3. Реєстрація маси тіла та вісцерального жиру у щурів..... | 41 |
| 2.4. Ізолювання панкреатичних ацинусів..... | 41 |
| 2.5. Виділення мітохондрій печінки..... | 42 |
| 2.6. Біохімічні методи дослідження плазми крові щурів..... | 42 |
| 2.6.1. Визначення концентрації глюкози..... | 43 |
| 2.6.2. Оцінка показників ліпідного обміну..... | 44 |
| 2.7. Полярографічне вимірювання швидкості споживання кисню..... | 48 |
| 2.8. Флуоресцентна мікроскопія..... | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 2.9. Методи розробки алгоритмів..... | 50 |
| 2.10. Статистичний аналіз | 50 |
| Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ | 52 |
| 3.1. Алгоритм обробки полярограм та визначення швидкості зміни показника | 52 |
| 3.1.1. Принцип роботи алгоритму | 55 |
| 3.1.1.1. Серіалізація вхідних даних | 55 |
| 3.1.1.2. Підготовка даних | 56 |
| 3.1.1.3. Очищення записів від шумів | 59 |
| 3.1.1.4. Човниковий алгоритм визначення швидкості дихання | 61 |
| 3.1.1.5. Поліноміальна регресія | 66 |
| 3.1.1.6. Прикінцеві кроки | 68 |
| 3.1.2. Визначення зсуву та дисперсії результатів роботи алгоритму | 69 |
| 3.1.2.1. Результати аналізу штучно згенерованих даних | 69 |
| 3.1.2.2. Тестування алгоритмів на справжніх даних | 73 |
| 3.2. Залежність роз'єданого дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози від життєздатності клітин | 83 |
| 3.3. Життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози та рівень мембранного потенціалу мітохондрій за дії жовчної кислоти TLC-S..... | 91 |
| 3.4. Енергетичне забезпечення екзокринних клітин за короткотривалої дієти з високим вмістом жиру і дієти з високим вмістом жиру і цукру | 99 |
| 3.4.1. Маса органів щурів і біохімічні параметри крові за короткотривалих дієт | 100 |
| 3.4.2. Дихальна функція ізольованих мітохондрій печінки щурів за короткотривалих дієт..... | 103 |

| | |
|---|------------|
| 3.4.3. Біоенергетичні функції мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за короткотривалої дієти з високим вмістом жиру або з високим вмістом жиру і цукру | 106 |
| Розділ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ..... | 112 |
| ВИСНОВКИ | 116 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... | 118 |
| ДОДАТОК А..... | 136 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

FCSP – Карбонілціанід-р-трифторметоксифенілгідрозон

ROI – Область інтересів

АДФ – Аденозиндифосфат

АТФ – Аденозинтрифосфат

НАДФН – Нікотинамідаденіндинуклеотиид(фосфат) відновлений

ЛПВЩ – ліпопротеїни високої щільності

ЛПНЩ – ліпопротеїни низької щільності

ЛПДНЩ –ліпопротеїни дуже низької щільності

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Актуальність теми. Важливу роль у процесах травлення та обміну речовин відіграють секретовані екзокринною частиною підшлункової залози травні ензими [1]. Синтез, накопичення та секреція таких ензимів є енергоємними процесами, а визначальну роль у забезпеченні ацинарних клітин енергією у вигляді АТФ відіграють мітохондрії [2].

Різноманітні фізіологічно активні речовини впливають на метаболізм та енергетичний обмін ацинарних клітин, можуть виснажувати у ході цього запаси клітинного АТФ [3]. До таких речовин належать жирні кислоти, активні форми кисню, а за патологічних станів – жовчні кислоти та продукти неокисного метаболізму алкоголю тощо. Також за нормальних умов стимулюють секрецію ацинарних клітин підшлункової залози такі секретогоги як ацетилхолін та холецистокінін [4]. Адекватна відповідь на дію секретогогів, як і інших фізіологічно активних речовин, неможлива без нормального функціонування механізмів регуляції забезпечення потреб клітини у енергії мітохондріями.

Дієти із високим вмістом жирів та вуглеводів широко поширені у розвинутих країнах і є причиною розвитку ожиріння [5]. Ожиріння є серйозною медичною проблемою значної частини населення у розвинутих країнах [6]. Зокрема люди, які хворіють на ожиріння, мають високий ризик розвитку діабету, серцево-судинних захворювань, неалкогольних хвороб печінки і підшлункової залози, а також жовчнокам'яної хвороби [7]. Також ожиріння є одним із факторів розвитку гострого панкреатиту [8].

Основною причиною розвитку ожиріння вважають порушення балансу між кількістю енергії, що надходить в організм та витрачається ним [7]. Проте дані про порушення енергетичного обміну в ацинарних клітинах підшлункової залози за висококалорійних дієт є нечисельними, хоч сама проблема є надзвичайно актуальною [9, 10].

Одним із методів дослідження біоенергетичних процесів у мітохондріях є полярографічний метод. Він ґрунтується на реєстрації кількості розчиненого в ізольованій комірці кисню [11]. Починаючи із перших таких досліджень за використанням електроду Кларка та ізольованих мітохондрій, загальною практикою аналізу даних було ручне вимірювання нахилу обраної області на записі. Проте із початком вивчення дихання цілісних клітин із складнішою кривою запису, а також із покращенням роздільної здатності вимірювальних пристроїв, суттєво зросла складність аналізу записаних полярограм. Розроблення специфічних автоматизованих рішень є актуальною проблемою в опрацюванні полярографічних записів дихання клітин та ізольованих мітохондрій.

Встановлення достовірного результату також неможливе без оцінки життєдіяльності клітин. У пошкоджених або некротичних клітинах спостерігаються порушення метаболізму, трансмембранного транспорту іонів чи фізіологічних реакцій на дію подразників [12, 13]. Актуальним є дослідження життєдіяльності клітин за нормальних функціональних станів, а також дії патологічних чинників. До останніх, крім ожиріння, можна віднести дію жовчних кислот на ацинарні клітини підшлункової залози [14].

Отже, з'ясування особливостей енергетичного забезпечення мітохондрій екзокринних клітин підшлункової залози є важливою і актуальною темою. Дослідження буде корисним для розуміння енергетичного обміну у клітинах підшлункової залози за зміни дієти на висококалорійну, а також з'ясування механізмів адаптаційних процесів, які виникають за таких умов.

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

Для досягнення мети виконували такі завдання:

1. Розробити автоматизоване програмне рішення у вигляді алгоритму аналізу полярографічних записів під час біоенергетичних досліджень швидкості

клітинного дихання і швидкості поглинання кисню ізольованими мітохондріями.

2. Встановити залежність характеристик роз'єданого дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози від життєдіяльності клітин.
3. Визначити життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози та рівень мембранного потенціалу мітохондрій за дії жовчної кислоти.
4. Встановити особливості енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози за короткотривалої дієти із високим вмістом жирів, а також короткотривалої комбінованої дієти із високим вмістом жирів і вуглеводів.

Об'єкт дослідження – мітохондріальні процеси ацинарних клітин підшлункової залози.

Предмет дослідження – роль біоенергетичних процесів у мітохондріях у забезпеченні життєздатності ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози за впливу похідних жовчних кислот та висококалорійних дієт.

Методи дослідження: *фізіологічні* – моделювання дієто-індукованого ожиріння; *фізико-хімічні* – полярографічний метод дослідження швидкості поглинання кисню, флуоресцентна мікроскопія; *фізичні* – зважування; *біохімічні* – вимірювання вмісту холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності, ліпопротеїнів високої щільності, тригліцеридів та глюкози у плазмі крові; *препаративні* – виділення ацинарних клітин та ізолювання мітохондрій; *прикладні* – методи розробки алгоритмів; *статистичні* – регресійний аналіз, описова статистика, t-тест Стюдента, двофакторний дисперсійний аналіз ANOVA із 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 та Центру колективного користування клітинної біології та біоенергетики Львівського національного університету імені Івана Франка в рамках держбюджетних тем «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 проекту у межах робочого часу викладачів «Транскрипційна і функціональна адаптація мітохондрій підшлункової залози та печінки до дієтарних чинників» (2021–2023 рр., № держреєстрації 0123U110302).

Наукова новизна одержаних результатів. Запропоновано і експериментально обґрунтовано новий параметр для характеристики мітохондріального дихання – стабільність роз’єданого дихання, тобто здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість роз’єданого дихання із збільшенням концентрації протонофора. Встановлено, що стабільність роз’єданого дихання є тим вищою, чим більша життєздатність клітин ізольованих ацинусів підшлункової залози. Вперше показано, що причиною зменшення мембранного потенціалу мітохондрій внаслідок дії жовчної кислоти TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л є порушення окиснення аланіну, але не пірувату.

Проведено комплексне дослідження впливу на організм короткотривалої (7 тижнів) дієти з високим вмістом жиру та/або цукру. Показано, що у тварин спостерігається лише незначне збільшення рівня холестеролу за обох експериментальних дієт та маси вісцерального жиру за дієти із високим вмістом жиру і цукру. Обидві короткочасні висококалорійні дієти – з високим вмістом жиру та/або цукру – не мають прямого впливу на дихальну функцію мітохондрій печінки у щурів. Вперше встановлено, що за короткочасної дієти із високим вмістом жиру (але не жиру і цукру) спостерігається незначне пригнічення базального дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення глюкози окремо чи в комбінації з піруватом або 3-гідроксибутиратом. Вперше показано, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози здатні утилізувати кетоніві тіла, про що свідчить збільшення максимальної швидкості

роз'єданого дихання та приріст НАД(Ф)Н-автофлуоресценції за окиснення 3-гідроксибутирату.

Практичне значення одержаних результатів. Основні положення дисертаційної роботи дають змогу краще зрозуміти механізми дії деяких чинників середовища на мітохондріальні процеси в ацинарних клітинах підшлункової залози. Результати досліджень можуть бути використані для розробки профілактичних заходів, спрямованих на недопущення розвитку захворювань підшлункової залози. Вони можуть бути впровадженими у навчальний процес у Львівському національному університеті імені Івана Франка, а також в інших навчальних закладах вищої освіти України у ході викладання навчальних курсів «Фізіологія людини і тварин», «Фізіологія травлення», «Основи біоенергетики», «Системна фізіологія», «Основи здорового харчування» і «Основи нутриціології», під час виконання курсових та дипломних робіт. Розроблено автоматизоване програмне рішення алгоритму для аналізу полярографічних записів із автоматичною корекцією артефактів, осциляторних і випадкових шумів та пошуком оптимальних зон для обчислення можуть бути використані іншими дослідниками.

Особистий внесок здобувача. Увесь обсяг експериментальних досліджень здобувач виконав самостійно або за безпосередньої участі. Він самостійно здійснив підбір та опрацювання даних літератури, виконав основну експериментальну частину дисертації і статистичну обробку результатів. Планування наукової роботи, аналіз та інтерпретацію одержаних результатів, підготовку рукописів статей виконано за участю наукового керівника та співавторів публікацій.

Апробація результатів. Основні положення дисертації були представлені на II Міжнародній міждисциплінарній дослідницькій конференції «Young Science Beyond Borders» (Польща, форма участі on line, 2023), XIV, XVIII, XIX Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2018, 2022, 2023), VIII Міжнародній науковій

конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології», присвяченій 175-річчю кафедри фізіології та анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка (Київ, 2017), 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 виданнях, що входять до наукометричної бази Scopus та 1 стаття у фаховому науковому журналі України; і 4 тези доповідей міжнародних наукових конференцій.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 138 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 і списку використаних джерел. Робота містить 26 рисунків. Бібліографічний список налічує 118 джерел літератури.

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Фізіологічні особливості енергетичного забезпечення підшлункової залози

1.1.1. Особливості функціонування мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози

Підшлункова залоза відіграє важливу роль у процесах травлення та обміну речовин. Сік підшлункової залози містить значну кількість травних ензимів, що забезпечує нормальне функціонування шлунково-кишкового тракту [1].

Структурно підшлункова залоза складається із груп різних клітин – ацинарних клітин, протокових клітин, а також клітин острівців Лангерганса. Ацинарні і протокові клітини належать до екзокринної частини підшлункової залози, острівцеві клітини – до ендокринної частини. Ацинарні клітини мають пірамідальну форму і є домінуючим типом клітин у залозі, складаючи 82 % її загального об'єму [15]. Основною функцією цих клітин є синтез, зберігання та секреція трьох основних груп травних ензимів: α -амілази, ліпази та протеаз, які забезпечують перетравлення вуглеводів, жирів та білків відповідно. У межах кожного ацинусу клітини з'єднуються високопровідними щільними контактами. Кожна ацинарна клітина містить базально розташоване ядро, велику кількість мітохондрій, вільні рибосоми і гранулярний ендоплазматичний ретикулум, а також добре розвинений апарат Гольджі. Ця система органел забезпечує утворення секреторних везикул, які ще називають зимогенними гранулами, оскільки містять як активні ензими, так і ензими-попередники. Вони розміщені в апікальній частині ацинарних клітин. До ензимів-попередників зимогенних гранул належать трипсиноген, хімотрипсиноген та прокарбоксіпептидази [15]. В активній формі у секреторних везикулах наявні такі ензими, як α -амілаза, ліпаза, фосфоліпаза А₂, естераза, рибо- та дезоксирибонуклеази [16].

Процеси синтезу і секреції травних ензимів та інших складників соку підшлункової залози не можуть відбуватися без відповідного енергетичного забезпечення, як і без забезпечення пластичними речовинами, необхідними власне для синтезу секреторних продуктів. Як відомо, потужним джерелом АТФ є окисне фосфорилування у мітохондріях, активність яких збільшується у фазі активної секреції ацинарними клітинами або під впливом стресових чинників [2]. Мітохондрії займають значну частину ацинарної клітини – близько 8 % її об'єму [17]. Також дослідження вказують на основну роль мітохондрій у продукції АТФ ацинарними клітинами; гліколіз вносить незначний внесок у енергетичний обмін цих клітин [17]. Загальний баланс оксидативної та гліколітичної продукції АТФ залежить від дії різних чинників. Зокрема, секретогоги, що спричиняють помірні кальцієві сигнали, підвищують швидкість циклу Кребса і підсилення продукції АТФ у мітохондріях [18, 19, 20]. Інсулін, навпаки, суттєво стимулює гліколітичну продукцію АТФ, що може забезпечувати енергетичні потреби ацинарних клітин навіть із ушкодженими мітохондріями [21, 22].

Екзоцитоз активується за генерації Ca^{2+} -сигналів і потребує енергії у вигляді аденозинтрифосфату [23]. Зокрема, мітохондріальний синтез АТФ, стимульований спайками Ca^{2+} , забезпечує достатню енергію для екзоцитозу ензимів, а також подальше виведення Ca^{2+} у позаклітинне середовище або його реабсорбцію у внутрішньоклітинне депо [2].

Поглинання Ca^{2+} мітохондріями ацинарних клітин підшлункової залози здійснюється високоємнісним, низькоафінним кальцієвим уніпортом. Комплекс кальцієвого уніпорту розташований у внутрішній мембрані мітохондрій, кожний його канал є тетрамером [24]. Електрорушійною силою для транспортування уніпортом катіонів Ca^{2+} є його електрохімічний потенціал, значна величина якого обумовлена значним мембранним потенціалом мітохондрій та низькою концентрацією Ca^{2+} у матриксі. Оскільки уніпорт має низьку афінність до катіонів Ca^{2+} , вважається, що мітохондрії впливають на кальцієвий гомеостаз лише тоді, коли їхня концентрація у цитозолі є значною [25].

У ацинарних клітинах підшлункової залози постулюється наявність трьох груп мітохондрій: перинуклеарних, перигранулярних і субплазматичних [26, 27]. Перинуклеарні мітохондрії розміщені навколо ядра, перигранулярні мітохондрії – відмежовують секреторні гранули від основної частини цитоплазми, а субплазматичні мітохондрії розміщені густим тяжем вздовж базолатеральної частини плазматичної мембрани.

Мітохондрії можуть бути знайдені поза описаними ділянками цитоплазми, а їхня густина за межами цих ділянок є дуже низька [28].

Експерименти із вивільненням Ca^{2+} розкрили певний зв'язок між мітохондріями окремих груп, але не було знайдено зв'язків між різними групами [27]. Різні групи мітохондрій виконують різні функції у регуляції цитозольного Ca^{2+} -сигналу. Перигранулярні мітохондрії локалізують відповіді на секретагоги в апікальній частині клітини, утворюючи «мітохондріальний бар'єр» навколо секреторних везикул [29]. Мітохондріальний бар'єр запобігає поширенню Ca^{2+} -сигналів до базальної області клітин і, отже, генерації глобальних Ca^{2+} -відповідей. Перинуклеарні мітохондрії обмежують розвиток і зменшують амплітуду ядерних Ca^{2+} -сигналів [27], в той час як субплазматичні мітохондрії локалізуються близько до з'єднань між ендоплазматичним ретикуломом та плазматичною мембраною, і відіграють важливу роль у регуляції позаклітинними катіонами Ca^{2+} [30].

Так вважається, що мітохондрії відіграють важливу роль у запобіганні поширенню Ca^{2+} -сигналів від базальної частини плазматичної мембрани ацинарних клітин до її апікальної частини, чим ефективно розділяють клітину на два окремих сигнальні компартменти [28]. Це зокрема підтверджується дослідженнями із блокуванням поглинання Ca^{2+} мітохондріями або деполяризацією внутрішньої мембрани мітохондрій із використанням протонофорів [29, 31].

Інша група – перигранулярні мітохондрії – відіграє важливу роль у клітинному та системному метаболізмі. Ця група характеризується наявністю

асоційованих з мітохондріями мембран ендоплазматичного ретикулуму, які, попри близьке розміщення, не з'єднані між собою. Така структура дає змогу кожній органелі зберігати власні характеристики, але при цьому покращується міжорганельна сигналізація. Ендоплазматичний ретикулум регулює багато клітинних процесів, включаючи згортання білків та накопичення катіонів Ca^{2+} . Зокрема, серед білків ендоплазматичного ретикулуму та мітохондрій, які відіграють ключову роль у функціонуванні асоційованої з мітохондріями мембрани ендоплазматичного ретикулуму є: циклофілін D, ендоплазматичний редукційний білок 1, глюкозо-регульований білок-75, рецептор інозитулу 1,4,5-трисфосфату першого типу, мітофузин-2, піруватдегідрогеназа-кіназа-4 та інші [32].

1.1.2. Регуляція секреції підшлункової залози

Дія фізіологічно активних речовин (включаючи жирні кислоти, активні форми кисню, аспарагіназу, жовчні кислоти та неоксидативні метаболіти алкоголю) може вичерпувати запаси клітинного АТФ [3]. Так як активацією Ca^{2+} -сигналізації забезпечується і регулюється зв'язок «стимул-метаболізм», проте сам загальний метаболізм також має сильний зворотний ефект на біоенергетичні процеси ацинарних клітин. Зокрема наявний суттєвий вплив зменшення кількості АТФ на ацетилхолін-стимульовані кальцієві осциляції у ацинарних клітинах [33]. Більше того, деякі чинники, що викликають гострий панкреатит (наприклад, жовчні або жирні кислоти), здатні створювати альтернативний шлях потоку Ca^{2+} , який не пригнічується із виснаженням АТФ [22]. Так було ідентифіковано кілька нових каналів вивільнення Ca^{2+} в ацинарних клітинах підшлункової залози [34] і наразі невідомо який вплив мітохондріального гальмування та виснаження АТФ на ці канали. Встановлення зв'язків між недавно ідентифікованими шляхами введення кальцію та клітинним біоенергетичними процесами є перспективним предметом для майбутніх досліджень.

Одним із основних секретарогів підшлункової залози є холецистокінін [4]. Фізіологічні рівні екзогенного холецистокініну, які вводились людям, спричиняли секрецію трипсиногену, аналогічну тій, яка реєструється після прийому їжі. Активація холецистокініном секреції ензимів підшлункової залози у людей частково блокувався антагоністом рецептора ССК1 локсиглюмідом і повністю інгібувався атропіном, що свідчить про те, що холінергійна активація є основним механізмом його дії [35]. Також показано, що у більшості видів, включаючи людину, стимульована вживанням їжі секреція холецистокініну інгібується протеазами підшлункової залози [36].

Стимуляція органів чуття під час прийому їжу, зокрема органів зору, нюху чи смаку спричиняють першу фазу секреції ацинарними клітинами підшлункової залози – мозкову фазу. Крім сенсорного сприйняття, взаємодія деяких молекул їжі, таких як довгі ланцюги жирних кислот із рецепторами у ротовій порожнині має аналогічний ефект [37]. Близько 20-25% всієї екзокринної секреції підшлункової залози відбувається під час мозкової фази [38]. Ця оцінка базується на даних, отриманих під час «несправжнього харчування» – експерименту, коли їжа чи її компоненти діють на зорові, нюхові та смакові рецептори, але не споживається досліджуваним організмом.

Мозкова фаза екзокринної секреції підшлункової залози реалізується через рухові волокна блукаючого нерву. Сенсорні сигнали, що виникають внаслідок очікування їжі, активації зорових, нюхових і смакових рецепторів, інтегруються у стовбурі головного мозку, і звідти нервові сигнали передаються до екзокринної частини підшлункової залози блукаючим нервом [39]. Холінергійні агоністи спричиняють секреторні реакції екзокринної частини підшлункової залози, подібні на активацію під час мозкової фази, тоді як ваготомія блокує їх. Це свідчить про те, що ацетилхолін, який секретується закінченнями блукаючого нерву, є основним механізмом, за допомогою якого сенсорні входні сигнали спричиняють екзокринну секрецію підшлункової залози [40].

Встановлено, що «несправжнє харчування» та електрична стимуляція блукаючого нерву у собак спричинюють виділення холецистокініну, хоча така відповідь може бути відсутньою у людей [41]. Також показано, що ендогенний холецистокінін підсилює вивільнення панкреатичного поліпептиду в людей під час «несправжнього харчування» [42]. Існує припущення, що вазоактивний інтестинальний пептид (VIP) і пептид, що вивільняє гастрин (GRP), можуть впливати на мозкову фазу секреції підшлункової залози. Таким чином, хоча нейромедіатори виділяються під час нервової стимуляції, вважається, що ацетилхолін є основним нейромедіатором, який регулює мозкову фазу.

Потрапляння їжі у шлунок запускає шлункову фазу секреції підшлункової залози. Активація цієї фази відповідає за приблизно 10 % від загальної секреції [43]. Потрапляння кислого хімусу в дванадцятипалу кишку ініціює наступну – кишкову фазу секреції підшлункової залози. Секреція панкреатичної ліпази стимулюється молекулами із перетравленої їжі, такі як олеат натрію, моногліцериди, пептиди та амінокислоти (зокрема триптофан і фенілаланін) [44]. Регуляція цього процесу відбувається за дії гормонів секретину та холецистокініну [4].

1.1.3. Біоенергетичні процеси ацинарних клітин під дією активних речовин

Дослідження біоенергетичних процесів у ацинарних клітинах підшлункової залози за дії фізіологічно активних речовин у нормальних фізіологічних та патофізіологічних умовах дозволяє краще зрозуміти як важливість тих чи інших процесів, так і залучення їх при розвитку різноманітних порушень чи захворювань.

До таких досліджень належать визначення адаптаційних здатностей мітохондрій за впливу ацетилхоліну та холецистокініну. Відомо, що під час фізіологічної стимуляції первинними агоністами відбувається деполяризація внутрішньої мембрани мітохондрій, що спричиняє збільшення синтезу АТФ та

швидкості роз'єданого дихання [45]. При цьому використання показників швидкості роз'єданого дихання і мембранного потенціалу мітохондрій дозволяє охарактеризувати специфіку адаптаційної здатності. Зокрема, показники максимальної швидкості клітинного дихання, оптимальної концентрації FCCP, прискорення та сповільнення дихання є цільовими параметрами оцінки адаптаційної здатності [45].

Визначення адаптаційної здатності дозволяє характеризувати метаболізм окремих субстратів та здатність клітини підтримувати гомеостаз біоенергетичних процесів в цілому. Збільшення максимальної швидкості клітинного дихання при цьому відображає збільшенні можливості синтезу АТФ і, як наслідок, здатності підтримувати енергоємні процеси екзокринної секреції.

Іншими дослідженнями впливу фізіологічно активних речовин на біоенергетичні процеси є вплив субстратів окиснення на метаболічні процеси у мітохондріях в інтактних клітинах та *in situ* (пермеабілізованих клітинах). Пермеабілізація дозволяє визначити вплив вільнопроникаючих у пермеабілізовану клітину речовин на мітохондрії, при цьому зберігаючи нативні зв'язки мітохондрій з іншими органелами [46].

1.2. Основи дослідження впливу дієт на ацинарні клітини

Одним із напрямків дослідження метаболічних порушень, нормального фізіологічного стану чи розвитку патологічних станів у підшлунковій залозі є тваринні моделі ожиріння чи специфічних дієт. В основі моделі дієто-індукованого ожиріння лежить хронічна або гостра зміна дієти на таку, яка містить підвищений вміст жирів, підвищений вміст вуглеводів або є комбінацією із підвищеного вмісту жирів та вуглеводів [47]. При цьому визначення відсоткового вмісту жирів, вуглеводів, білків чи мікроелементів дозволяє стандартизувати модель для отримання бажаного результату і дослідження змін із більш відтворюваними результатами.

Збільшене споживання високоенергетичної їжі з великим вмістом жирів та вуглеводів у поєднанні із низькою фізичною активністю є причиною енергетичного дисбалансу між спожитими та витраченими калоріями, і є фундаментальною причиною розвитку ожиріння. При цьому загальна кількість жиру у організмі може досягати більше 30% [48]. Основним молекулярним механізмом є стан оксидативного стресу із вивільненням цитокінів жирового походження, і, як результат, розвиток хронічного запального процесу та дисфункція органів. [49]. Так, під час розвитку ожиріння, після початкової фази гіпертрофії та гіперплазії адипоцитів, які накопичують надмірну енергію, тригліцериди накопичуються як ектопічний жир у нежирових органах, таких як печінка, підшлункова залоза, скелетні м'язи та серце [50].

Вважається, що ожиріння є одним з факторів розвитку гострого панкреатиту. Зокрема, у дослідженнях було показано, що схильні до ожиріння щурі мають більшу схильність і до розвитку гострого панкреатиту [8], на відміну від щурів контрольної групи чи щурів на високожировій дієті. Таким чином, ожиріння є фактором підвищеної складності гострого панкреатиту.

Розрізняють моделі, ціль яких спровокувати та визначати дієто-індуковані зміни при гострому чи короткотривалому хронічному зміні раціону, а також моделі хронічного ожиріння [47]. Такі моделі дозволяють визначити як розвиток патологічних змін за оновленого раціону у стресовій ситуації – короточасні зміни, так і тривалий вплив і загальну перебудову метаболізму за порушення збалансованості раціону – хронічні зміни.

Вплив висококалорійних дієт на організм можна оцінювати як комплексний [51]. Це пояснюється збільшенням розвитку системних порушень у функціонуванні організму, зокрема розвитку порушень серцево-судинної системи або порушень метаболізму глюкози [49]. Проте дослідження впливу на органи-мішені є перспективним напрямком для встановлення основних фізіологічних процесів, які відбуваються як при різкій зміні раціону, так і при хронічному ожирінні.

Надлишкове накопичення жирів у підшлунковій залозі називають підшлунковим стеатозом або неалкогольним жировим захворюванням підшлункової залози. Постійне жирове накопичення і дисфункція екзокринної функції підшлункової залози відбувається через токсичний вплив вільних жирних кислот на ацинарні клітини [49]. У порівнянні до адипоцитів, нежирові клітини мають суттєво обмежену ємність для зберігання вільних жирних кислот. Так, коли ліміт вичерпується, клітини стають гіпертрофованими і піддаються некрозу із залученням макрофагів [52]. Більше того, таке захворювання може бути причиною подальшого розвитку гострого панкреатиту, ініціювати розвиток панкреатичної фістули після хірургічних операцій або навіть провокувати розвиток раку підшлункової залози [53].

Неалкогольне жирове захворювання підшлункової залози відрізняється від стеатозу печінки – в останньому жир накопичується у самих гепатоцитах, коли при «жировому перетворенні» підшлункової залози тригліцериди накопичуються у адипоцитах у тканині підшлункової залози. При цьому реєструється гіпертрофія і гіперплазія, яка може бути причиною інсулінорезистентності та дисфункції бета-клітин і, як наслідок, подальшого розвитку діабету другого типу [52].

Серед моделей дослідження впливу ожиріння *in vivo* є моделювання жиру-індукованого пошкодження підшлункової залози із врахуванням властивостей міжорганного зв'язку між підшлунковою залозою та вісцеральним жиром. Дослідження показують докази некрозу панкреатичної паренхіми при некрозі вісцерального жиру [54]. Вісцеральний жир, який є основним гідролізованим пулом тригліцеридів, оточуючим підшлункову залозу [55]. Припускається, що в середньому він може становити понад 3 кг у людей з масою тіла приблизно 84 кг [56]. Розрахунки оцінюють, що вісцеральний жир може займати від 10% до 30% внутрішньо-черевної області. Оскільки тригліцериди становлять 80-90% об'єму адипоцитів, а кожна молекула тригліцеридів може генерувати три молекули вільних жирних кислот після ліполізу [56],

неконтрольоване перетікання ліпаз з підшлункової залози під час панкреатиту може потенційно генерувати великі кількості ліпотоксичних вільних жирних кислот з цих вісцеральних жирових відкладень поблизу підшлункової залози. Так за короткий час це призводить до суттєвих негативних наслідків [57].

Також наявність інших факторів, як от алкогольна інтоксикація та вплив метаболітів алкоголю на підшлункову залозу при ожирінні, може здійснювати опосередкований вплив через ті ж жирні кислоти. Зокрема, накопичення такого метаболіту етанолу як етилового естеру жирних кислот може викликати подальше перетворення останніх у вільні жирні кислоти та спричиняти аналогічні некротичні пошкодження, як і при неалкогольних хворобах підшлункової залози [58].

Ще однією з причин розвитку панкреатиту є жовчнокам'яна хвороба. Відомо, що перекриття гепатопанкретичної протоки каменями може спричиняти подальше потрапляння жовчних кислот у підшлункову залозу [59]. Також перекриття протоки блокує вивільнення травних ензимів у дванадцятипалу кишку з можливою їх активацією [60].

1.3. Складність цифрового аналізу біологічних сигналів та полярограм

Розвиток технологічних можливостей у реєстрації та збереженні даних є причиною необхідності побудови нових математичних моделей та розробці нових методів аналізу отриманих даних [61]. Дослідження біоенергетичних процесів із використанням полярографічного методу дає відображення проходження досліджуваного явища у вигляді кривої запису – полярограми. Подальший аналіз цієї кривої, дослідження її характеристик та виокремлення значущих ділянок, які є визначальними у тих чи інших дослідженнях дають можливість отримати бажаний результат. Якість результату дослідження безпосередньо залежить від проведеного математичного аналізу отриманих даних.

Полярнографічний запис дихання мітохондрій чи клітин є складним сигналом, характеризуються наявністю однієї або більше лінійних ділянок, тобто є непараметричною кривою. Лінійні ділянки є відрізками кривої із стабільною у часі зміною показника під час проходження фізіологічного процесу – швидкістю зміни показника. Наявність двох або більше лінійних ділянок формують основну складність для розрахунку швидкості зміни показника, оскільки потрібно визначити відрізок на всьому записі сигналу, який має наукове значення і представляє основний інтерес у ході дослідження. І попри те, що у біоенергетичних дослідженнях очікуваний результат має відому характеристику (зокрема тієї ж швидкості зміни показника), чітке визначення ділянки, яка може слугувати для визначення значення є доволі суб'єктивним процесом. На відміну від більш простих сигналів, фізіологічні процеси не можуть бути описаними простими функціями, а тому немає розроблених універсальних математичних моделей, які могли б слугувати основою для розрахунку потрібного показника із отриманого сигналу.

Інша складність у дослідженні біологічних сигналів – це суттєві обмеження записуючих пристроїв. В ідеальних умовах, система реєстрації сигналу, яка включає в себе пристрій та ізольовану систему із досліджуваним зразком не повинна допускати впливу сторонніх чинників. На практиці при проведенні біологічних досліджень, досить складно сформувати таку систему реєстрації, яка була б повністю ізольована від впливу багатьох відомих чинників. Серед них – сторонні електромагнітні поля, вібрації, коливання температури і середовища тощо. При цьому суттєвий внесок у якість записаного сигналу вносить якість самого досліджуваного зразку. Коливання у кількості матеріалу між дослідами, якість виділення чи інкубації та інші фактори впливають на кінцевий результат, спотворюючи його.

Проведення полярнографічних досліджень особливо чутливе до перерахованих чинників. Використання методу вимірювання кількості кисню у середовищі з використанням електродів та зчитування змін потенціалу

надзвичайно залежить як від стабільності середовища, так і від якості досліджуваних зразків. Відтворюваність сигналів, особливо у паралельних експериментах, коли дублюються всі вхідні параметри досліджуваної сигналів, залежить від кількості внесеного досліджуваного зразка і його дисперсії у розчині, дифузії досліджуваних речовин, та навіть швидкості чи якості перемішування зразка. Тому, коли виконана мінімізація всіх згаданих факторів, то для покращення якості отриманих результатів використовують алгоритми аналізу сигналів, зокрема очищення від шумів, очищення від артефактів запису та стандартизованого пошуку значущих ділянок.

Шуми на сигналах полярографічних досліджень є спотвореннями вихідного сигналу. За умов відсутності шуму, сигналом у полярограмі є крива зміни показника. Шум при цьому вносить системні або локальні зміни у дисперсію даних і спотворює криву, що погіршує подальший аналіз. Основним методом при зменшенні кількості шуму кривої є математичне оцінювання її реальних значень. При цьому саме для полярографічних даних використовують регресійний аналіз [62]. Такий тип аналізу дозволяє апроксимувати реальні значення кривої як всього запису, так і окремих фрагментів. Саме у випадку алгоритмів видалення шуму використовують непараметричну регресію для згладжування кривої запису і, як наслідок, мінімізації шумів на ній [63].

В основі вищезгаданого аналізу існує метод локальної поліноміальної регресії. Цей метод є узагальненням поліноміальної регресії та ковзної середньої моделі [64]. Перевагами методу є простота з точки зору інтерпретації та математичного аналізу, а також швидкість обчислення [65].

Потенційним напрямком застосування алгоритмів видалення шумів із записів є також математичне моделювання на основі реальних записів флуоресценції. Зокрема запис зміни автофлуоресценції НАД(Ф)Н в ізольованих мітохондріях за функціонування електронтранспортного ланцюга має поліноміальну природу [66], а значить може бути опрацьований із використанням вищезгаданих алгоритмів.

Після очищення від шумів та артефактів, подальше визначення та пошук значущих лінійних ділянок потребує оцінки лінійності певної ділянки. Велика кількість аналітичних та статистичних методів існує для визначення різниці між досліджуваною лінійністю та ідеальною лінійністю [67].

Найпоширенішим методом є візуальне підтвердження. При цьому крива записаного сигналу будується у вигляді графіків і оцінюється науковим співробітником. Зокрема такий метод використовували для оцінки кривої запису при рідинній хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (LC/MS/MS) [68]. Така візуальна оцінка є простим і інтуїтивно зрозумілим інструментом для досвідченого лаборанта, але вона є суб'єктивною, ненадійною і погано відтворюваною, якщо використовується без експертного розуміння методу [67].

Інший метод – метод найменших квадратів лінійної регресії. Метод вписує пряму лінію в набір точок даних так, що сума квадратів вертикальних відстаней від точок до вписаної лінії є мінімальною [67]. Таким методом є досить точним лінійності ділянки, проте він не дозволяє оцінити ділянку складнішого сигналу, який складається з кількох лінійних ділянок, із одним або декількома «перегинами» [69, 68].

Методом, який враховує складність кривої є поліноміальний метод [67]. Він є частиною стандарту NCCLS EP6-A, який описує методи оцінки лінійності кількісних вимірювальних процедур [70].

Результатом аналізу вищезгаданими методами є функція кривої, яку можемо використати для отримання зміни швидкості показника на певній ділянці кривої. Достовірність даних, як і реалістичність апроксимованої кривої оцінюють зокрема із використання коефіцієнта кореляції R та коефіцієнта детермінації R^2 [71]. Використання циклічних оцінювань різних ділянок із врахуванням їх довжини та коефіцієнта детермінації R^2 дозволяє знайти оптимальне рішення, а з ним – найбільш близький до достовірного результат.

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 250–350 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної кімнатної температури з 12-годинним циклом освітлення, з вільним доступ до води та стандартного корму (D-Мікс, Україна). Безпосередньо 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 1985) та Законом України Про захист тварин від жорстокого поводження. Протоколи експериментів були затверджені Комітетом з догляду та використання тварин Львівського національного університету імені Івана Франка.

2.2. Модель хронічного дослідження

Для експерименту були відібрані лише здорові щурі-самці, випадковим чином розподілені у три групи. Кожна група налічувала 10 дослідних тварин. У контрольній групі щурі отримували стандартний збалансований раціон. Друга група перебувала на дієті з високим вмістом жирів (дієта HF). Для цієї групи стандартний корм доповнювали тваринним смальцем із розрахунку, щоб жири забезпечували 45 % енергетичної цінності добового раціону .

Третя дослідна група отримувала корм з високим вмістом жирів та легкозасвоюваних вуглеводів (дієта HFHS). Для цього до стандартного корму додавали тваринний смалець і сахарозу. Жири у раціоні для цієї групи забезпечували 39 % енергетичної цінності раціону, а вуглеводи – до 51 % (це

нижче, ніж у контролі, частка легкозасвоюваних вуглеводів у цьому раціоні була дуже високою).

Склад дієт, що використовували в дослідженні, наведений у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Склад та енергетична цінність дієт у дослідних групах

| Компоненти (на 100 г) | Дієти | | |
|--------------------------------------|----------------------------|----------|------------|
| | Збалансована (контроль) | HF дієта | HFHS дієта |
| Збалансований корм, г | 100,0 | 85,0 | 60,0 |
| Додаткові тваринні жири, г | - | 15,0 | 18,0 |
| Додаткові вуглеводи (сахароза), г | - | - | 22,0 |
| Енергетична цінність (ккал/г) | 3,03 | 3,92 | 5,08 |
| Білки, % | 21,5 | 20,0 | 10,0 |
| Жири, % | 6,5 | 45,0 | 39,0 |
| Вуглеводи, % | 72,0 | 35,0 | 51,0 |

Тривалість перебування щурів на змінній дієті становила 7 тижнів. Споживання корму тваринами відбувалось «*ad libitum*». Перед початком експерименту тварин зважували і щоденно під час годування проводили зважування щурів. Поновлення корму у годівниці відбувалась щоденно, у ті самі години доби.

Після завершення дієти (на 50 день), проводили кінцеве зважування, декапітацію тварин і забір зразків крові для біохімічних досліджень.

2.3. Реєстрація маси тіла та вісцерального жиру у щурів

Визначення маси тіла щурів проводили щоденно у чітко визначену годину до поновлення наявного корму у клітках. Маса тіла записувалась у журнал. Після декапітації проводили відбір візуально видимого вісцерального жиру. У найкоротший термін виділений жир зважували і записували дані у журнал.

2.4. Ізолювання панкреатичних ацинусів

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримували з використанням колагенази (тип 4, 0,2 мг/мл) за модифікованим методом Вільямса та співавт. [72]. Після декапітації та знекровлення розтинали черевну стінку. На спільну жовчну протоку в місці її впадання у 12-палу кишку накладали лігатуру. Другу лігатуру підводили під голку, вставлену в початок протоки. Через цю голку в протоку вводили 5 мл базового позаклітинного середовища із колагеназою.

Відпрепаровану залозу відділяли від жирової тканини, після чого інкубували впродовж 15 хв при температурі 37 °С на водяному термостаті, струшуючи із частотою 120 циклів за хвилину. Інкубаційне середовище двічі заміняли на 5 мл свіжого середовища з колагеназою та продовжували повторну інкубацію по 15 хв. Після інкубації тканину підшлункової залози відмивали у базовому позаклітинному середовищі, відділяли тканину залози від проток і судин, а потім механічно диспергували протягуванням дозатором через серію наконечників з діаметром отворів 2, 1,5 і 1 мм.

Отриману суспензію фільтрували через фільтруючу тканину з діаметром отворів 150 мкм. Отриманий препарат нашаровували на 5 мл базового розчину з підвищеною до 4 % концентрацією БСА і центрифугували впродовж 5 хв на центрифугі ЦЛК-1 за 50 g. Ацинуси осаджувалися, а окремі клітини і їхні уламки залишалися в супернатанті.

Клітини підраховували за допомогою гемоцитометра. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували трипановим синім (0,1 %-ний розчин).

Після виділення ацинуса зберігали у базовому позаклітинному середовищі такого складу (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.

2.5. Виділення мітохондрій печінки

Для виділення мітохондрій печінки щурів ми використовували метод Фреца та співавт. [73]. Отриману печінку зважували та подрібнювали на дрібні шматки із використанням стерильного леза. Після цього зразок промивали за допомогою середовища виділення та пропускали через прес. Далі, після додавання охолодженого середовища виділення, зразок гомогенізували. Ємність для гомогенізації, а також всі інші використанні ємності були охолоджені і розміщені на льоду.

Отриману суспензію центрифугували 10 хв за 1000 g задля осадження важких клітинних елементів та решток крові. Отриману надосадову рідину відбирали в іншу пробірку та центрифугували 10 хв за 7000 g. Далі відбирали осад, відмивали та ресуспензували за допомогою 5 мл середовища виділення. Після цього розчин знову центрифугували 10 хв за 7000 g. Всі центрифугування здійснювались за температури 4 °С. Зберігати суспензію мітохондрій потрібно у охолодженій ємності, зануреній у воду з льодом.

Середовище виділення містило (ммоль/л): сахароза – 250,0, EGTA – 1,0, HEPES – 10,0, рН – 7,2. Середовище інкубації мало такий склад (ммоль/л): сахароза – 250,0, EGTA – 0,1, HEPES – 10,0, K₂HPO₄ – 2,0, MgCl₂ – 0,5, рН – 7,2.

2.6. Біохімічні методи дослідження плазми крові щурів

2.6.1. Визначення концентрації глюкози

Для визначення використовували зразки плазми крові тварин, відібрані та заморожені за -20°C відразу після декапітації тварини. Розморжування зразків здійснювали за кімнатної температури.

Концентрацію глюкози в плазмі крові визначали глюкозооксидазним методом за допомогою набору реактивів «Глюкоза МОНО» («Філісіт Діагностика», Україна) та спектрофотометра DeNovix DS 11+ (Denovix Inc., США). Глюкоза за участі глюкозооксидази окислюється до глюконової кислоти та гідроген пероксиду, який за дії пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназолом. Продуктом є хінонімін червоно-фіолетового забарвлення, концентрація якого прямопропорційна вмісту глюкози у зразку.

Для визначення концентрації глюкози в плазмі крові використовували наступні розчини: монореагент, фізіологічний розчин та калібрувальний розчин з концентрацією глюкози 10.0 ммоль/л. Розчин монореагенту містив 1100 О/л пероксидази, 9000 О/л β ,D-глюкозооксидази, 55 мг/л 4-амінофеназону, 190 мг/л фенолу та $0,1$ ммоль/л фосфатний буфер (рН $7,2 - 7,4$).

У пробірки для холостої та дослідної проб вносили по $0,01$ мл фізіологічного розчину та зразка, відповідно. Далше в усі пробірки додавали по $1,0$ мл монореагенту, суміш ретельно перемішували та інкубували 25 хв за кімнатної температури. Оптичну густину калібрувальної та дослідної проб визначали за довжини хвилі 550 нм проти холостої проби.

Концентрацію глюкози у зразку обчислювали за допомогою формули (2.1) та виражали у ммоль/л:

$$C = \frac{E_{\text{дослідн.}}}{E_{\text{калібр.}}} \times 10, \quad (2.1)$$

де C – концентрація глюкози ;

$E_{\text{дослідн.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{калібр}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

10 – концентрація глюкози у калібрувальному розчині.

2.6.2. Оцінка показників ліпідного обміну

З метою оцінки ліпідного обміну у плазмі крові визначали концентрацію тригліцеридів, загального холестеролу, холестеролу ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ), холестеролу ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) з використанням реактивів фірми «Філісіт Діагностика» (Україна) за допомогою імуноферментного аналізатора Stat fax 303 (Awareness Technology Inc., США).

Визначення тригліцеридів плазми крові щурів

Тригліцериди у зразках плазми крові щурів визначали ензиматичним колориметричним методом. Унаслідок ензиматичних реакцій гідролізу ліпідів утворюється хінонімін, концентрацію якого визначають фотометрично за довжини хвилі 505 нм.

Для визначення концентрації тригліцеридів у плазмі крові використовували калібрувальний розчин (відповідав концентрації $2,26 \pm 0,10$ ммоль/л) та реакційну суміш, яка містила 40 ммоль/л PIPES, 5 ммоль/л 4-хлорфенолу, 1 ммоль/л $MgSO_4$, 0,5 ммоль/л 4-амінофеназону, 1500 МОд/л ліпази, 200 МОд/л гліцерокінази, 1000 МОд/л гліцерофосфатоксидази, 250 МОд/л пероксидази; рН – 7,5.

У пробірку з дослідною пробою вносили 1,0 мл розчину ензимів та додавали 0,01 мл плазми крові. Калібрувальна та холоста проби містили по 1,0 мл розчину ензимів та по 0,01 мл розчину калібрувального розчину та дистильованої води відповідно.

Вміст пробірок ретельно перемішували та витримували 10 хв у термостаті за $37^\circ C$. Оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{досл.}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{кал.}}$) вимірювали проти холостої проби. Концентрацію тригліцеридів у зразках розраховували за допомогою формули (2.2) та виражали у ммоль/л:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 2,26, \quad (2.2)$$

де C – концентрація тригліцеридів в 1 мл проби;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

2.26 – концентрація тригліцеридів у стандарті.

Визначення загального холестеролу плазми крові щурів

У реакційній суміші, внаслідок ензиматичних реакцій утворюється хінонімін. Інтенсивність рожево-червоного або бузкового забарвлення реакційного розчину пропорційна концентрації холестеролу. З метою визначення концентрації загального холестеролу у плазмі крові використовували калібрувальний розчин (із концентрацією холестеролу $5,17 \pm 0,10$) та реакційну суміш, що містила $30,0 \pm 1,5$ ммоль/л трісу, 150 ± 15 О/л холестеролестерази, 100 ± 10 О/л холестеролоксидази, $5,0 \pm 0,5$ КО/л пероксидази, $0,3 \pm 0,015$ ммоль/л 4-амінофеназону, $30,0 \pm 1,5$ ммоль/л фенолу. Дослідна, калібрувальна та холоста проби містили по 1,0 мл розчину ензимів та по 0,01 мл плазми крові, калібрувального розчину холестеролу та дистильованої води відповідно.

Розчини у пробірках ретельно перемішували та інкубували 5 хв за 37°C . Вимірювали оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{досл.}}$) та калібрувальної проби ($E_{\text{кал.}}$) проти холостої проби. Концентрацію холестеролу у дослідних зразках обчислювали за допомогою формули (2.3) та виражали у ммоль/л:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 5,17, \quad (2.3)$$

де C – концентрація холестеролу;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

5,17 – концентрація загального холестеролу у стандарті.

Визначення холестеролу ліпопротеїнів високої щільності

Внаслідок додавання до дослідного зразка реагенту для осадження, що містив $0,560 \pm 0,028$ ммоль/л фосфорновольфрамової кислоти та $30,0 \pm 1,5$ ммоль/л хлориду магнію, хіломікрони, ЛПДНЩ і ЛПНЩ випадають в осад. Після центрифугування у надосадовій рідині залишаються лише ЛПВЩ. Концентрація холестеролу ЛПВЩ у зразках визначається ензиматичним колориметричним методом. Інтенсивність рожево-червоного або бузкового забарвлення реакційного розчину є пропорційною до концентрації холестеролу ЛПВЩ.

На початку дослідження 0,25 мл плазми крові змішували із 0,5 мл осаджувального реагенту та інкубували 10 хв за 25 °С. Після цього центрифугували 20 хв за 4000 об/хв та акуратно відбирали прозору надосадову рідину, не допускаючи потрапляння осаду до розчину. У пробірку з дослідною пробою додавали 0,1 мл надосадової рідини та 1,0 мл реакційної суміші. Для холостої проби додавали 0,1 мл дистильованої води та 1,0 мл ензимного реагенту. Калібрувальна проба була аналогічною за вмістом до холостої, однак із додаванням 0,01 мл калібрувального розчину холестеролу, що відповідав концентрації холестеролу $5,17 \pm 0,10$ ммоль/л.

Вміст пробірок ретельно перемішували та витримували у термостаті 20 хв за 37 °С. Вимірювали оптичну щільність дослідної та калібрувальної проб проти холостої проби. Концентрацію холестеролу ЛПВЩ у зразках обчислювали за допомогою формули (2.4) та виражали у ммоль/л:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 1,551, \quad (2.4)$$

де C – концентрація холестеролу ЛПВЩ;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

1,551 – значення концентрації ЛПВЩ калібратора з урахуванням розведень калібратора холестеролу відносно сироватки.

Визначення холестеролу ліпопротеїнів низької щільності

Холестерол ЛПНЩ є основною транспортною формою загального холестеролу та тригліцеридів, переносячи їх, в основному, у вигляді ефірів холестеролу.

На першому етапі визначення холестеролу ЛПНЩ до дослідного зразка додається маскувальний реагент №1 (25 ммоль/л тріс, 5000 Од/л холестеролестерази, 5000 Од/л холестеролоксидази, 10 КО/л каталази), що захищає холестерол ЛПНЩ від дії ензимів, а інші форми ліпопротеїнів зазнають ензиматичного гідролізу. На другому етапі після внесення реагенту № 2 (25 ммоль/л тріс, 3,4 ммоль /л 4-амінофеназон, 10 КО/л пероксидази) внаслідок реакцій окислення утворюється комплекс, забарвлення якого є пропорційне концентрації холестеролу ЛПНЩ.

У ході аналізу для дослідної проби змішували 0,004 мл плазми крові та 0,4 мл маскувального реагенту №1. До калібрувальної та холостої проби вносили лише по 0,4 мл маскувального реагенту №1. Зразки витримували 5 хв за 37 °С, після чого вимірювали оптичну щільність дослідної ($E_{\text{досл.1}}$) та калібрувальної ($E_{\text{калібр.1}}$) проб проти холостої проби за довжини хвилі 600 нм.

На другому етапі до всіх пробірок додавали реагент №2, а до калібрувальної проби – додатково 0,004 мл калібрувального розчину з концентрацією холестеролу $5,17 \pm 0,10$ ммоль/л. Вміст пробірок ретельно перемішували та витримували у термостаті 5 хв за температури 37 °С. Вимірювали оптичну щільність дослідної ($E_{\text{досл.2}}$) та калібрувальної ($E_{\text{калібр.2}}$) проб проти холостої проби. Концентрацію холестеролу ЛПНЩ у зразках обчислювали за допомогою формул (2.5, 2.6) та виражали у ммоль/л:

$$\Delta E = (E_1 - E_2) \quad (2.5)$$

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 1,551, \quad (2.6)$$

де С – концентрація ЛПНЩ;

$\Delta E_{\text{досл.}}$ – різниця оптичних густин дослідної проби;
 $\Delta E_{\text{кал.}}$ – різниця оптичних густин калібрувальної проби;
1,551 – значення концентрації калібратора.

2.7. Полярографічне вимірювання швидкості споживання кисню

Вимірювання поглинання кисню ізольованими ацинусами підшлункової залози здійснювали за допомогою полярографа RC650 6-cell respirometer (Strathkelvin Instruments, Велика Британія).

Перед початком роботи проводили калібрування електродів згідно інструкції приладу. Також системою підтримування температури задавалась необхідна для дослідження температура. Так для вимірювання поглинання кисню ацинарними клітинами підшлункової залози температура становила 37° С, для ізольованих мітохондрій печінки – 25° С.

У кожному комірці додавали 1,5 мл досліджуваного середовища із досліджуваним зразком. У випадку реєстрації швидкості клітинного дихання ацинарними клітинами, зразок попередньо інкубували із окиснювальними субстратами та/або іншими досліджуваними речовинами відповідно до протоколу дослідження. Реєстрація кількості розчиненого кисню тривала не менше однієї хвилини. Додавання додаткових речовин, як протонофор FCCP здійснювалась без відкривання комірки через спеціальний канал у корпусі електроду. Протонофор FCCP у концентраціях 0,5–2 мкмоль/л використовували для досягнення максимальної частоти роз'єданого дихання.

Загальний запис поглинання кисню досліджуваним зразком був безперервним у кожній комірці. Після проведеної запису, результат зберігався у форматі Microsoft Office Excel.

Ручний аналіз і визначення швидкості поглинання кисню виконувалось з використання програмного забезпечення Microsoft Office Excel. Дослідник самостійно виділяв необхідну ділянку запису, яка відповідає дії певної речовини

чи базальному диханні. Тоді, у межах такої ділянки відбувався пошук ділянки ROI, яка повинна мати лінійну природу і відображати мінімальне, максимальне або максимально тривалу лінійну швидкість поглинання кисню. Далі, у межах ROI, будувався графік зміни кількості кисню від часу. У межах графіку, за потреби, видалялись артефакти запису та розраховувалась лінійна модель, з якої в окремі таблиці зберігалось значення швидкості.

Автоматичний аналіз та визначення швидкості споживання кисню виконувалось з використанням авторського алгоритму, відповідно до заданих глобальних параметрів.

Кінцеву швидкість дихання перераховували на кількістю клітин у полярографічній комірці у випадку дослідження поглинання кисню ацинарними клітинами підшлункової залози.

2.8. Флуоресцентна мікроскопія

Флуоресцентне зображення одержували за допомогою мікроскопа IX73 і камери DP-74 (Olympus, Японія). Інтенсивність флуоресценції аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ [74]. Для кожного досліджуваного зразка робили не менше 5 фотографій флуоресцентної мікроскопії та 1 фотографію світлової мікроскопії.

Для реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій використовували барвник TMRM у концентрації 50 нмоль/л (за використання фільтру Olympus U-FYW із діапазоном збудження з довжиною хвилі 535 - 555 нм, емісії – 570 - 630 нм). Його додавали до зразка та добре перемішували. Тривалість інкубації становила 20 хв. Після інкубації досліджуваний зразок відмивали з використанням позаклітинного середовища. Фотографування здійснювали із витримкою 100 мс за потужності світіння флуоресцентного джерела світла Olympus U-HGLGPS 3%.

Автофлуоресценцію НАД(Ф)Н ізольованих панкреатичних ацинусів реєстрували з використанням фільтру Olympus U-FUW із діапазоном збудження

з довжиною хвилі 340 - 390 нм, емісії > 410 нм. Фотографування здійснювали із витримкою 300 мс за потужності світіння флуоресцентного джерела світла Olympus U-HGLGPS 6%.

Вживаність ацинарних клітин після інкубації у різних середовищах визначали з використанням флуоресцентних барвників пропідій йодиду (0,5 мг/мл) та Hoechst 33258 (5 мг/мл, довжина хвилі збудження 340–390 нм, емісії > 420 нм).

Додатково використовували інгібітор гліцеральдегід 3-фосфатдегідрогенази бромпіруват (500 мкмоль/л), а також протонатор FCCP (10 мкмоль/л) з преінкубацією тривалістю 5 хв.

2.9. Методи розробки алгоритмів

Для розробки і реалізації алгоритмів було використано мову програмування Python версії 3. Для імплементації основних рішень було використано наступні бібліотеки: SciPy (1.11.4), scikit-learn (1.3.2), NumPy (1.26.2). Апроксимацію поліномів першого, другого та вищих порядків здійснювали із використанням класу `numpy.polynomial.Polynomial` з бібліотеки NumPy. Розрахунок періодограм для аналізу осциляцій сигналу був виконаний з використанням функції `scipy.signal.periodogram` із бібліотеки SciPy. Для визначення коефіцієнту детермінації R^2 використано клас `sklearn.metrics.r2_score` з бібліотеки scikit-learn. Інші бібліотеки використовувались для роботи із операційною системою, файлами, різними типами даних або для побудови графіків із проміжними результатами.

2.10. Статистичний аналіз

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.

Аналіз збіжності оцінок експертів та алгоритмів швидкості споживання кисню виконували з використанням коефіцієнту внутрішньокласової кореляції за двофакторною моделлю з випадковим ефектом. Для оцінки зсуву та дисперсії за умов тестування алгоритмів на штучно згенерованих даних використовували середню відсоткову похибку та середню квадратичну відсоткову похибку, відповідно.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Алгоритм обробки полярограм та визначення швидкості зміни показника

Першочерговим завданням розробки алгоритму пошуку лінійних ділянок та визначення швидкості зміни показника була автоматизація обчислень у полярографічних дослідженнях біоенергетичних процесів в ацинарних клітинах підшлункової залози та мітохондріях клітин печінки щурів. Такі дослідження проводять за використання певних субстратів окиснення (умов дослідження) [75, 76], а також з визначеними стимуляторами (як от FCCP чи АДФ), які використовують відповідно до протоколів та методик. Як наслідок, алгоритм має опрацьовувати детерміновану кількість випадків та комбінацій, серед яких можна виокремити наступні:

1. Псевдолінійні криві (поліном другого порядку з невеликою крутизною). Вони є характерними для початку полярографічного запису, коли реєструється базальне дихання клітин або мітохондріальне дихання у стані S_4 за Чансом [77]. Полярографічний запис дихання за дії інгібіторів дихання (як от олігоміцин, ротенон тощо) показують аналогічну форму. Зазвичай така крива вироджується у пряму ближче до її завершення.
2. Поліноміальні криві невідомого ступеня (2 або 3) з невеликою крутизною. Прикладом таких кривих є відповідь клітин чи ізольованих мітохондрій на розпряжувачі дихання (як от FCCP) [76]. У таких випадках найцікавішими є лінійні ділянки з найбільшою швидкістю дихання.
3. Складні криві з двох лінійних ділянок, з'єднані поліномом третього порядку. Важливо, що різниця між нахилом обох кривих є значною. Це найскладніші випадки, які погано описуються поліномами будь-яких порядків. Прикладом такого запису є полярографічний запис дихання ізольованих мітохондрій за додавання АДФ. У таких записах значущими є як максимальна, так і мінімальна швидкості дихання.

Отже, були сформовані три завдання для аналізу полярографічних записів дихання:

- обчислити максимальну швидкість на заданій ділянці полярографічного запису («максимум»);
- визначити мінімальну швидкість на заданій ділянці («мінімум»);
- знайти найбільш лінійний фрагмент на заданій ділянці з наступним обчисленням швидкості («лінійність»).

Для досягнення завдань було розроблено та імплементовано алгоритм пошуку лінійних ділянок на полярографічних записах із визначенням швидкості зміни показника. Загальна блок схема алгоритму представлена на рис. 3.1.

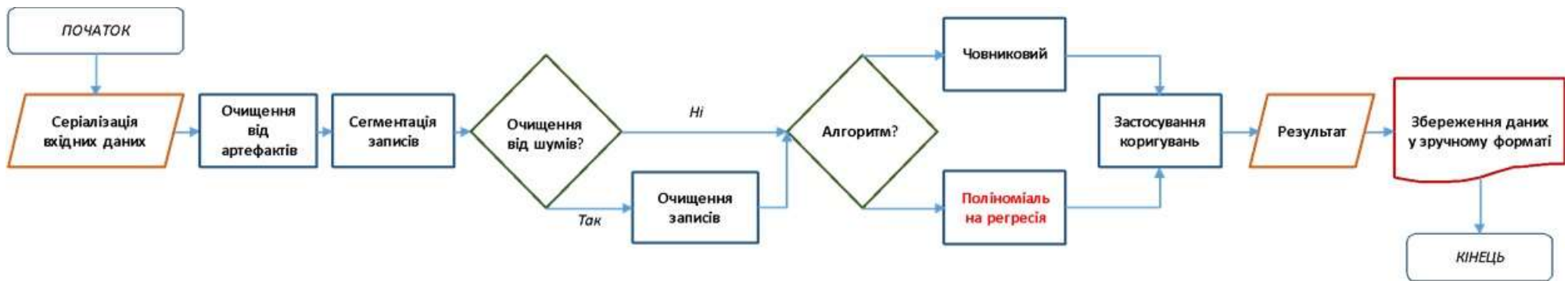


Рис. 3.1. Блок-схема загального алгоритму визначення швидкості зміни показника.

3.1.1. Принцип роботи алгоритму

3.1.1.1. Серіалізація вхідних даних

Першим кроком алгоритму є зчитування та збереження у зручному для роботи алгоритму форматі даних у пам'яті (рис. 3.2). Структура вхідних даних передбачає три складові: зчитування глобальних налаштувань експерименту, зчитування часових міток кожного окремого запису згідно протоколу запису та зчитування необроблених даних, одержаних із програмного забезпечення програми записувача.



Рис. 3.2. Блок-схема алгоритму серіалізації вхідних даних

Глобальні параметри експерименту задають ті характеристики, які визначаються специфікою конкретного дослідження. Серед таких можна виділити типовий час запису, типові рівні записаних показників, послідовність додавання стимуляторів або інгібіторів, чи завдання для кожного фрагмента.

Зчитування часових міток формує основну карту досліджень, згідно якої буде здійснена сегментація комбінованих записів. Автоматизація цього процесу не тільки знижує ризик помилкового введення, а також суттєво економить час.

Останнім важливим етапом серіалізації даних є розпізнавання та оброблення даних і програм записувача. На цьому етапі реалізований інтерфейс для аналізу даних, отриманих із програмного забезпечення до полярографа RC650 Spirometer (Strathkelvin Instruments).

3.1.1.2. Підготовка даних

Підготовка даних передбачає три основні етапи: вилучення неекспериментальних даних, очищення від артефактів та сегментація записів (рис. 3.3).



Рис. 3.3. Блок-схема алгоритму підготовки даних

Вилучення неекспериментальних даних забезпечує очищення від запису, який відбувався до чи після вказаних міток часу. Це важливий етап, який дає змогу безпомилково опрацьовувати дані, запис яких починався у різний час з використанням одного приладу.

Очищення від артефактів (рис. 3.4) вилучає різкі зміни показників у записі, які є випадковими, мають відому або невідому природу і суттєво впливають на визначення та точність отриманого результату.



Рис. 3.4. Блок-схема алгоритму очищення даних від артефактів

Основною частиною алгоритму є до десяти ітерацій циклу, під час якого формується маска для коригування вхідних даних. Першим кроком ітерації є пошук різниці між сусідніми значеннями. Отриманні значення додаються у межах заданої довжини, таким чином значення кожного елемента відображає не тільки миттєву зміну, а також залежить від N сусідніх елементів. Далі

відбувається перевірка на наявність артефактів. В основі перевірки використано емпіричне правило чотирьох сигм [78]. Отже, наявність показника, який більший за суму медіанного значення у межах досліджуваного вікна та чотирьох сигм, вказує на артефакт запису, а значить частина запису у цьому місці підлягає заміні та нормалізації. Для цього створюється ітеративна маска для кожної окремої ітерації та оновлюється кумулятивна маска. Останнім кроком ітерації є заміна даних запису із артефактами на середнє значення у вибраному вікні та подальше використання вже цих оновлених даних в наступних ітераціях.

Після завершення всіх ітерацій йде перевірка на сформовану кумулятивну маску, за наявності якої відбувається заміна оригінальних даних з артефактами на усереднене значення у межах заданого вікна для кожної окремої точки у межах всіх знайдених артефактів. Для покращення роботи і елімінації різких змін, кумулятивна маска може бути збільшена із країв на певне, задане глобальними налаштуваннями число, яке додає певну кількість записів по обидві сторони від знайденого артефакту.

На цьому етапі також зберігаються показники максимального і мінімального значень для кожного запису, що важливо для визначення такого показника, як девіація калібрування реєструючого приладу. Корегування результатів відповідно до цих показників дає змогу збільшити точність отриманих даних.

Останнім етапом підготовки є опрацювання вхідних даних відповідно до вже збережених у пам'яті міток часу кожного проведеного дослідження у межах кожного окремого запису – сегментація записів. Автоматизація цієї громіздкої роботи не тільки зменшує ризик внесення помилки у дані, а також суттєво економить час.

Результатом підготовки даних є сформований масив значень, очищений від неекспериментальних даних та артефактів, а також кластеризований, відповідно до протоколу проведеного дослідження.

3.1.1.3. Очищення записів від шумів

Наступним обов'язковим кроком алгоритму є очищення записів від шумів (рис. 3.5). Залежно від характеристик запису, цей процес може бути використаним чи пропущеним, що повинно задаватись глобальними параметрами кожного окремого експерименту.

Шумами у записах вважається такі зміни в отриманому сигналі, які є повністю випадковими за своєю природою. На відміну від артефактів, вони мають незначний вплив на форму сигналу, проте можуть впливати на точність результату і є одними з ключових причин розбіжностей під час ручного опрацювання полярографічних записів різними дослідниками.

Весь алгоритм очищення даних від шумів можна поділити на три етапи: пошук ритмічних коливань сигналу, підготовка до аналізу і, зокрема, аналіз та модифікація даних.

Ритмічні коливання, або осциляції, є одним видів шуму, який спотворює реєстрований сигнал. Причини реєстрації такого шуму залежать від реєструючого приладу, властивостей досліджуваного зразка та середовища в лабораторії, де виконується дослідження. Зокрема, у полярографічних дослідженнях недосконалість електрода чи неоднорідність електроліту, а також незначні коливання температури внаслідок роботи системи нагріву середовища будуть спричиняти такі шуми. Також у дослідженнях швидкості клітинного дихання, неоднорідність досліджуваного зразка, його нерівномірне розміщення, нерівномірне перемішування, навіть швидкість перемішування створюють ритмічні зміни у записі даних, які до того ж корелюють із власне швидкістю зміни досліджуваного показника. І, звичайно, неможливо врахувати всі потенційні впливи зовнішнього середовища у лабораторії.



Рис. 3.5. Блок-схема алгоритму очищення даних від шумів

Для вилучення осциляції спочатку будується періодограма на основі записаних даних. Вона дає змогу отримати і визначити домінуючі коливання. Серед знайдених даних, згідно глобальних параметрів, виокремлюється група, у межах якої визначається домінуюче коливання, яке найбільше спотворює корисний сигнал.

Наступним етапом є підготовка до аналізу, яка передбачає один крок у вигляді поділу запису на фрагменти. На цьому етапі важливо розділити складні і прості записи, для виключення можливості коригування місця переходу між такими записами у випадку фальшиво-позитивного розпізнавання їх як шумів.

Останнім етапом є аналіз та модифікація даних. Першим кроком є розрахунок оптимального вікна аналізу, залежно від наявності домінуючої осциляції. Далі, у межах розрахованого вікна, визнається локальна поліноміальна регресія. Як результат, з використанням коефіцієнтів апроксимованого поліному вікна виконується регенерація даних. Таким чином елімінуються як ритмічні (осциляції), так і випадкові шуми.

3.1.1.4. Човниковий алгоритм визначення швидкості дихання

Човниковий алгоритм є одним із двох доступних алгоритмів для визначення швидкості зміни показника запису. Згідно глобальних налаштувань задається виконання будь-якого із доступних алгоритмів, що дає змогу отримати потрібний результат у межах певних конкретних записів.

В основі цього алгоритму (рис. 3.6) покладено послідовний двокомпонентний пошук лінійної ділянки у межах заданого запису. Першим компонентом є пошук лінійної ділянки від певної опорної координати. Це визначає основний відрізок, на основі якого другий компонент визначає залишкову частину із протилежної сторони від опорної точки. Таким чином знайдені координати початку і кінця потрібної ділянки характеризуються лінійністю на всій довжині і можуть бути використані для побудови поліному першого порядку, перший коефіцієнт якого і є швидкістю зміни показника у часі.

Перевагою такого методу є можливість швидко і відтворювано знаходити однорідні лінійні ділянки максимальної довжини, які і становлять основний інтерес у визначенні максимальної чи мінімальної швидкості зміни показника. Довжина запису не впливає на точність. Що важливо, порівнюючи із ручним пошуком і обчисленням швидкості, отримуємо більш точніше обчислення початку і кінця, що дає змогу отримати менше фальшиво позитивних результатів у тих випадках, коли коротка лінійна ділянка не є реальним відображенням запису, а його артефактом. Визначення максимально довгої ділянки мінімізує цю проблему, а отримані результати є точнішими.

Першим етапом човникового алгоритму є актуалізація ROI (рис. 3.7). Цей етап є окремою функцією і виконується для оптимізації використання обчислювальних ресурсів, а також виключає завідома непотрібні розрахунки.



Рис. 3.6. Блок-схема човникового алгоритму

Ключова умова запуску цієї функції – це відповідність завданню, характеристикам запису та загальній довжині. Функція буде виконуватись лише тоді, коли на досліджуваному записі шукаємо максимальну або мінімальну швидкість, а також коли він має більшу довжину за певний ліміт, який задається глобальними параметрами, або ж є складним по замовчуванню. Складним вважається запис, який містить два і більше компонентів, зокрема максимальну швидкість на початку запису та мінімальну в кінці. Такі складні записи

характерні, наприклад, для стимуляції дихання мітохондрій печінки щурів за допомогою АДФ у концентрації 100 мкмоль/л. Варто зазначити, що у цих же дослідженнях запис триває значно більше часу, ніж у інших, згаданих у цій роботі, дослідженнях.



Рис. 3.7. Блок схема алгоритму актуалізації ROI

За відповідності запису вищезгаданим умовам запис поділяється на детерміноване число частин – фракцій. У межах кожної фракції визначається швидкість зміни записаного показника. Після цього визначається 4 найбільші або найменші швидкості, залежно від завдання. У такій вибірці додатково проводять вилучення елементів, значення яких значно відрізняється від решти групи. Тоді з крайніх елементів групи визначаються нові координати початку і кінця запису,

і зрештою кінцевим результатом функції є скорочений запис у межах цих нових координат.

Після актуалізації ROI розраховується N значень опорних координат. Цей розрахунок передбачає поділ запису на N рівнозначних ділянок, краї яких і є опорними координатами. Далі для кожної з опорних координат розраховуються межі з використанням комбінації двох функцій – пошуку наступної лінійної ділянки та пошуку попередньої лінійної ділянки (рис. 3.8).

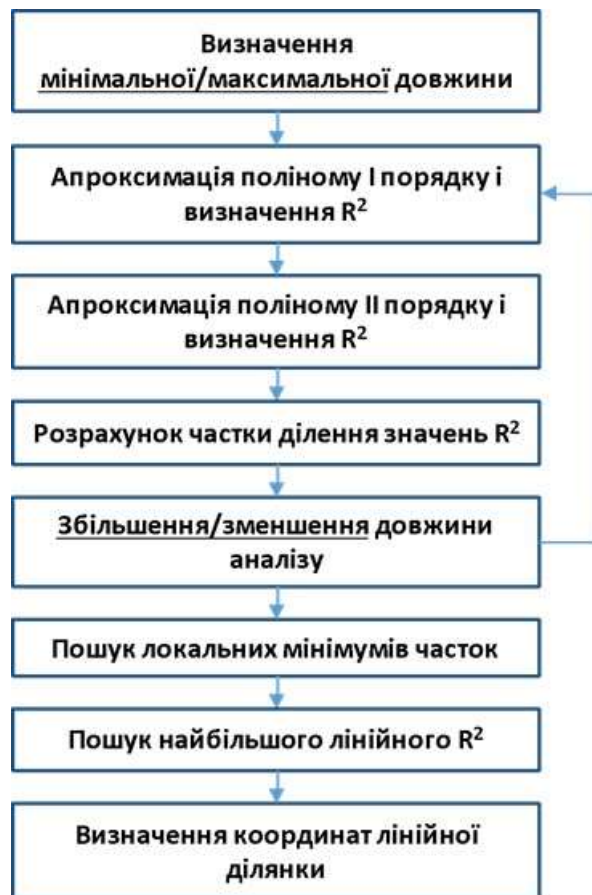


Рис. 3.8. Блок-схема алгоритму пошуку наступної / попередньої лінійної ділянки

Функції пошуку наступної чи попередньої лінійної ділянки є подібними, відрізняються тільки напрямком розрахунку та обмеженнями по довжині. Першим кроком є визначення мінімальної чи максимальної довжини для функцій пошуку наступної чи попередньої лінійної ділянки відповідно. Ліміт

довжини є глобальним параметром і задається конфігурацією алгоритму. Відповідно до заданих лімітів, запускається цикл розрахунків характеристики лінійності кожного потенційного відрізка у межах досліджуваної ділянки. Так для кожного відрізка апроксимується поліном першого порядку і визначається значення коефіцієнту детермінації R^2 на основі регенованих даних, згідно отриманих коефіцієнтів полінома. Після цього апроксимується поліном другого порядку та визначається аналогічне значення R^2 . На основі отриманих даних розраховується частка від ділення значень R^2 лінійного поліному до значень R^2 поліному 2-го порядку, яка вказує на подібність складного поліному другого порядку до лінійного поліному першого порядку тієї ж послідовності записів, а значить – лінійність досліджуваної ділянки. Останнім кроком у циклі є збільшення або зменшення довжини досліджуваного відрізка і повторення усіх вищезгаданих обчислень.

Отримавши показник лінійності для всіх потенційних ділянок, алгоритм розраховує локальні мінімуми. Отримані координати вказують на ділянки з найкраще апроксимованою лінійністю. Оскільки результат не обмежується однієї координатою, то найкраще рішення визначення із найбільшого значення лінійного R^2 . Визначивши координату кінця або початку, відповідно до завдання, функція повертає координати початку і кінця лінійної ділянки.

Для кожної з опорних координат виконуються дві комбінації. У першій визначається наступна лінійна ділянка з послідовним пошуком попередньої лінійної ділянки. Інша комбінація дзеркальна, тобто спершу визначається попередня лінійна ділянка, а тоді на її основі – наступна. Таким чином одержуємо $2 \times N$ ділянок різної довжини і різної позиції. Для визначення найкращого рішення із отриманих варіантів, розраховуються швидкості зміни показника та значення R^2 кожного із варіантів. Тоді, залежно від завдання, виконується один із трьох шляхів.

Для мінімальної швидкості достатньо знайти лінійну ділянку з найменшою визначеною швидкістю зміни показника. Для максимальної швидкості важливим

залишається врахування найкращої лінійності серед варіантів, а тому отримані показники масштабуються та перемножуються. Значення найбільшого добутку корелює з найкращим рішенням, а тому обирається саме така ділянка. Швидкість найбільшої лінійної ділянки потребує визначення не найбільшої швидкості, а найбільшої довжини ділянки, а тому дані сортуються по значеннях R^2 і ділянка з найбільшим значенням і є найкращим кандидатом на обчислення результату.

Результатом алгоритму може бути як координати лінійних ділянок, так і розрахована швидкість зміни показника.

3.1.1.5. Поліноміальна регресія

Швидшим в отриманні результату, а також простішим є алгоритм із застосуванням поліноміальної моделі цілого запису. В основі такого алгоритму (рис. 3.9) використано визначення миттєвих швидкостей для кожної окремої точки. Такий спосіб не визначає ділянку з найбільшою лінійністю, а результат у вигляді швидкості зміни показника отримується із фіксованої довжини запису.

Першим і важливим етапом цього алгоритму є актуалізація ROI. У зв'язку із детермінованістю довжини запису, на якій ми визначаємо цікавий нам результат, наявність довгих і дуже довгих записів впливає на точність і правдивість отриманих даних. Тому важливо скоротити запис до максимально короткого у межах поставленого завдання. Алгоритм актуалізації ROI повністю співпадає із алгоритмом, описаним для актуалізації ROI човникового алгоритму.

Наступним кроком є апроксимація поліному та формування вибірки із ділянок фіксованої довжини. Порядок поліному та кратність вибірки є глобальними параметрами і задаються відповідно до характеристик проведеного запису. На основі отриманої функції поліному визначається перша похідна, яка характеризує миттєву швидкість у кожній позиції запису. Таким чином отримуємо масив із швидкостями, з якого, відповідно до завдання, визначаємо цікавий у конкретних умовах результат.

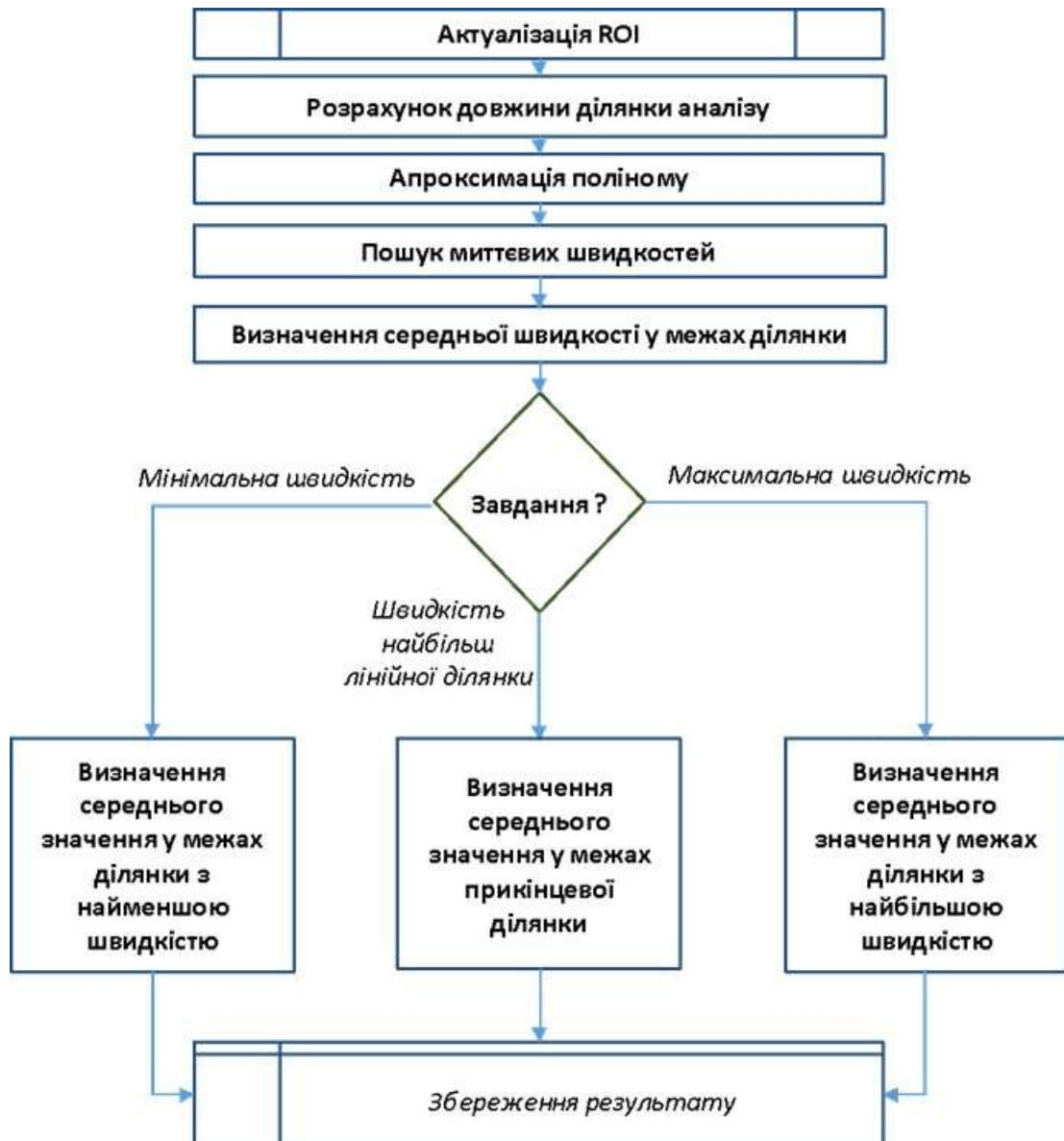


Рис. 3.9. Блок-схема алгоритму поліноміальної регресії

Для визначення мінімальної швидкості знаходимо координату з найменшою миттєвою швидкістю і в межах фіксованої довжини з центром у місці цієї координати розраховуємо середнє значення. Для визначення максимальної швидкості знаходимо аналогічне значення, проте для координати із найбільшою миттєвою швидкістю. Для визначення швидкості найбільш лінійної ділянки визначаємо середнє значення миттєвих швидкостей у межах двох фіксованих довжин запису. Такий розрахунок обумовлений фізіологічними

особливостями досліджуваних процесів, зокрема базального дихання, де стабілізація швидкості дихання реєструється ближче до кінця проведеного запису.

Результатом алгоритму є розрахована швидкість зміни показника.

3.1.1.6. Прикінцеві кроки

Завершенням алгоритму є три основні кроки – застосування коригувань, збереження результату та трансформація його у зручний формат.

На етапі застосування коригувань використовується декілька параметрів, які можуть бути активованими чи деактивованими глобальними параметрами. Перший такий параметр – коригування за дрифтом калібрування електрода. Визначені коефіцієнти девіації на етапі сегментації даних за потреби можуть бути використані для покращення точності розрахунків.

Іншим параметром є коефіцієнт кількості досліджуваного матеріалу. За умови, що у різних дослідженнях у межах одного експерименту було використано різну кількість матеріалу, для зручності і виключення потенційних помилок людини під час ручного перенесення таких коефіцієнтів, було реалізоване автоматичне їх застосування.

Остаточний результат зберігається у зручному для подальшого використання іншим програмних забезпеченням форматі JSON. Потенційно, дані можна формувати чи інтегрувати у різноманітні бази даних, а також автоматизувати подальший аналіз з використанням інших алгоритмів.

Додатково, для зручності огляну даних людиною, формується документ у форматі Microsoft Office Excel, з автоматизованим додаванням основних формул. Зберігання у такому форматі не тільки зручніше за формат JSON, але і дає змогу швидко оцінити попередні результати роботи і за потреби застосувати коригування чи змінити інші глобальні параметри алгоритму в цілому.

3.1.2. Визначення зсуву та дисперсії результатів роботи алгоритму

Для досягнення бажаних результатів роботи алгоритму, під час його написання використовувались датасети із проведених досліджень, а також штучні дані. Датасет штучних даних був генерований програмно на основі відомих швидкостей, із врахуванням властивостей полярограм, а також відомостей про шуми, які накопичились у процесі роботи із результатами лабораторних досліджень. Для визначення ефективності і достовірності алгоритму, на основі наявних даних із попередніх досліджень було сформовано датасет з можливими комбінаціями наявності артефактів, шумів та осциляцій. Результат роботи також порівнювався як із результатами роботи за застосування різних комбінаціями глобальних параметрів, так і з результатами ручного обрахунку чотирьох науковців із різним досвідом роботи із полярограмами.

3.1.2.1. Результати аналізу штучно згенерованих даних

Першою перевіркою роботи було тестування алгоритмів очищення даних та розрахунку швидкості дихання на генерованих даних. Були згенеровані штучні криві двох типів : псевдолінійні (рис. 3.10 А) та складні криві з двох лінійних ділянок (рис. 3.10 Б). До цих кривих було додано різні види шуму: простий випадковий шум з заданою максимальною амплітудою, осциляції з заданою амплітудою та частотою та «складний» шум з тривалими відхиленнями від правдивої кривої. У свою чергу, задана максимальна амплітуда простого шуму була двох рівнів: з амплітудою у розмірі 2,5 раз більшою від реальною середньої швидкості – низький, і у розмірі 10 раз більше – високий. У випадку складного шуму, то за основу була взята середня швидкість між двома компонентами запису з такими ж множниками. Додавання осциляцій було також двох рівнів – з амплітудою від 1,25 до 2,5 раз більшою від реальної середньої швидкості – низькі, або від 5 до 10 раз більшою – високі. «Складні» відхилення були двох рівнів – амплітудою у розмірі або 30% від середньої

швидкості – низькі, або 100% – високі. Відхилення застосовувались у випадкових місцях. Приклади згенерованих даних зображено на рис. 3.10.

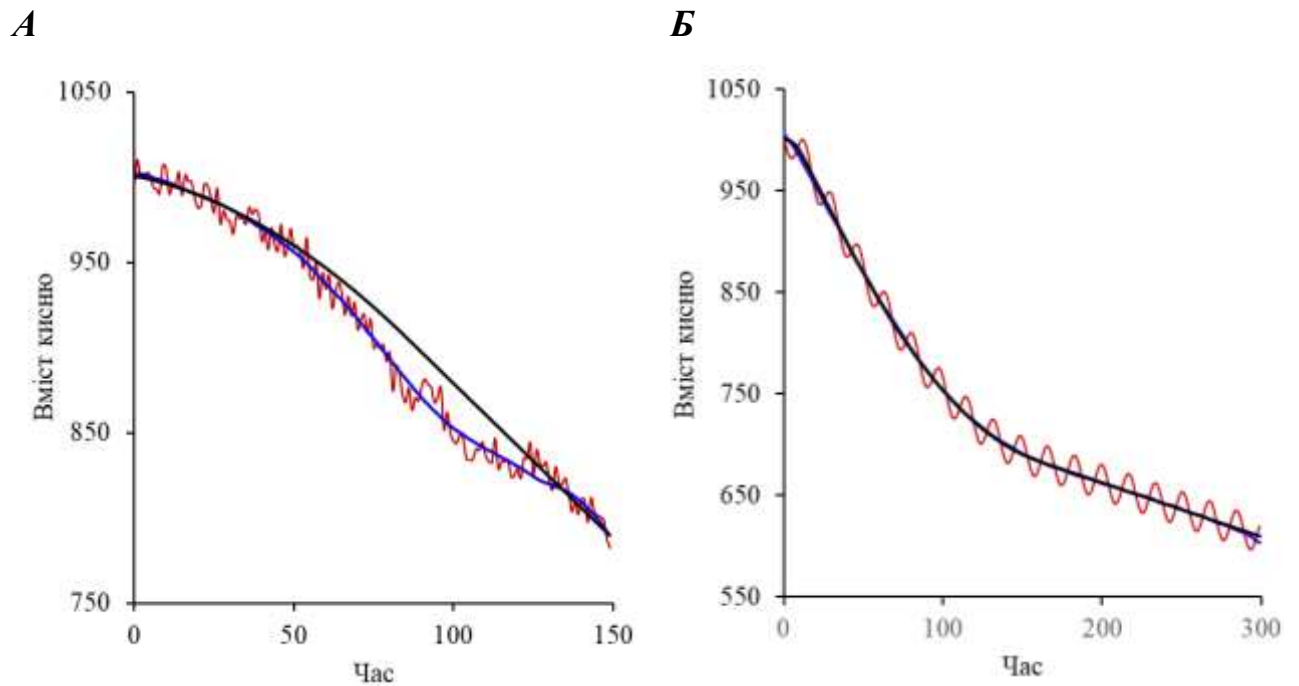


Рис. 3.10. Візуалізація швидкості клітинного дихання на основі згенерованих даних: *А* – крива псевдолінійного типу з високим складним і простим шумом, *Б* – складна крива з двох лінійних ділянок з високою амплітудою осциляцій; чорний – оригінальна крива без шумів, червоний – оригінальна крива з шумами, синій – крива після очистки шумів

Виконання завдання «лінійність» різними алгоритмами було тестовано на згенерованих кривих псевдолінійного типу, а завдання «максимум» та «мінімум» – на складних кривих, які складаються із двох лінійних ділянок. Для кожних експериментальних умов було згенеровано 64 випадкових кривих. У кожному завданні порівнювали точність трьох різних алгоритмів/підходів. У завданні «лінійність» базовим алгоритмом була проста лінійна регресія всього діапазону даних. Для збільшення точності використовували два раніше описані авторські алгоритми – алгоритм поліноміальної регресії та човниковий алгоритм.

Результати тестування представлені у табл. 3.1–3.3. У завданні «лінійність» проста лінійна регресія та алгоритм поліноміальної регресії мали стабільні показники відхилення та варіації, які практично не залежали від наявності шумів різних типів чи застосування алгоритму очистки шуму. Як і очікувалось, алгоритм поліноміальної регресії працював краще, ніж проста лінійна регресія. Точність човникового алгоритму, натомість, залежала як від наявності шумів, так і від їх очистки (табл. 3.1). Загалом, цей алгоритм працював значно краще за інші на чистих даних, даних з осциляціями чи простим шумом, однак його варіабельність значно зростала за появи складних шумів, і не коригувалась застосуванням очистки даних.

Таблиця 3.1

Ефективність різних налаштувань алгоритму на різних датасетах генерованих даних із заданими рівнями шуму (64 датасети для кожного версії) для завдання «лінійність»: МРЕ – середня відсоткова похибка, RMSPE – середня квадратична відсоткова помилка, ЛР – лінійна регресія, ПР – алгоритм поліноміальної регресії, ЧА – човниковий алгоритм, НД – необроблені дані, ОД – очищені від шумів дані

| Рівень шуму | | | Зсув (МРЕ) | | | | | | Дисперсія (RMSPE) | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|------------|-------|------|------|--------------|--------------|-------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|
| | | | ЛР | | ПР | | ЧА | | ЛР | | ПР | | ЧА | |
| Простий | Осциляції | Складний | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД |
| - | - | - | -15.7 | -15.8 | 7.16 | 7.18 | -0.30 | 0.36 | 17.0 | 17.0 | 7.44 | 7.46 | 0.85 | 0.49 |
| Низький | - | - | -15.3 | -15.4 | 7.11 | 7.14 | -0.79 | -1.00 | 16.4 | 16.5 | 7.42 | 7.46 | 2.19 | 5.09 |
| Високий | - | - | -15.9 | -15.9 | 6.88 | 6.88 | -4.05 | -3.85 | 17.1 | 17.1 | 7.36 | 7.42 | 8.98 | 10.8 |
| - | Низький | - | -15.9 | -16.0 | 7.47 | 7.55 | -1.53 | -1.30 | 17.1 | 17.1 | 7.75 | 7.84 | 3.98 | 4.08 |
| - | Високий | - | -15.7 | -15.8 | 7.99 | 8.30 | -3.43 | -2.25 | 16.9 | 16.9 | 8.29 | 8.65 | 8.98 | 6.73 |
| Високий | - | Низький | -15.9 | -15.9 | 4.87 | 4.97 | -3.29 | -1.67 | 17.0 | 17.0 | 6.20 | 6.20 | 9.36 | 9.96 |
| Високий | - | Високий | -16.8 | -16.8 | 3.70 | 3.59 | 4.59 | 1.30 | 18.2 | 18.2 | 8.81 | 8.62 | 21.5 | 24.3 |

У завданнях «максимум» та «мінімум» алгоритм поліноміальної регресії був найменш чутливим до шумів, а очистка даних суттєво покращувала алгоритми лінійної регресії та човниковий алгоритм (табл. 3.2 і 3.3). Слід зауважити, що на даних без шумів, або на очищених від простих чи

осциляторних шумів кривих зазвичай найточнішим був човниковий алгоритм. Однак поява складних шумів суттєво погіршувала роботу всіх алгоритмів, хоча найменш вона впливала на алгоритм поліноміальної регресії. У завданні «мінімум» рівень помилок був значно вищим, ніж у інших завданнях. Це було пов'язано із способом генерування шуму, амплітуда якого була прив'язаною до середньої швидкості двокомпонентної кривої. Оскільки співвідношення сигнал/шум на повільній ділянці було в 4–8 разів нижчим, ніж на швидкій ділянці, зниження точності алгоритмів було очікуваним.

Таблиця 3.2

Ефективність різних налаштувань алгоритму на різних датасетах генерованих даних із заданими рівнями шуму (64 датасети для кожного версії) для завдання «максимум»: МРЕ – середня відсоткова похибка, RMSPE – середня квадратична відсоткова помилка, ЛР – лінійна регресія, ПР – алгоритм поліноміальної регресії, ЧА – човниковий алгоритм, НД – необроблені дані, ОД – очищені від шумів дані

| Рівень шуму | | | Зсув (MPE) | | | | | | Дисперсія (RMSPE) | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|--------------|-------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------------|------|------|-------------|-------------|-------------|
| | | | ЛР | | ПР | | ЧА | | ЛР | | ПР | | ЧА | |
| Простий | Осциляції | Складний | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД |
| - | - | - | -0.86 | -2.98 | -2.25 | -3.81 | 0.04 | -2.41 | 1.93 | 3.83 | 3.79 | 4.46 | 0.07 | 3.43 |
| Низький | - | - | -0.24 | -1.51 | -2.31 | -2.77 | 0.59 | -0.40 | 2.64 | 3.32 | 4.02 | 3.91 | 1.79 | 2.25 |
| Високий | - | - | 1.41 | -0.98 | -2.17 | -2.47 | 8.78 | -0.09 | 7.02 | 3.07 | 3.93 | 3.76 | 15.9 | 2.80 |
| - | Низький | - | -0.12 | -1.71 | -2.45 | -3.01 | 2.79 | -1.00 | 2.35 | 3.53 | 4.10 | 4.23 | 5.53 | 2.68 |
| - | Високий | - | 0.20 | -2.28 | -2.66 | -3.74 | 21.7 | -1.39 | 7.79 | 4.23 | 4.77 | 5.13 | 31.6 | 3.51 |
| Високий | - | Низький | 7.84 | 1.16 | -0.71 | -1.06 | 10.6 | 1.59 | 14.7 | 7.11 | 9.82 | 6.31 | 19.0 | 7.74 |
| Високий | - | Високий | 36.4 | 14.3 | 6.32 | 3.48 | 26.9 | 5.61 | 53.2 | 24.4 | 22.0 | 15.5 | 53.0 | 20.1 |

Отже, можна зробити висновок, що човниковий алгоритм дуже добре працює на чистих та добре очищених даних. Однак у випадках, коли алгоритм очистки вже не може повністю відновити оригінальний запис, більш точним і надійним є алгоритм поліноміальної регресії. У подальшому ми порівнювали точність алгоритмів човникового та поліноміальної регресії на справжніх експериментальних даних.

Таблиця 3.3

Ефективність різних налаштувань алгоритму на різних датасетах генерованих даних із заданими рівнями шуму (64 датасети для кожного версії) для завдання «мінімум»: МРЕ – середня відсоткова похибка, RMSPE – середня квадратична відсоткова помилка, ЛР – лінійна регресія, ПР – алгоритм поліноміальної регресії, ЧА – човниковий алгоритм, НД – необроблені дані, ОД – очищені від шумів дані

| Рівень шуму | | | Зсув (МРЕ) | | | | | | Дисперсія (RMSPE) | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|------------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|-------------------|------|-------------|-------------|-------------|------|
| | | | ЛР | | ПР | | ЧА | | ЛР | | ПР | | ЧА | |
| Простий | Осциляції | Складний | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД | НД | ОД |
| - | - | - | -0.14 | -6.19 | 0.00 | -3.15 | -0.13 | -6.90 | 0.22 | 7.03 | 0.74 | 4.68 | 0.21 | 8.06 |
| Низький | - | - | -7.84 | -6.98 | -1.21 | -3.48 | -3.07 | -4.34 | 12.0 | 7.85 | 3.11 | 6.00 | 8.94 | 11.2 |
| Високий | - | - | -26.7 | -7.76 | -4.28 | -2.95 | -8.90 | -2.85 | 38.4 | 10.2 | 11.7 | 7.62 | 57.6 | 13.4 |
| - | Низький | - | -7.59 | -6.24 | -0.72 | -3.12 | -13.9 | -3.52 | 9.69 | 7.03 | 1.75 | 4.45 | 32.0 | 8.41 |
| - | Високий | - | -35.7 | -6.05 | -4.11 | -3.06 | -57.1 | -3.08 | 45.6 | 6.95 | 7.70 | 4.56 | 138 | 8.94 |
| Високий | - | Низький | -82.0 | -31.7 | -31.7 | -19.5 | -30.9 | -21.8 | 113 | 48.5 | 62.4 | 36.1 | 98.6 | 47.5 |
| Високий | - | Високий | -224 | -96.3 | -102 | -64.4 | -167 | -60.0 | 334 | 148 | 203 | 115 | 453 | 154 |

3.1.2.2. Тестування алгоритмів на справжніх даних

Для перевірки, як працює алгоритм обробки полярографічних записів у порівнянні з людиною, проаналізовано набір даних із експериментів на ізольованих панкреатичних ацинусах та ізольованих мітохондріях печінки. Кожен експеримент було проведено у двох паралелях. Усі експериментальні записи було проаналізовано на наявність осциляцій, як раніше описано у частині алгоритму очистки даних. Також для кожного запису було визначено рівень шуму за середнім показником значень R^2 набору локальної лінійної регресії усіх точок запису в межах вікна 30 точок. Встановлено, що медіана значення R^2 була близькою 0,94 для записів дихання мітохондрій печінки та 0,95 для панкреатичних ацинусів. Відповідно, дані з значенням нижче медіани R^2 вважали «шумними». Для аналізу було вибрано пари записів (згідно паралелей

дослідження), що були подібними за рівнем шуму та наявністю осциляцій. Тобто, було сформовано по 3 групи даних для мітохондрій та ацинусів:

- записи з низьким рівнем шуму;
- записи з осциляціями;
- записи з високим рівнем шуму без осциляцій.

Кількість записів у кожній групі становила 4–6 пар, кожен із записів містив 5 (панкреатичні ацинуси) або 5–6 (мітохондрії печінки) різних ділянок для обчислення швидкості дихання відповідно до доданих речовин у процесі експерименту.

У дослідженні взяли участь 4 експерти для аналізу записів і розрахунку швидкостей дихання за допомогою програми Microsoft Excel з використанням лінійної регресії. Експертам було поставлено два завдання. Згідно першого завдання (завдання «максимум»), на ділянках записів, коли діяли речовини, що стимулюють дихання (АДФ, FCCP), необхідно знайти максимально досягнуту швидкість на діапазоні не менше 30 точок (15 с). У другому завданні (завдання «лінійність»), на всіх інших ділянках записів потрібно вибрати найбільш лінійні ділянки та знайти на них швидкість споживання кисню.

Виявлено, що коефіцієнт внутрішньокласової кореляції між результатами різних експертів був високим, проте залежав як від типу завдання, так і від наявності шумів чи осциляцій на записах (табл. 3.4). У завданні «максимум» на записах дихання мітохондрій печінки було досягнуто найвищого коефіцієнту – 0,988 (для всіх даних). Наявність осциляцій не впливала негативно на кореляцію, проте шуми суттєво знижували коефіцієнти у всіх завданнях. Це вказує на те, що за наявності шумів експертні оцінки швидкості дихання більше відрізнялись між собою, чого і слід було очікувати.

Оскільки справжня швидкість дихання нам невідома, а кожна оцінка експерта чи алгоритму є лише апроксимацією, ми оцінювали точність кожного експерта та алгоритму за коефіцієнтом внутрішньокласової кореляції між двома паралелями у кожному експерименті. Теоретично, якщо паралелі були б ідентичними, наближення коефіцієнту до одиниці вказувало б на низьку

варіативність оцінювача (дисперсію), але ніяк не характеризує середнє відхилення його оцінок від реального значення (зсув). Оскільки паралельні експерименти ніколи не ідентичні, коефіцієнт внутрішньокласової кореляції ніколи не наближався до одиниці і дуже відрізнявся між групами даних (табл. 3.5 і 3.6).

Таблиця 3.4

Збіжність результатів обрахованих експертами у різних завданнях та з різними типами «шумності» даних. У дужках – кількість проведених розрахунків

| Дані | Підшлункова залоза | | Печінка | |
|----------------|--------------------|-------------|--------------|-------------|
| | «лінійність» | «максимум» | «лінійність» | «максимум» |
| Чисті | 0.961 (48) | 0.957 (192) | 0.965 (80) | 0.990 (128) |
| Із осциляціями | 0.975 (48) | 0.950 (192) | 0.946 (88) | 0.988 (176) |
| Із шумами | 0.916 (32) | 0.913 (120) | 0.875 (96) | 0.943 (192) |
| Всі типи | 0.971 (128) | 0.953 (504) | 0.954 (264) | 0.988 (496) |

Коефіцієнт внутрішньокласової кореляції на даних із аналізу полярограм дихання ацинарних клітин підшлункової залози щурів у всіх чотирьох експертів відрізнявся як у завданні «лінійність», так і у завданні «максимум» (табл. 3.5). Найкращу збіжність результатів між паралелями експерти показали у нешумних чистих даних, коли фактором погіршення результату для завдання «лінійність» стала наявність шумів, а для завдання «максимум» – наявність осциляцій. Варто відзначити суттєву різницю між експертами 1 і 2 та експертами 3 і 4, збіжність результатів яких суттєво відрізняється. Експерти 1 і 2 отримали найменшу збіжність результатів, особливо у завданні «лінійність». У свою чергу, експерт 4 показав найкращий результат серед всіх дослідників. З цього можна зробити висновок, що наявність шуму або осциляцій та особистий підхід під час аналізу таких даних впливають на кінцевий результат визначення показника.

Коефіцієнт внутрішньокласової кореляції у випадку застосування алгоритму поліноміальної регресії показав кращу збіжність даних без застосування очищення від шумів у завданні «лінійність», та із застосуванням очищення – у завданні «максимум» (табл. 3.5). Коли ж застосовувався човниковий

алгоритм, очищення даних покращило збіжність для завдання «максимум» і не мало впливу на результат для завдання «лінійність».

Таблиця 3.5

Збіжність результатів між паралелями досліджень швидкості клітинного дихання ацинарних клітин підшлункової залози, обрахованих експертами та авторськими алгоритмами. ПР – алгоритм поліноміальної регресії з неочищеними даними, ПР-О – алгоритм поліноміальної регресії з очищеними даними, Ч – човниковий алгоритм з неочищеними даними, Ч-О – човниковий алгоритм з очищеними даними, n – число проаналізованих записів

| Завдання | Тип даних (n) | Внутрішньокласова кореляція – між паралелями | | | | | | | | |
|--------------|--------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | Експерти | | | | | Алгоритми | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | Медіана | ПР | ПР-О | Ч | Ч-О |
| «Лінійність» | Чисті (12) | 0.929 | 0.877 | 0.914 | 0.953 | 0.933 | 0.949 | 0.949 | 0.957* | 0.951 |
| | З осциляціями (12) | 0.786 | 0.869 | 0.821 | 0.890 | 0.847 | 0.875 | 0.873 | 0.874 | 0.872 |
| | Шумні (8) | 0.488 | 0.704 | 0.585 | 0.573 | 0.656 | 0.715* | 0.706* | 0.583 | 0.624 |
| | Усі (32) | 0.853 | 0.890 | 0.867 | 0.915 | 0.897 | 0.923* | 0.921* | 0.913 | 0.911 |
| «Максимум» | Чисті (48) | 0.890 | 0.886 | 0.916 | 0.892 | 0.896 | 0.881 | 0.894 | 0.881 | 0.889 |
| | З осциляціями (48) | 0.696 | 0.738 | 0.748 | 0.777 | 0.749 | 0.745 | 0.760 | 0.722 | 0.753 |
| | Шумні (30) | 0.804 | 0.761 | 0.768 | 0.822 | 0.830 | 0.829 | 0.832 | 0.850* | 0.850* |
| | Усі (126) | 0.835 | 0.836 | 0.853 | 0.868 | 0.862 | 0.859 | 0.869* | 0.858 | 0.867* |

Порівнюючи результати аналізу даних експертами та двома авторськими алгоритмами, можемо зробити висновок про покращення збіжності даних і, як наслідок, якості виконаних розрахунків у випадку застосування алгоритмів. Потреба використання додаткового очищення від шумів або конкретного алгоритму залежить від поставленого завдання.

Дещо інші результати отримані в ході визначення коефіцієнта внутрішньокласової кореляції на даних із аналізу полярограм дихання ізольованих мітохондрій клітин печінки щурів (табл. 3.6). Для завдання «лінійність» спостерігався вплив осциляцій на збіжність результатів між паралелями, проте такого впливу не було одержано для завдання «максимум». Також варто відзначити зміну різниці між експертами 1 та 4 – для завдання

«лінійність» експерт 1 показав кращий результат у порівнянні із експертом 4, а для завдання «максимум» – навпаки.

Таблиця 3.6

Збіжність результатів між паралелями досліджень швидкості клітинного дихання ізольованих мітохондрій печінки, обрахованих експертами та авторськими алгоритмами. ПР – алгоритм поліноміальної регресії з неочищеними даними, ПР-О – алгоритм поліноміальної регресії з очищеними даними, Ч – човниковий алгоритм з неочищеними даними, Ч-О – човниковий алгоритм з очищеними даними, n – число проаналізованих записів

| Завдання | Тип даних (n) | Внутрішньокласова кореляція – між паралелями | | | | | | | | |
|--------------|--------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|--------|---------------|---------------|
| | | Експерти | | | | | Алгоритми | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | Медіана | ПР | ПР-О | Ч | Ч-О |
| «Лінійність» | Чисті (20) | 0.884 | 0.970 | 0.956 | 0.943 | 0.964 | 0.980* | 0.979* | 0.981* | 0.987* |
| | З осциляціями (22) | 0.897 | 0.696 | 0.810 | 0.695 | 0.759 | 0.742 | 0.736 | 0.787 | 0.782 |
| | Шумні (24) | 0.824 | 0.790 | 0.807 | 0.820 | 0.831 | 0.820 | 0.828 | 0.878* | 0.885* |
| | Усі (66) | 0.889 | 0.864 | 0.889 | 0.847 | 0.878 | 0.891* | 0.890* | 0.905* | 0.907* |
| «Максимум» | Чисті (32) | 0.898 | 0.916 | 0.932 | 0.921 | 0.923 | 0.946* | 0.941* | 0.962* | 0.937* |
| | З осциляціями (44) | 0.917 | 0.922 | 0.919 | 0.927 | 0.920 | 0.890 | 0.884 | 0.898 | 0.892 |
| | Шумні (48) | 0.937 | 0.969 | 0.967 | 0.970 | 0.968 | 0.960 | 0.959 | 0.953 | 0.962 |
| | Усі (124) | 0.930 | 0.938 | 0.941 | 0.943 | 0.939 | 0.930 | 0.924 | 0.937 | 0.928 |

Особистий підходу до пошуку лінійних ділянок, як і візуальне оцінювання лінійності ділянки у деяких записах мали виражений вплив на отриманий результат. Як зображено на рис. 3.11, місцезнаходження лінійної ділянки було по різному оцінене експертами 1 і 3. А результат обрахунку алгоритмом поліноміальної регресії визначив лінійною ділянкою, яка близька до вибору експертом 1, проте має нижче значення швидкості. Такі явища вказують на суттєвий вплив особистого підходу дослідника на кінцевий результат.

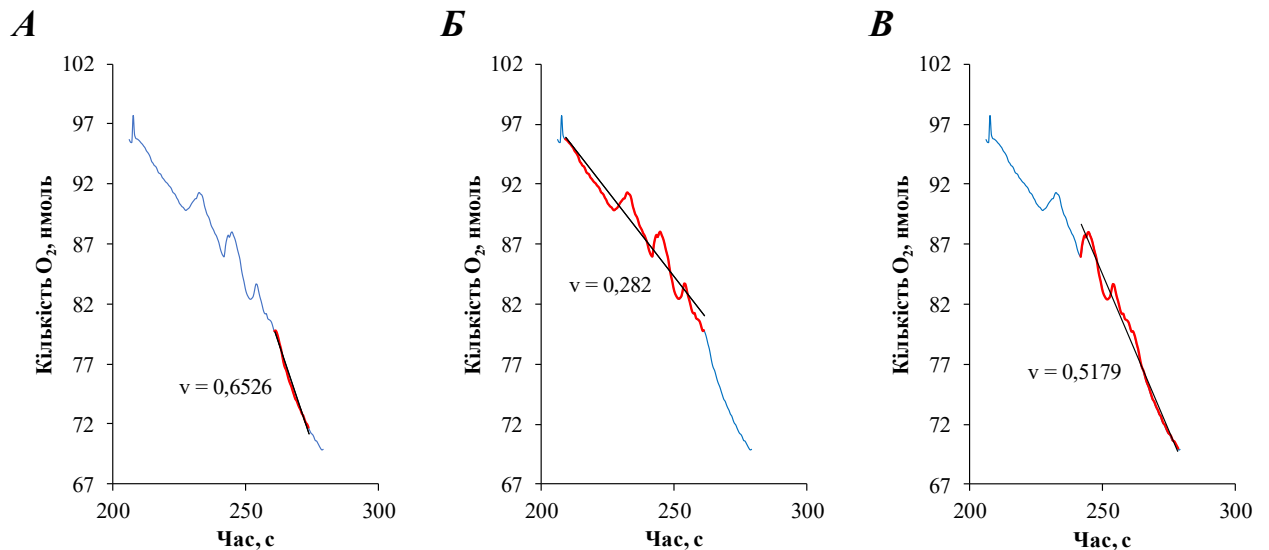


Рис. 3.11. Візуалізація визначених лінійних ділянок полярограми: *A* – експертом 1, *B* – експертом 3, *V* – алгоритмом поліноміальної регресії

У ході аналізу даних із використанням алгоритмів, аналогічно до записів полярограм дихання ацинарних клітин підшлункової залози, спостерігалась вища збіжність, ніж при аналізі, виконаному експертами. Проте для даних записів дихання ізольованих мітохондрій печінки кращу збіжність паралелей показав човниковий алгоритм, незалежно від наявності шумів чи осциляцій.

Отже, можна зробити висновок про вищий показник збіжності, а значить і якості проведених обчислень за використання човникового алгоритму чи алгоритму поліноміальної регресії.

Для оцінки зсуву кожного експерта чи алгоритму, ми знайшли медіану обчислень усіх експертів та порівняли відхилення кожного експерта та алгоритму від неї (рис. 3.12 і 3.13).

Медіанне значення зроблених експертами обчислень швидкості клітинного дихання ацинарних клітин підшлункової залози знаходилось у межах $\pm 20\%$. Проте для експертів 1 і 2 було характерно системне завищення результатів незалежно від завдання, а для експертів 3 і 4 – заниження (рис. 3.12).

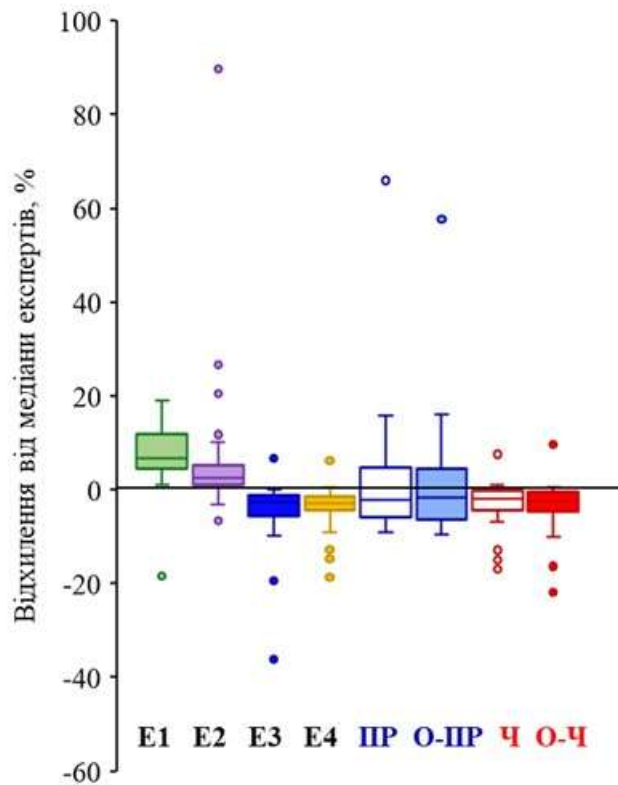
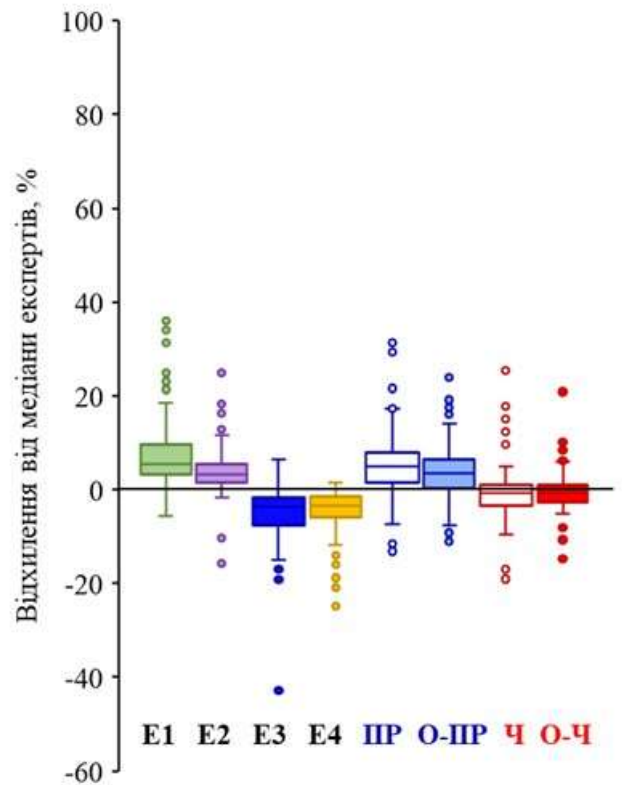
A**Б**

Рис. 3.12. Відхилення оцінок експертів та алгоритмів швидкості дихання ацинусів підшлункової залози: *A* – завдання «лінійність», *Б* – завдання «максимум», E1–E4 – експерти, ПР – поліноміальна регресія, О-ПР – поліноміальна регресія з попередньою очисткою даних, Ч – човниковий алгоритм, О-Ч – човниковий алгоритм з попередньою очисткою даних

Результати обчислень, виконаних із використанням човникового алгоритму та алгоритму поліноміальної регресії заходились у тих самих межах, що і результати експертів. Також спостерігалось заниження результату відносно медіани експертів у випадку завдання «лінійність», коли човниковий алгоритм показав меншу дисперсію. У випадку завдання «максимум» було отримано завищення результату для алгоритму поліноміальної регресії та мінімальна різниця для човникового алгоритму. Така близькість медіани експертів та результатів алгоритмів дає змогу стверджувати про близькість отриманих оцінок швидкостей до реальних їхніх значень.

Медіанне значення зроблених експертами обчислень швидкості дихання ізольованих мітохондрій печінки знаходилось у межах $\pm 35\%$ (рис. 3.13). У завданні «лінійність» медіанне значення експертів 2, 3 і 4 було близьким до середнього значення серед усіх експертів. Тільки результати обчислень зроблених експертом 1 були завищеними. У завданні «максимум» результати були такі – експерти 1 і 2 показали завищення результатів, коли експерти 3 і 4 – заниження.

У свою чергу, результати обчислень, виконані алгоритмами, знаходились у межах середньої медіани усіх експертів, зберігаючи однакову дисперсію у завданні «лінійність» Для завдання «максимум» були отримані аналогічні результати, проте з меншою дисперсією показника. Аналогічно аналізу зсуву для обчислень швидкості клітинного дихання ацинарних клітин підшлункової залози, близькість медіанних значень слугує підтвердженням близькості результату до реальних значень досліджуваних процесів. Окремо варто відзначити наявність суб'єктивного впливу дослідника у виконанні розрахунків експертами і відсутність такої проблеми для алгоритмів.

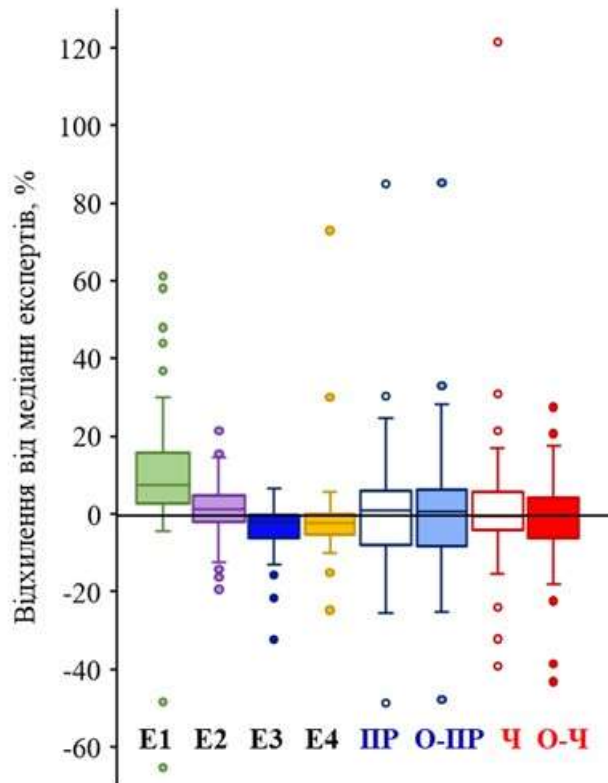
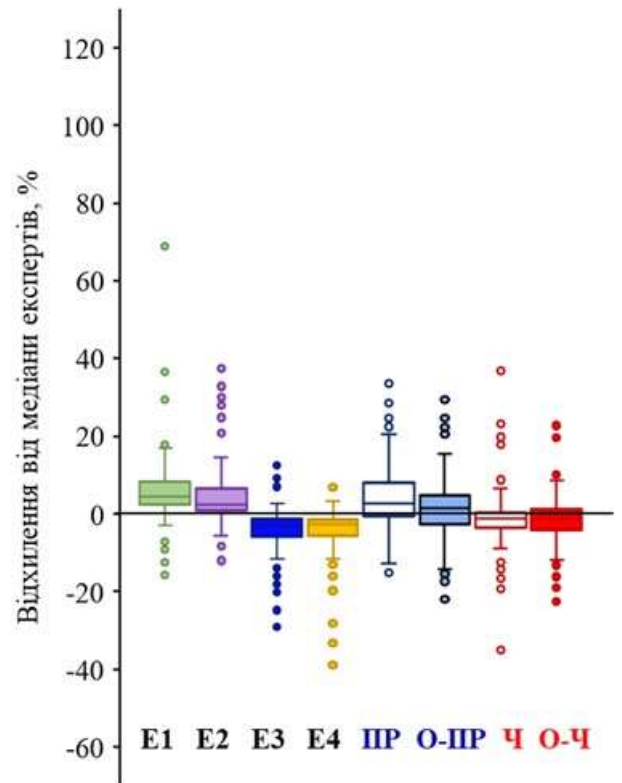
A**Б**

Рис. 3.13. Відхилення оцінок експертів та алгоритмів швидкості дихання мітохондрій печінки: А – завдання «лінійність», Б – завдання «максимум», E1–E4 – експерти, ПР – поліноміальна регресія, О-ПР – поліноміальна регресія з попередньою очисткою даних, Ч – човниковий алгоритм, О-Ч – човниковий алгоритм з попередньою очисткою даних

Підсумки до підрозділу

У результаті проведених досліджень створено автоматизоване програмне рішення авторського алгоритму для аналізу полярографічних записів із автоматичною корекцією артефактів, осциляторних та випадкових шумів та пошуку оптимальних зон для обчислення. Перевірено ефективність цього програмного забезпечення на штучно сформованих даних, а також реальних записах дихання ацинарних клітин підшлункової залози та ізольованих мітохондрій печінки. Його верифікація дає змогу стверджувати, що таке автоматизоване програмне рішення дає змогу суттєво покращити якість і

швидкість проведення обчислень і, основне, усуває суб'єктивний вплив експериментатора та гарантує отримання результату, близького до реальних параметрів, навіть попри наявність шумів різноманітної природи і різного рівня, яких неможливо уникнути у полярографічних дослідженнях біоенергетичних процесів.

Результати дослідження опубліковані в:

1. **Manko V.V.** Automatic analysis of biological suspensions oxygen consumptions signals / Manko V.V., Manko V.O., Vabsky A. // 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, Україна, 26–28 квітня 2023 року) : Збірник тез. – Львів, 2023. – Р. 188–189.

3.2. Залежність роз'єданого дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози від життєздатності клітин

Оцінка життєздатності клітин має вирішальне значення для проведення досліджень на ізольованих клітинах. У пошкоджених або некротичних клітинах спостерігаються порушення метаболізму, трансмембранного транспорту іонів чи фізіологічних реакцій на дію подразників. Показано, що функціональна здатність мітохондрій тісно корелює з цілісністю плазматичної мембрани та загальним станом клітин нирок [12] та кардіоміоцитів [13].

В ацинарних клітинах підшлункової залози гідроген пероксид спричиняє зниження як базального дихання, так і максимальної швидкості роз'єданого дихання, тоді як менадіон підсилює базальне дихання і зменшує максимальну швидкість роз'єданого дихання; обидві сполуки також спричиняють збільшення вивільнення лактатдегідрогенази [79]. Цікаво, що антиоксидант mitoQ також спричиняє значне зниження як роз'єданого дихання, так і цілісності плазматичної мембрани ацинарних клітин підшлункової залози [80]. У багатьох експериментальних умовах пошкодження мітохондрій передують загибелі клітини з ознаками розриву плазматичної мембрани або без них [80, 81, 82]. Зважаючи на це, виникла необхідність розробити нові високочутливі тести життєздатності клітин на основі оцінки функцій мітохондрій. Отже, цим дослідженням ми мали на меті перевірити, чи пов'язаний будь-який аспект адаптаційної здатності мітохондрій ізольованих ацинусів підшлункової залози з якістю зазначених препаратів, як це було визначено методом виключення барвником.

У ході дослідження для забезпечення високої статистичної значущості було використано 74 препарати ізольованих ацинусів підшлункової залози. Щоб зменшити невраховані та суб'єктивні впливи, спочатку було досліджено 59 таких препаратів (експеримент 1), а згодом, через певний тривалий час дослідження були відтворені на ще 15 препаратах (експеримент 2). Життєздатність ацинусів

підшлункової залози оцінювали за допомогою фарбування трипановим синім відразу після процедури виділення. В усіх експериментах життєздатність клітин перевищувала 92 %, але у досліді 2 вона була значно вищою, ніж у досліді 1 (рис. 3.14). Це може вказувати на деяку різницю в техніці ізолювання клітин, складі середовищ або в оцінці кількості життєздатних клітин. Клітини з непошкодженою плазматичною мембраною не фарбуються трипановим синім, тому їх важко підрахувати у великих тривимірних ацинусах під мікроскопом.

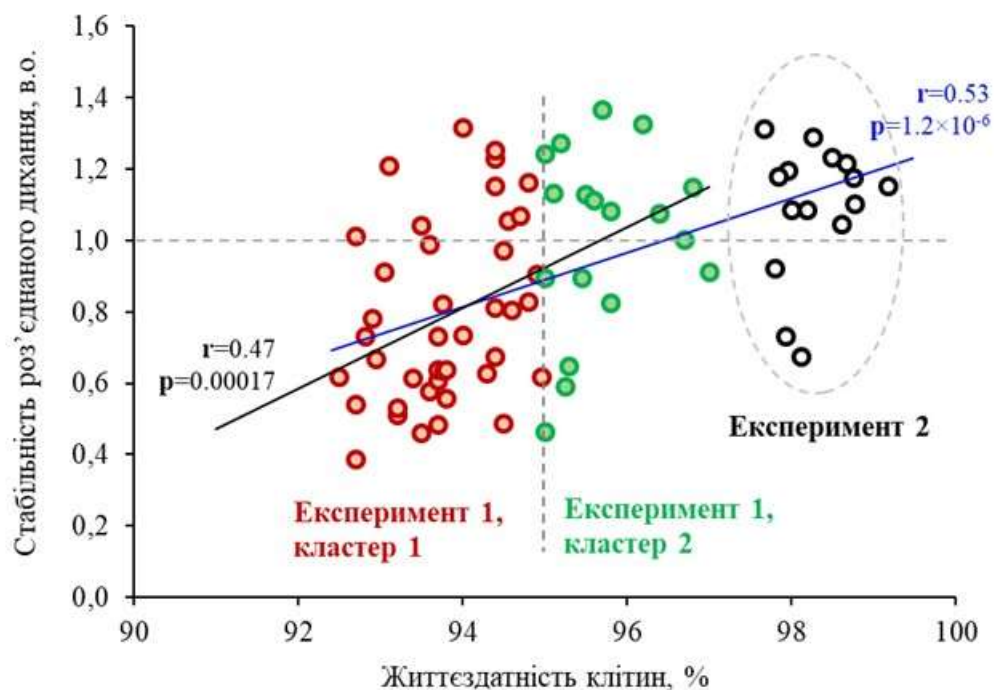


Рис. 3.14. Залежність стабільності роз'єданого дихання ізолюваних ацинусів підшлункової залози від життєздатності клітин: дані експерименту 1 були розділені на кластер 1 – життєздатність клітин нижче 95 % (червоні точки) і кластер 2 – життєздатність клітин понад 95 % (зелені точки); дані експерименту 2 формують кластер 3 з життєздатністю клітин понад 95 % (чорні точки). Чорні та сині лінії є результатами лінійної регресії даних експерименту 1 (чорні) та обох експериментів (сині) з відповідними значеннями r і значеннями p . Кожен експеримент представлено окремою точкою. Експеримент 1 проводили за допомогою біологічного кисневого монітора YSI 5300, тоді як експеримент 2 проводили за допомогою 6-канального кисневого вимірювача SI929

На основі відсічення клітин із життєздатністю 95 % (як типовим показником високоякісного препарату клітин) препарати експерименту 1 були розділені на два кластери (червоні та зелені точки на рис. 3.14).

Базальне дихання щойно виділених ацинусів підшлункової залози реєстрували приблизно протягом 2 хв. Після цього виконували титрування за допомогою аліквот FCCP з кроком 0,5 мкмоль/л (до кінцевих концентрацій 0,5, 1, 1,5 і 2 мкмоль/л, ~2 хв для кожної концентрації; рис. 3.15), щоб досягти максимальної швидкості роз'єданого дихання.

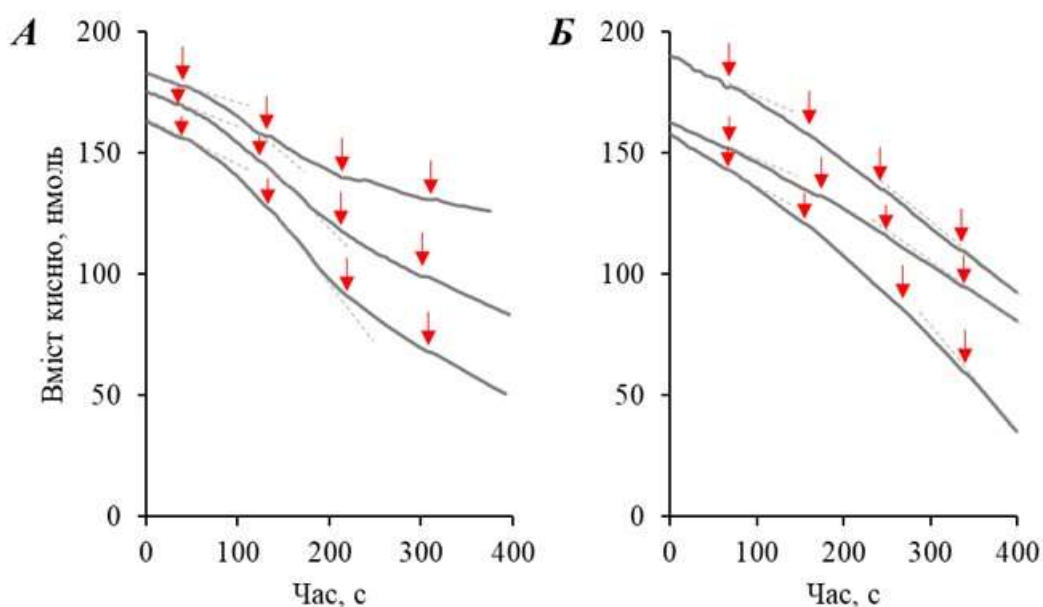


Рис. 3.15. Зменшення вмісту кисню у полярографічній комірці після внесення суспензії ацинусів підшлункової залози: *A*, *B* – різні приклади оригінальних записів дихання, стрілками вказано додавання аліквоти FCCP (з кроком 0,5 мкмоль/л)

Ми відзначили, що кінетика реакцій дихання на FCCP сильно відрізнялася у різних препаратах. У частині дослідів максимальне дихання досягалось вже при 0,5–1 мкмоль/л FCCP; подальше збільшення концентрації протонофору призвело до помітного гальмування швидкості споживання кисню (рис. 3.15 *A*).

В інших випадках швидкість дихання постійно збільшувалася до 1,5–2 мкмоль/л FCCP (рис. 3.15 Б). Були також усі види проміжних кінетичних реакцій.

Щоб описати такі розбіжності в ефектах FCCP, раніше використовувався такий показник, як $[FCCP]_{opt}$ – оптимальну концентрацію FCCP, за якої спостерігалась максимальна швидкість роз'єданого дихання [76]. Однак дискретний характер цього параметра робить статистичний аналіз проблематичним. Крім того, важко встановити оптимальну концентрацію протонофора, коли сусідні значення дихання дуже близькі один до одного. Тому ми розрахували новий параметр – стабільність роз'єданого дихання – співвідношення швидкості дихання за високих і низьких концентраціях FCCP згідно з рівнянням:

$$\text{Стабільність} = \frac{V_{1,5} + V_{2,0}}{V_{0,5} + V_{1,0}},$$

де V – швидкість роз'єданого дихання з індексом концентрації FCCP у мкмоль/л.

Щоб перевірити, чи залежить стабільність роз'єданого дихання від цілісності плазматичної мембрани, ми оцінили її залежність від життєздатності клітин (див. рис. 3.14). Над горизонтальною пунктирною лінією (Стабільність = 1,0) показані експерименти, в яких швидкість дихання продовжувала збільшуватися, коли було додано FCCP до високих концентрацій (1,5–2 мкмоль/л). І навпаки, коли FCCP у високих концентраціях пригнічував дихання, стабільність була нижчою за 1. Очевидно, що більшість точок даних (31 з 41) у кластері 1 експерименту 1 мають значення стабільності нижче 1, чого не можна сказати про кластер 2 (7 з 18) та експеримент 2 (3 із 15) (рис. 3.14). Крім того, спостерігалася значуща помірна позитивна кореляція між стабільністю роз'єданого дихання та кількістю трипаннегативних клітин з $r = 0,53$ для всієї вибірки ($n = 74$, $p = 0,0000012$) і $r = 0,47$ для даних експерименту 1 ($n = 59$, $p = 0,0001728$).

Статистичний аналіз відмінностей між трьома експериментальними кластерами проводився за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим post-hoc тестом Тюрка. Як і очікувалося, частка трипанпозитивних мертвих клітин була значно нижчою в кластері 2 експерименту 1, порівняно з кластером 1, і ще нижчою в експерименті 2 (рис. 3.16 А).

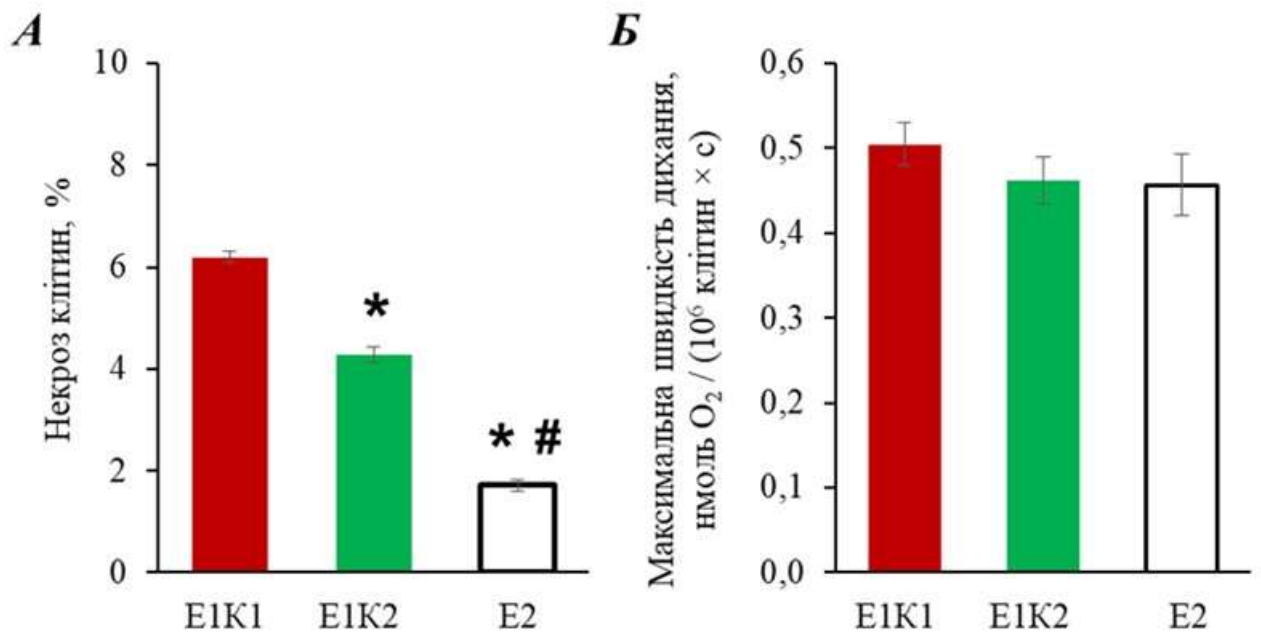


Рис. 3.16. Вплив життєздатності ізольованих ацинусів підшлункової залози на їхнє базальне та роз'єдане дихання: А – різниця некрозу в ацинусах підшлункової залози у трьох групах; Б – максимальне роз'єдане дихання ацинарних клітин; * – достовірна різниця порівняно з E1K1, $P \leq 0,05$, # – достовірна різниця порівняно з E1K2, $P \leq 0,05$, $n = 41$ (E1K1), 18 (E1K2) та 15 (E2), дані представлені як $M \pm m$

Базальна швидкість дихання (без FCCP) і максимальна швидкості роз'єданого дихання залишалися однаковими для всіх груп (рис. 3.16 Б, рис. 3.17). Раніше було показано, що базальна і максимальна швидкості дихання пропорційні життєздатності клітин [79, 12]. Мабуть, незначні відмінності у життєздатності клітин істотно не впливають на параметри дихання. Однак роз'єдане дихання за 2 мкмоль/л FCCP було значно вищим в експерименті 2 порівняно з кластером 1 експерименту 1, що вказує на вищу стабільність

роз'єданого дихання (рис. 3.17). Не було статистичної різниці між швидкістю дихання в експерименті 1, кластері 1 та в експерименті 2, навіть якщо експерименти проводилися у різний час (рис. 3.16 B).

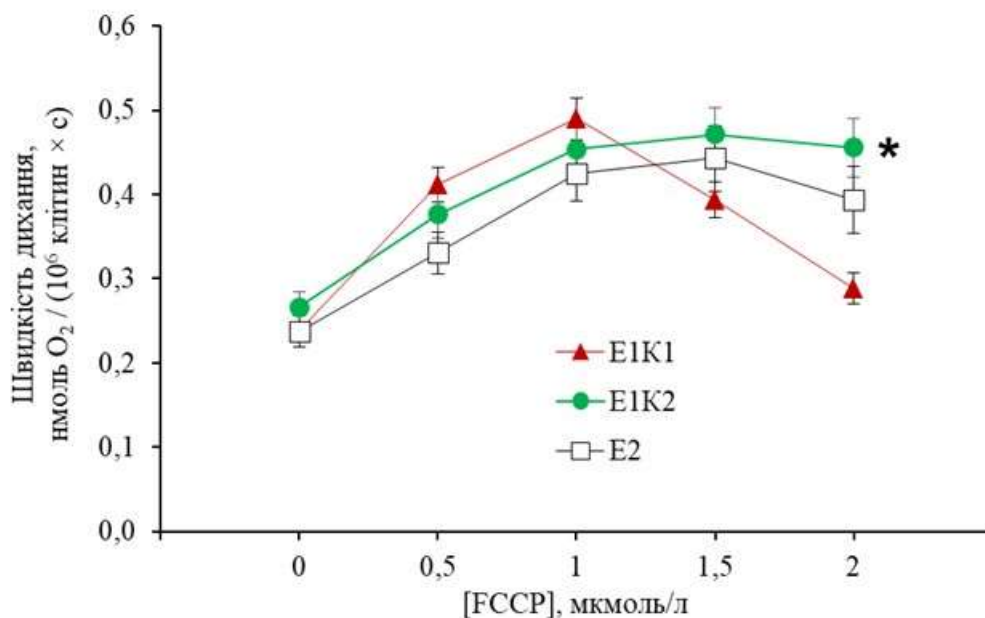


Рис. 3.17. Швидкість дихання ацинусів підшлункової залози в кластері 1 (E1K1) та 2 (E1K2) експерименту 1 та експерименту 2 (E2) після роз'єднання дихання FCCP у зростаючих концентраціях (вісь абсцис показує результуючу концентрацію FCCP у дихальній комірці з поступовим титруванням 0,5 мкмоль/л)

Наше дослідження виявило помітний зв'язок між невеликими відмінностями у життєздатності клітин, яку визначено тестом з використанням трипанового синього, та значним впливом на стабільності роз'єданого дихання. Базальне дихання трипанопозитивних клітин, мембрана яких пермеабілізована дигітоніном [83, 84, 85, 86], або пошкоджена іншим чином [12], зазвичай є нижчим більш ніж у 5 разів порівняно з інтактними клітинами, ймовірно через вихід проміжних метаболітів з цитоплазми. Дихання пермеабілізованих ацинарних клітин підшлункової залози можна відновити додаванням екзогенних субстратів окиснення і АДФ [84, 87]. У нашому експерименті ми досліджували

дихання ацинусів підшлункової залози в позаклітинному середовищі дихання без АДФ або без окисних субстратів циклу трикарбонових кислот. Крім того, висока концентрація Ca^{2+} і NaCl у в позаклітинному середовищі дихання є токсичною для мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози [88, 84]. Через це ми припускаємо, що невелика частка трипанпозитивних некротичних клітин має мінімальний внесок у споживання кисню. Тому стабільність роз'єданого дихання характеризує метаболізм життєздатної популяції трипаннегативних клітин.

Раніше було встановлено, що стабільність роз'єданого дихання в ізольованих ацинусах підшлункової залози залежить від типу окислювального субстрату, доданого до середовища [76]. Швидке зниження роз'єданого дихання можна пояснити обмеженим накопиченням певних субстратів окиснення (таких як сукцинат, α -кетоглутарат і малат) через низьку проникність плазматичної мембрани інтактних ацинарних клітин підшлункової залози [84, 76], Цікаво, що складнофірні форми цих субстратів (таких як монометилсукцинат і диметил- α -кетоглутарат), які можуть проникати через клітинну мембрану, підтримують більш високу стабільність роз'єданого дихання. Таким чином, зниження стабільності роз'єданого дихання в менш життєздатних препаратах ацинусів підшлункової залози, швидше за все, є результатом виснаження внутрішньоклітинних субстратів окиснення, які не можуть бути швидко відновлені лише гліколізом.

Аналіз МТТ (колориметричний аналіз для оцінки метаболічної активності клітин) є концептуально подібним підходом до вивчення метаболічної активності клітини, оскільки він ґрунтується на активності НАДФН-залежних оксидоредуктаз. У людських трофобластоподібних клітинах зниження максимального роз'єданого дихання під дією лінолевої кислоти корелює з результатами тесту МТТ [89]. Однак в астроцитах обробка глутаматом спричинила зниження максимального роз'єданого дихання, але не вплинула на аналіз МТТ [90]. Пряме порівняння чутливості та надійності аналізу

роз'єданого дихання та МТТ є предметом подальших досліджень. Важливим питанням інтерпретації результатів дослідження роз'єданого дихання та інших тестів клітинного метаболізму є те, що зміни метаболічних параметрів часто не пов'язані з життєздатністю клітин. «Підводні камені» аналізу МТТ, пов'язані з використанням інгібіторів метаболізму в експериментах, нещодавно обговорювалися [91]. Подібно, зниження максимальної швидкості роз'єданого дихання в ацинарних клітинах підшлункової залози, за окиснення глутаміну, не супроводжувалося жодними змінами життєздатності клітин [82].

Підсумки до підрозділу

Наші дослідження 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. А звичайна оцінка максимальної швидкості роз'єданого дихання виявляється менш інформативною і недостатньо чутливою для виявлення пошкодження мітохондрій і клітин. 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. Ми пропонуємо використовувати стабільність роз'єданого дихання як новий метаболічний функціональний тест для доповнення існуючих методів оцінки життєздатності клітин.

Результати дослідження опубліковані в:

1. Zub A., **Manko B.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>.

3.3. Життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози та рівень мембранного потенціалу мітохондрій за дії жовчної кислоти TLC-S

Найпоширенішою формою гострого панкреатиту є біліарний панкреатит. Він виникає внаслідок того, що жовчне каміння закупорює сфінктер Одді та призводить до біліарно-панкреатичного рефлюксу [92].

Одним із чинників, який активує патологічні процеси в ацинарних клітинах підшлункової залози, що призводить до розвитку апоптозу чи некрозу, є, очевидно, жовчні кислоти. Встановлено, що жовчна кислота TLC-S (tauroolithocholic acid 3-sulfate, сульфат тауролітохолевої кислоти) вже у концентрації 25 мкмоль/л (за 10 ммоль/л глюкози у позаклітинному середовищі) спричиняє деполяризацію внутрішньої мембрани мітохондрій у значної частини ацинарних клітин підшлункової залози [93]. У концентрації 0,2 ммоль/л TLC-S активує генерацію глобальних кальцієвих хвиль, а також локальні кальцієві сигнали, які локалізовані в ділянці секреторних гранул (в апікальній частині) ацинарних клітин [14]. Це супроводжується зниженням мітохондріального і цитозольного рівня АТФ (за 10 ммоль/л глюкози і 2 ммоль/л пірувату у позаклітинному розчині) [20], що негативно впливає на ацинарні клітини. Іншими дослідниками показано, що TLC-S індукує тривале підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі й матриксі мітохондрій, що призводить до дозозалежного збільшення процесів перекисного окиснення ліпідів, погіршення продукції АТФ, індукує апоптоз і некроз [94].

Точний механізм порушення функціонування мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за дії жовчних кислот ще не встановлений. Мітохондрії можуть використовувати різні субстрати окиснення, частина мітохондріальних ензимів є Ca^{2+} -чутливими, а частина – ні, рівень продуктів перекисного окиснення ліпідів залежить від функціонування різних комплексів електрон-транспортного ланцюга. Те, що ефекти жовчних кислот залежать від субстратів окиснення, постулюється на підставі дослідження залежності

рівня некрозу й АТФ в ацинарних клітинах від наявності у середовищі пірувату (10 ммоль/л) та галактози (10 ммоль/л) [95]. Але як змінюється мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози під впливом жовчних кислот за окиснення різних субстратів, залишається недослідженим.

Відтак, є необхідність протестувати вплив жовчних кислот на виживання ацинарних клітин підшлункової залози і рівень мембранного потенціалу мітохондрій за використання різних субстратів окиснення.

Наявність у середовищі жовчної кислоти TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л за використання як субстрату окиснення глюкози, пірувату чи аланіну суттєво не впливало на частку живих клітин після двох (рис. 3.18 А–Б, рис. 3.19 А) і чотирьох годин інкубації (рис. 3.19 Б).

Коли ж до середовища додавали TLC-S у концентрації 2 ммоль/л, частка живих клітин катастрофічно зменшувалася (рис. 3.18 В, рис. 3.19). Це зменшення трохи залежало від наявного у середовищі субстрату окиснення і було найменш вираженим за окиснення пірувату. Зі збільшенням часу інкубації ступінь виживання клітин був меншим, але така закономірність характерна і для контролю, і для середовища, що містило TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л.

Причиною руйнування клітин за інкубації із TLC-S може бути:

- 1) ушкодження фосфоліпідного матриксу плазматичної мембрани за зміни поверхневого натягу води;
- 2) руйнування внутрішньоклітинних мембран ацинарних клітин, що призводить до порушення внутрішньоклітинної компартменталізації та вивільнення у цитозоль ензимів із лізосом (зокрема, катепсинів) і секреторних везикул;
- 3) зміна функціонування мітохондрій ацинарних клітин.

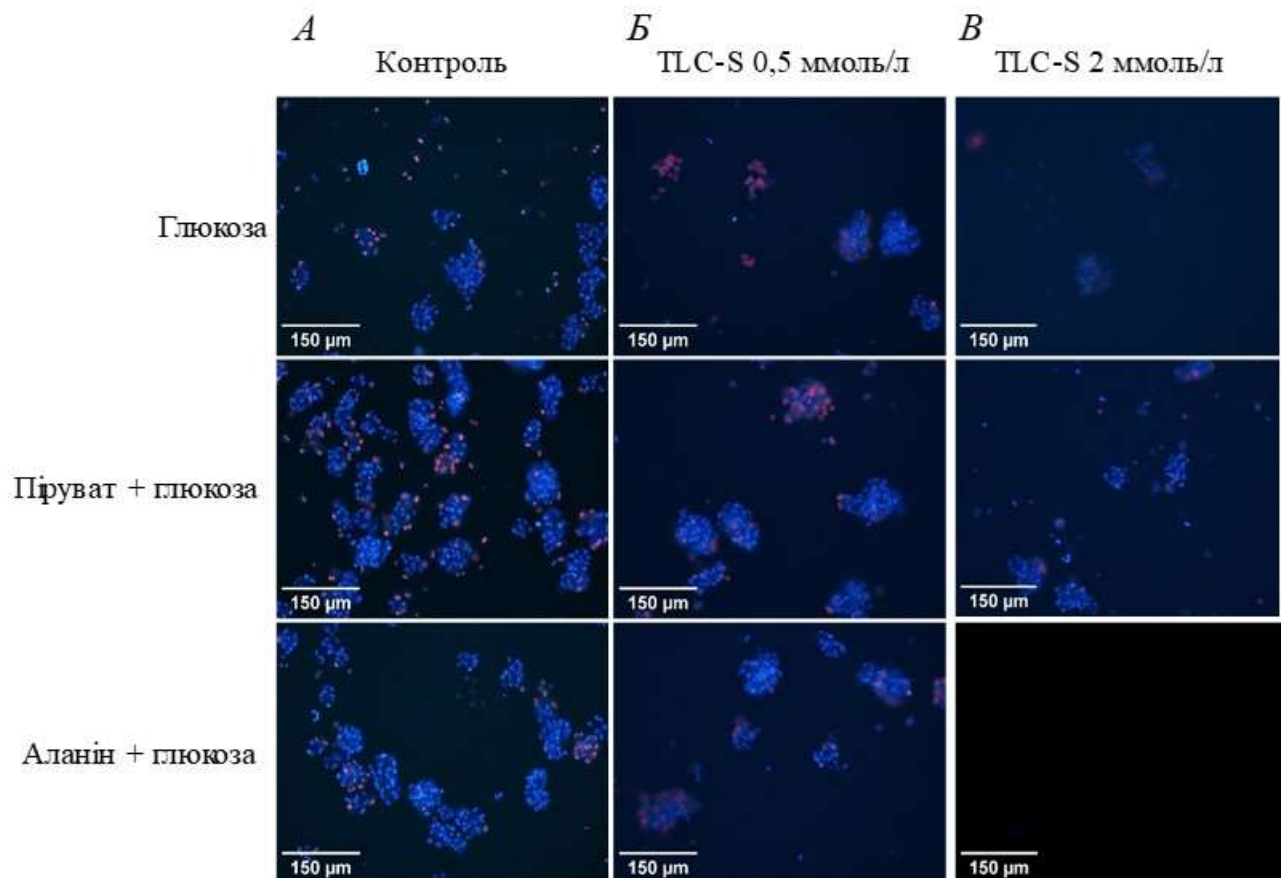


Рис. 3.18. Життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози після інкубації з жовчною кислотою TLC-S; *A–B* – фото клітин однієї серії, зафарбованих пропідій йодидом (0,5 мг/мл) та Hoechst 33342 (5 мг/мл), після преінкубації 2 год із різними субстратами окиснення у контролі (*A*) та з TLC-S у концентрації 0,5 (*Б*) і 2 ммоль/л (*В*); [TLC-S] = 0,5 або 2 ммоль/л, [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [аланін] = 2 ммоль/л

Цілком можливо, що усі наведені механізми ушкодження є взаємозалежними і можуть спостерігатися одночасно, а ефекти TLC-S визначаються, у першу чергу, тривалістю та концентрацією TLC-S.

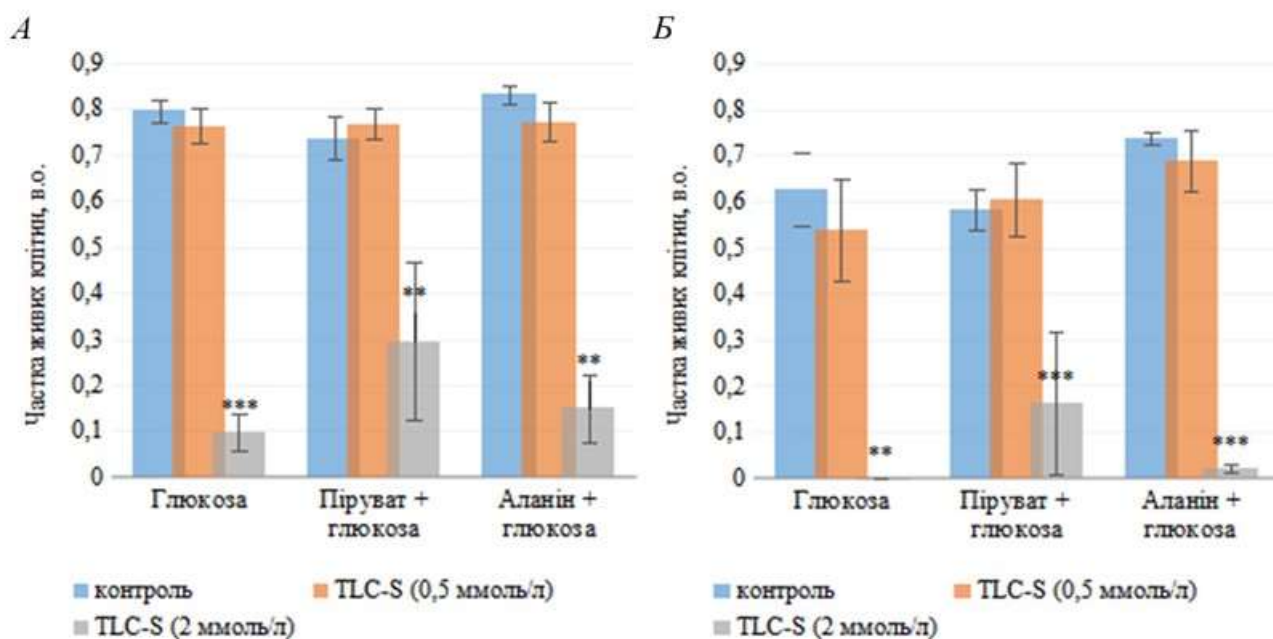


Рис. 3.19. Залежність частки живих клітин від наявності субстратів окиснення і жовчної кислоти після преінкубації 2 (А) або 4 год (Б); [TLC-S] = 0,5 або 2 ммоль/л, [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [аланін] = 2 ммоль/л; за одиницю вимірювання прийнято кількість трипан-негативних ацинарних клітин після виділення; ** – статистично вірогідна різниця щодо контролю за Стьюдентом з $P < 0,01$, *** – з $P < 0,001$; $n = 3-4$

Для того, щоб з'ясувати, чи змінюється функціонування мітохондрій ацинарних клітин, ми дослідили TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л на рівень мембранного потенціалу мітохондрій (рис. 3.20 і рис. 3.21). З'ясувалося, що за дії TLC-S у присутності лише 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) як основний субстрат окиснення, мембранний потенціал мітохондрій під впливом TLC-S вірогідно не змінювався (рис. 3.21).

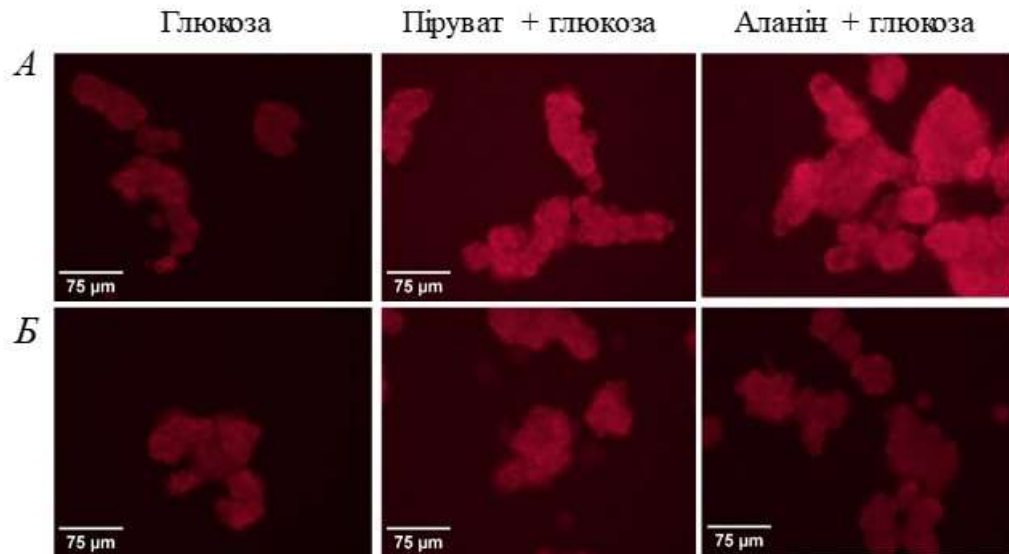


Рис. 3.20. Мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози після інкубації з жовчною кислотою TLC-S; *A* – фото клітин, зафарбованих TMRM (50 нмоль/л), після преінкубації у контролі за наявності у середовищі лише глюкози, глюкози і пірувату чи глюкози і аланіну; *B* – після преінкубації у відповідних середовищах із TLC-S; [TLC-S] = 0,5 ммоль/л, [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [аланін] = 2 ммоль/л

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

Відомо, що у підшлунковій залозі активність аланінамінотрансферази є невисокою [96], але достатньою для підтримання окисних процесів у мітохондріях. Попередніми дослідженнями показано, що такі амінокислоти, як глутамат, глутамін, аланін, лізин і аспартат здатні підтримувати високі швидкості роз'єданого дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів, а аргінін, гістидин і аспарагін – ні [97]. Було також встановлено [98], що ацинарні клітини підшлункової залози мишей віддають перевагу аланіну та лейцину перед глюкозою як субстратами для енергетичного метаболізму. Швидкість окислення глюкози у зразках цієї залози була низькою і лише незначно посилювалася зі збільшенням її концентрації в середовищі від 3 до 20

ммоль/л. Навіть за такої низької концентрації, як 0,1 ммоль/л, обидві амінокислоти окислювалися з більшою швидкістю, ніж глюкоза. Але глюкоза пригнічує як поглинання, так і окислення аланіну екзокринними клітинами [98].

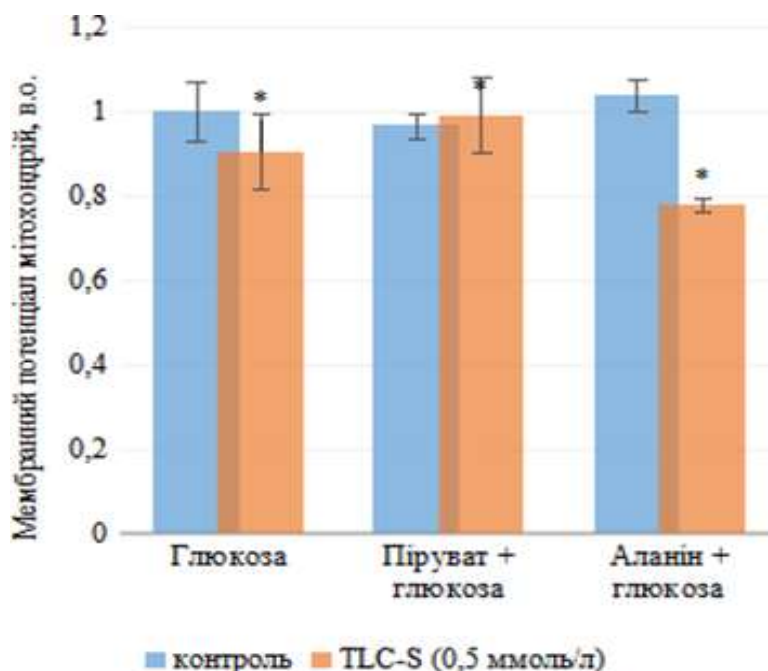


Рис. 3.21. Залежність мембранного потенціалу мітохондрій від складу середовища інкубації у контролі та після додавання жовчної кислоти; час преінкубації 25 хв; [TLC-S] = 0,5 ммоль/л, [глюкоза] = 10 ммоль/л, [піруват] = 2 ммоль/л, [аланін] = 2 ммоль/л; за одиницю вимірювання прийнято максимальне значення інтенсивності яскравості світіння у контрольному зразку; * – статистично вірогідна різниця щодо контролю за Стьюдентом з $P < 0,05$; $n = 3-4$

У наших дослідженнях відносно високий відсоток ацинарних клітин, які вижили після 2 і 4 год інкубації у середовищі, що містило аланін (див. рис. 3.19), є прямим підтвердженням здатності ацинарних клітин використовувати цю амінокислоту в окисних процесах. Цей відсоток залишається високим і після додавання до середовищ інкубації TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л, на відміну від катастрофічного зменшення живих клітин за використання TLC-S у концентрації 2 ммоль/л. Однак мембранний потенціал мітохондрій уже через

25 хв інкубації клітин із TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л суттєво зменшується, коли у середовищі, крім глюкози, є наявний аланін.

Нездатність аланіну за дії TLC-S підтримувати високе значення мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин потрібно окремо обговорити. Особливо, якщо врахувати, що на тлі окиснення пірувату рівень мембранного потенціалу мітохондрій за дії TLC-S не змінюється.

Очевидно, зменшення мембранного потенціалу мітохондрій ацинарних клітин за дії TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л може бути спричинене одним або комбінацією кількох процесів:

- 4) інгібуванням аланінамінотрансферази (АЛТ);
- 5) зменшенням рівня α -кетоглутарату;
- 6) порушенням окиснення глутамату (але не пірувату), що утворюється у реакції трансамінування аланіну.

Наслідком усіх трьох процесів є, власне, порушення окиснення аланіну.

Інші ймовірні механізми зменшення мембранного потенціалу мітохондрій за дії TLC-S у низьких концентраціях (ушкодження внутрішньої мембрани мітохондрій, порушення функціонування електронтранспортного ланцюга мітохондрій чи збільшення рівня перекисного окиснення у мітохондріях) є малоімовірними, оскільки зареєстровані зміни мали би бути однаковими (майже однаковими) за використання різних субстратів окиснення. Нами ж встановлено, що за одночасної наявності у середовищі пірувату і глюкози мембранний потенціал мітохондрій під впливом TLC-S не змінюється.

Підсумки до розділу

Результати дослідження дії TLC-S на ацинарні клітини підшлункової залози дають змогу припустити про наявність кількох різних механізмів негативної дії TLC-S: за низьких концентрацій (або на початкових етапах дії) в її основі лежить порушення реакції трансамінування аланіну, що призводить до

порушення генерації мембранного потенціалу мітохондрій, а за високих – порушення цілісності плазматичної і/чи внутрішньоклітинних мембран.

Результати дослідження опубліковані в:

1. **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>.
2. **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.

3.4. Енергетичне забезпечення екзокринних клітин за короткотривалої дієти з високим вмістом жиру і дієти з високим вмістом жиру і цукру

Нездорове харчування часто є причиною ожиріння, хронічного запалення та порушення обміну речовин у багатьох органах. Складний зв'язок між моделями харчування, метаболічними реакціями та ризиком ожиріння є предметом значного наукового інтересу. Ожиріння є актуальною глобальною проблемою, і розуміння того, як зміни в дієті впливають на метаболізм, має вирішальне значення для з'ясування ширших наслідків для здоров'я. У той час як генетичні фактори, безсумнівно, відіграють певну роль у схильності людини до ожиріння [99, 100], значне зростання населення із зайвою вагою, під час модернізації раніше слаборозвинених країн, підкреслює значний вплив факторів навколишнього середовища. Вважається, що прийняття дієти з високою енергетичною цінністю, високим вмістом жиру, є ключовим фактором цієї тенденції [101]. Залишається незрозумілим, чи є провокуючим фактором лише харчовий жир, чи зміни в метаболізмі.

Існує кілька типів висококалорійних дієт, які вважаються досить ефективними для моделювання ожиріння:

- дієта з високим вмістом жиру (HF),
- дієта з високим вмістом цукру (HS),
- комбінована дієта з високим вмістом жиру та цукру (HFHS).

Вважається, що комбіновані дієти HFHS імітують раціон сучасної людини (багатий жирами та цукрами), тому їх часто використовують для експериментального моделювання ожиріння [102].

Прямий вплив підвищеного споживання жирів або цукру на функції мітохондрій підшлункової залози (як і печінки) недостатньо досліджено. Тому метою експерименту було порівняти функціональну активність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози та печінки щурів за короткотривалої (7

тижнів) дієти з високим вмістом жиру або жиру та цукру.

3.4.1. Маса органів щурів і біохімічні параметри крові за короткотривалих дієт

Короткострокові висококалорійні дієти є цікавими моделями для оцінки адаптаційних можливостей організму, особливо коли ознаки ожиріння або відсутні, або тільки починають проявлятися. Дослідження на щурах показали, що застосування дієти HF спричиняє гіпертрофію адипоцитів, збільшення маси тіла, інсулінорезистентність, порушення метаболізму глюкози, дисліпідемію та стеатоз печінки [103]. Дієти з високим вмістом цукру завдяки смаковим якостям і високій калорійності їжі також сприяють позитивному енергетичному балансу і збільшенню маси тіла. Однак є докази того, що дієти з високим вмістом цукру є менш ефективні, ніж дієти з високим вмістом жиру [103, 5]. Раніше було показано також, що зміни, які спостерігаються у мишей з дієтою HFHS, подібні до змін за дієти HF, включаючи збільшення маси тіла, абдомінального жиру, гіперінсулінемію та гіперглікемію [104].

Нас особливо зацікавило, чи спричиняють дієти HF або HFHS зміни в метаболізмі тварин та функціональній активності мітохондрій. Але насамперед потрібно простежити, чи наявні у таких тварин зміни маси тварин чи біохімічних параметрів крові.

Протягом 7-тижневої дієти ми щоденно під час годування «*ad libitum*» вимірювали масу тіла тварин. З'ясувалося, що статистично вірогідних відмінностей між масою тварин контрольної та експериментальних груп немає (рис. 3.22 А). У контрольних тварин маса тіла на 50 день експерименту становила 347,8 г, у тварин за дієти HF – 346,2 г, а у тварин, які були на дієти HFHS, – 333,6 г. Зважаючи на суперечливі результати в інших аналогічних моделях дієти з високим вмістом жиру [105, 106, 107], відсутність змін у нашому експерименті можна пояснити відносно короткою тривалістю експерименту для використаної модельної породи щурів.

Так само досліджувані дієти не вплинули на масу печінки, яка в середньому становила 3 % від маси тіла у всіх досліджуваних груп тварин (рис. 3.22 В).

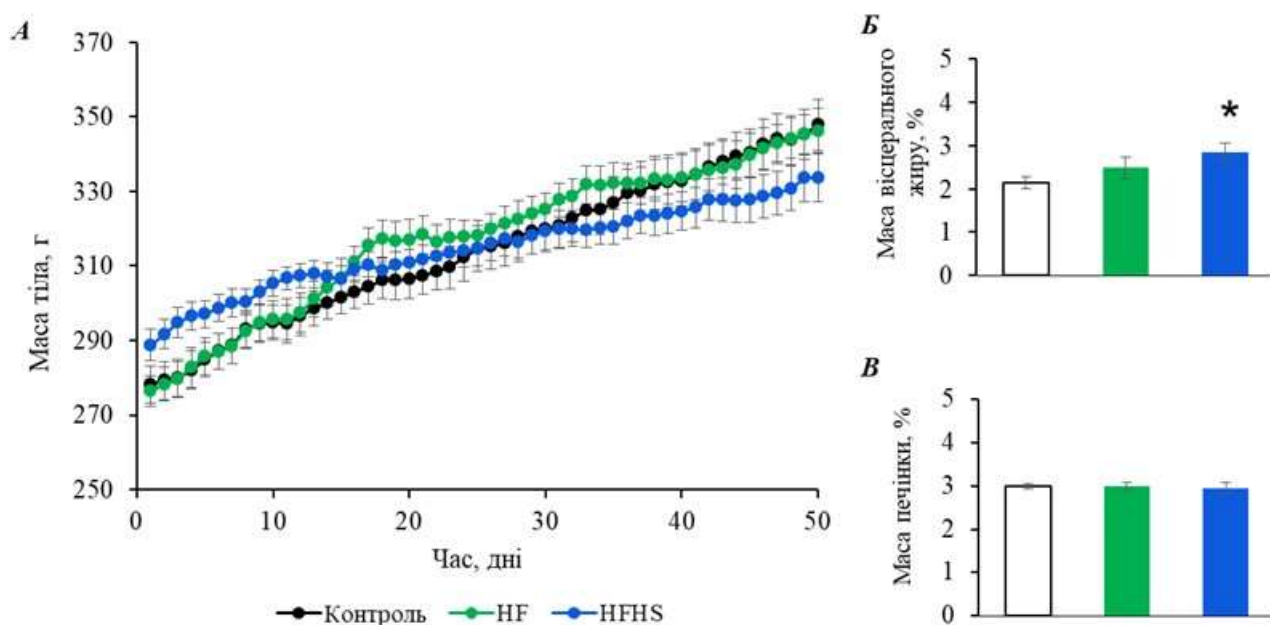


Рис. 3.22. Маса тіла (А), вісцерального жиру (Б) та печінки (В) щурів на базовій (білий колір), HF (зелений колір) або HFHS дієті (синій колір): * – достовірна різниця порівняно з контролем згідно з однофакторним дисперсійним аналізом ANOVA і post-hoc тестом Голм-Бонферроні з $p < 0,05$, $n = 10$

Дещо інші результати дієти було виявлено з кількістю вісцерального жиру. У тварин експериментальної групи з дієтою HFHS маса вісцерального жиру збільшилася на 25 % ($p < 0,05$; тварин за дієти HFHS маса вісцерального жиру становила 2,85 % від маси тіла, а у контролі – 2,14 % від маси тіла). Маса вісцерального жиру у тварин за дієти HF і тварин контрольної групи не відрізнялися (рис. 3.22 Б).

Також ми виміряли зміни загального холестеролу, ліпопротеїнів низької щільності, ліпопротеїнів високої щільності, тригліцеридів і глюкози в плазмі крові на 50 добу експерименту. У тварин на дієтах HF та HFHS загальний рівень

холестеролу статистично достовірно збільшився порівняно з контролем на 20 та 25 % (від $2,93 \pm 0,19$ до $3,51 \pm 0,18$ і $3,66 \pm 0,19$ ммоль/л відповідно; рис. 3.23 *А*; $p < 0,05$, $n = 10$). Це збільшення холестеролу у тварин дослідних груп було помірним, у межах фізіологічної норми, і не пов'язане зі зміною ліпопротеїнів високої чи низької щільності. Рівень ліпопротеїнів високої щільності на 50 день експерименту у контрольних тварин становив $1,67 \pm 0,10$ ммоль/л, у тварин за дієти HF – $1,56 \pm 0,09$ ммоль/л, а у тварин за дієти HFHS – $1,74 \pm 0,27$ ммоль/л (рис. 3.23 *Б*). Рівень ліпопротеїнів низької щільності у контрольних тварин становив $0,76 \pm 0,07$ ммоль/л, у тварин за дієти HF – $0,63 \pm 0,07$ ммоль/л, а у тварин за дієти HFHS – $0,65 \pm 0,10$ ммоль/л (рис. 3.23 *Г*).

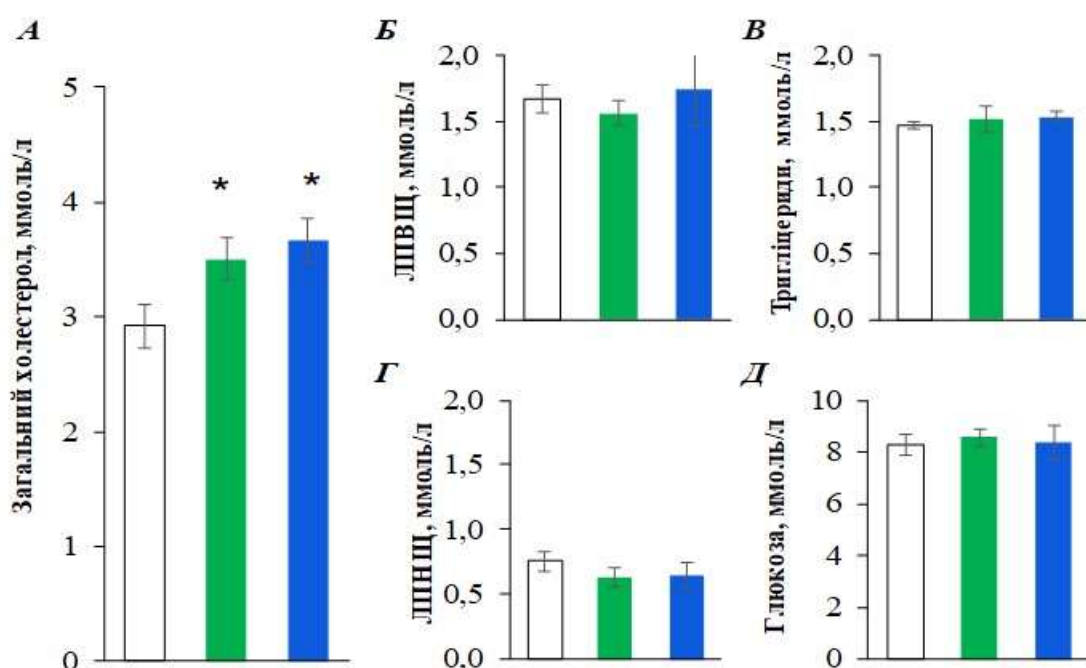


Рис. 3.23. Концентрація в плазмі крові загального холестеролу (*А*), ліпопротеїнів високої (*Б*) і низької (*Г*) щільності, тригліцеридів (*В*) і глюкози (*Д*) у щурів у контролі (білий колір), за дієти HF (зелений колір) або за дієти HFHS (синій колір): * – достовірна різниця порівняно з контролем згідно з однофакторним дисперсійним аналізом ANOVA і post-hoc тестом Голм-Бонферроні з $p < 0,05$, $n = 10$

Рівень тригліцеридів та глюкози у плазмі крові підтримувався на одному рівні у тварин усіх експериментальних груп. Рівень тригліцеридів становив приблизно 1,5 ммоль/л у плазмі крові тварин усіх експериментальних груп (рис. 3.23 В). А рівень глюкози становив $8,26 \pm 0,41$ ммоль/л, $8,56 \pm 0,35$ ммоль/л та $8,4 \pm 0,65$ ммоль/л у контрольних тварин, тварин за дієти HF та за дієти HFHS відповідно (рис. 3.23 Д).

Загалом ці результати підтверджують, що 7-тижнева дієта HF або HFHS не спричиняє ожиріння або метаболічний синдром у щурів, на відміну від довгострокової дієти HF або дієти з високим вмістом цукру [105, 108].

3.4.2. Дихальна функція ізольованих мітохондрій печінки щурів за короткотривалих дієт

Захворювання багатьох органів пов'язані з нездоровим харчуванням, метаболічним синдромом та ожирінням. Сучасне розуміння процесів у печінці полягає в тому, що гіперліпідемія, яка є наслідком нездорового харчування та ожиріння, спричиняє неалкогольну жирову хворобу печінки та неалкогольний стеатогепатит [109]. Це підтверджується дослідженнями на тваринах. У щурів довгострокова дієта з високим вмістом цукру протягом 20 тижнів призвела до підвищення маси тіла та рівня глюкози в крові [108]. Це супроводжувалося компенсаторним посиленням швидкості споживання кисню клітинами печінки щурів [108]. Адаптація мітохондрій печінки до високожирової дієти була підтверджена в довгостроковому (30 тижнів) дослідженні на діабетичних мишах [110]. Водночас інше дослідження показало пригнічення дихальних функцій мітохондрій печінки мишей внаслідок 12-тижневої високожирової дієти [110]. А короткочасна 7-тижнева дієта з високим вмістом жиру не виявила впливу на масу тіла або споживання кисню клітинами печінки щурів [105]. Отже, роль мітохондріальної адаптації до дієти та ожиріння в підтримці нормальної функції печінки до кінця не встановлене і потребує подальшого дослідження.

Ми дослідили вплив дієт HF та HFHS на дихання ізольованих мітохондрій

печінки у різних метаболічних станах:

- у стані 4 (після фосфорилування доданої до полярографічної комірки об'ємом 1 мл 0,1 мкмоль АДФ за високої концентрації субстратів окиснення),
- у стані 3 (внаслідок додавання до полярографічної комірки 0,75 мкмоль АДФ за високої концентрації субстратів окиснення),
- у стані 3р (внаслідок додавання до полярографічної комірки 0,1–0,2 мкмоль FCCP).

З'ясувалося, що швидкості дихання ізольованих мітохондрій печінки у станах 4, 3 та 3р було подібним у всіх експериментальних групах, незалежно від використаного субстрату окиснення (рис. 3.24 А–В).

За окиснення *сукцинату* швидкість дихання мітохондрій гепатоцитів контрольних тварин у стані 4 становила $0,24 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с × мг білка), за дієти HF – $0,24 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (с × мг білка), а за дієти HFHS – $0,22 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (с × мг білка). У стані 3 швидкість дихання зросла до $0,94 \pm 0,07$, $1,07 \pm 0,07$ та $1,04 \pm 0,04$ нмоль O_2 / (с × мг білка) відповідно. У стані 3р (роз'єданого дихання з використанням протонофора FCCP) швидкість дихання для контрольних, HF та HFHS тварин становила $1,28 \pm 0,06$, $1,37 \pm 0,09$ та $1,26 \pm 0,05$ нмоль O_2 / (с × мг білка) відповідно (рис. 3.24 А).

За окиснення суміші *глутамату* + *малату* ми зареєстрували наступні швидкості дихання мітохондрій гепатоцитів: швидкість дихання у стані 4 у контрольних тварин становила $0,17 \pm 0,04$ нмоль O_2 / (с × мг білка), за дієти HF – $0,15 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с × мг білка), а за дієти HFHS – $0,14 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с × мг білка). Швидкості дихання у стані 3 у контролі, за дієти HF та HFHS становили $0,62 \pm 0,06$, $0,7 \pm 0,06$ та $0,68 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с × мг білка) відповідно. Швидкість дихання мітохондрій печінки у стані 3р становила $0,80 \pm 0,07$ нмоль O_2 / (с × мг білка) у контрольних тварин, $0,83 \pm 0,08$ нмоль O_2 / (с × мг білка) – за дієти HF та $0,82 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с × мг білка) – за дієти HFHS (рис. 3.24 Б)

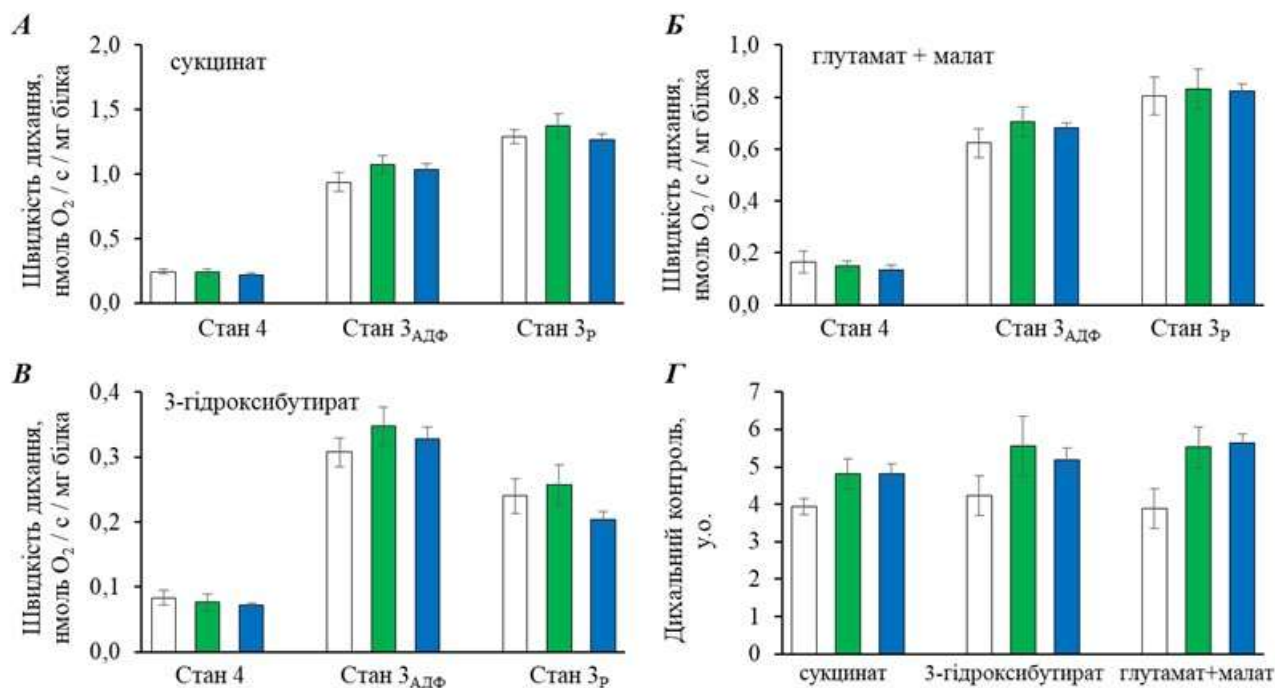


Рис. 3.24. Дихання ізольованих мітохондрій печінки щурів на базовій (білий), HF (зелений) або HFHS (синій) дієтах; субстратами окиснення були: *A* – сукцинат (5 ммоль/л), *B* – глутамат + малат (по 5 ммоль/л), *V* – 3-гідроксибутират (5 ммоль/л); *Г* – показники дихального контролю для усіх субстратів, $n = 10$

За окиснення *3-гідроксибутирату* швидкість дихання ізольованих мітохондрій печінки (рис. 3.24 *V*) виявилася нижчою, ніж за окиснення інших субстратів – сукцинату чи суміші глутамату і малату. Швидкість дихання мітохондрій у метаболічному стані 4 становила $0,08 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (с \times мг білка) у контрольних тварин, $0,07 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (с \times мг білка) – у випадку дієти HF та $0,07 \pm 0,004$ нмоль O_2 / (с \times мг білка) – у випадку дієти HFHS. У метаболічному стані 3 швидкість дихання зросла до $0,31 \pm 0,02$, $0,35 \pm 0,03$ та $0,33 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с \times мг білка) у контролі, за дієт HF та HFHS відповідно. У стані 3_р швидкість дихання для контрольних тварин, у випадку дієт HF та HFHS становила $0,24 \pm 0,03$, $0,26 \pm 0,03$ та $0,20 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (с \times мг білка) відповідно.

Як свідчать наведені швидкості дихання ізольованих мітохондрій печінки, результати добре відтворюються у всіх експериментальних групах для кожного із протестованих субстратів окиснення. Розраховані індекси дихального контролю ізольованих мітохондрій печінки були в діапазоні 3,9–5,6, що теж 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 (рис. 3.24 Г).

Отже, наші результати підтверджують висновок, що короткочасні дієти HF і HFHS не мають прямого впливу на дихальну функцію мітохондрій печінки у щурів без ознак ожиріння, що узгоджується з іншими дослідженнями [105]. Залишилося з'ясувати, чи змінюються біоенергетичні функції мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози.

3.4.3. Біоенергетичні функції мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за короткотривалої дієти з високим вмістом жиру або з високим вмістом жиру і цукру

Надмірне накопичення жиру в підшлунковій залозі нещодавно обговорювалося як фактор ризику багатьох захворювань підшлункової залози, включаючи гострий панкреатит, хронічний панкреатит, рак підшлункової залози та цукровий діабет 2 типу [111]. Також добре відомо, що у пацієнтів з дефіцитом ліпопротеїнліпази спостерігається підвищений рівень ліпідів у крові та висока ймовірність гострого панкреатиту [112]. Дослідження *in vitro* показують шкідливий вплив вільних жирних кислот як на мітохондріальний синтез АТФ, так і на життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози [22, 113]. Довготривала високожирова дієта (12–20 тижнів) спричиняла у щурів гіперліпідемію, збільшення ваги і, що важливо, накопичення крапель ліпідів у тканині підшлункової залози з ознаками ураження підшлункової залози [113, 107]. Однак, на сьогоднішній день не було проведено жодних досліджень впливу

дієти HF чи дієти HFHS на функціонування мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози. Це підтверджує актуальність проведених нами досліджень впливу дієт HF чи дієти HFHS на функціонування мітохондрій підшлункової залози.

Під час реєстрації дихання неушкоджених ізольованих клітин, на відміну від реєстрації дихання ізольованих мітохондрій, неможливо змодельовати метаболічний стан 3 за Чансом, додаючи у середовища екзогенний АДФ, оскільки він не проникає крізь плазматичну мембрану, а внутрішньоклітинна концентрація АДФ зберігається досить високою. Щоб встановити максимальну дихальну здатність мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози, ми використали протонофор FCCP, як це описано раніше [76].

У контролі базальна швидкість дихання за окиснення глюкози становила $0,22 \pm 0,02$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с), за окиснення пірувату – $0,23 \pm 0,02$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с), а за окиснення 3-гідроксибутирату – $0,24 \pm 0,03$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с). Але у тварин на дієті HF базальна швидкість дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози знизилася приблизно на 15 % порівняно з контролем, незалежно від субстрату окиснення у середовищі ($p < 0,05$, $n = 10$), і становила $0,19 \pm 0,01$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с) за окиснення глюкози, $0,20 \pm 0,01$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с) – за окиснення пірувату та $0,19 \pm 0,01$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с) – за окиснення 3-гідроксибутирату (рис. 3.25 А).

Тим часом дієта HFHS не мала такого ефекту, і швидкості базального дихання ізольованих ацинусів були близькі до контрольних величин – $0,23 \pm 0,01$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с) за окиснення глюкози, $0,23 \pm 0,02$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с) – за окиснення пірувату та $0,21 \pm 0,01$ нмоль $O_2 / (10^6$ клітин \times с) – за окиснення 3-гідроксибутирату (рис. 3.25 А).

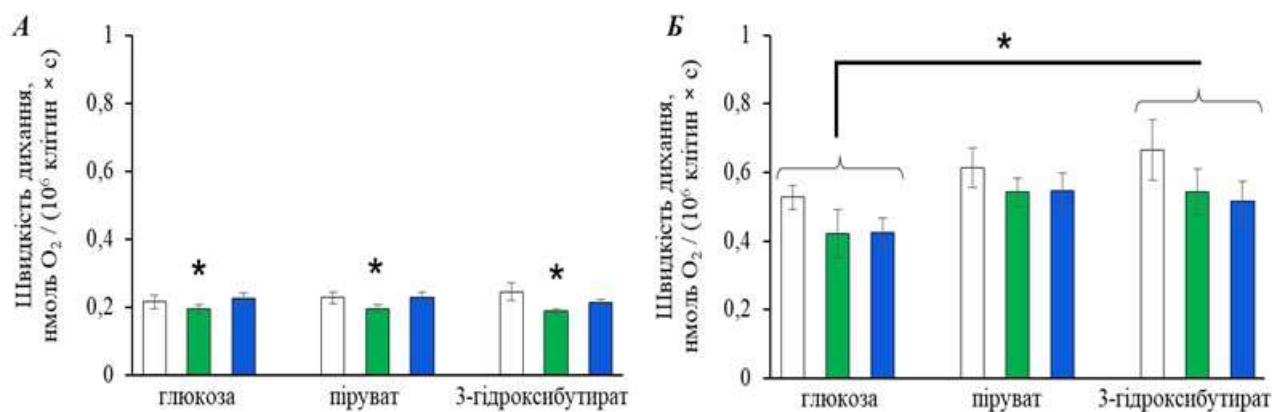


Рис. 3.25. Дихання мітохондрій ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів у контролі (білий колір), за дієти HF (зелений колір) і за дієти HFHS (синій колір): *A* – базальне дихання, *B* – максимальне роз’єднане дихання; субстратами були глюкоза (10 ммоль/л) окремо або в комбінації з піруватом (2 ммоль/л) або 3-гідроксибутиратом (2 ммоль/л); * – достовірна різниця порівняно з контролем згідно з однофакторним дисперсійним аналізом ANOVA та post-hoc тестом Голм-Бонферроні з $p < 0,05$, $n = 5-10$

Максимальна швидкість роз’єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози у тварин у контролі та обох експериментальних груп не відрізнялася (рис. 3.25 *B*). Зареєстрований лише статистично вірогідний ($p < 0,05$, $n = 5-10$) позитивний вплив наявності у середовищі 3-гідроксибутирату на максимальну швидкість роз’єданого дихання ацинусів незалежно від дієти, що свідчить про утилізацію кетонових тіл мітохондріями ацинусів підшлункової залози. За окиснення 3-гідроксибутирату швидкість дихання становила $0,67 \pm 0,09$, $0,54 \pm 0,07$ та $0,52 \pm 0,06$ нмоль O₂ / (10⁶ клітин × с) у контролі, за дієти HF та дієти HFHS відповідно.

Мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози, який вимірювали за допомогою флуоресценції TMRM, був однаковим у тварин усіх експериментальних груп. Більше того, не було зареєстровано жодної статистичної достовірної різниці у величині мембранного потенціалу мітохондрій за використання різних субстратів окиснення (рис. 3.26 *A*).

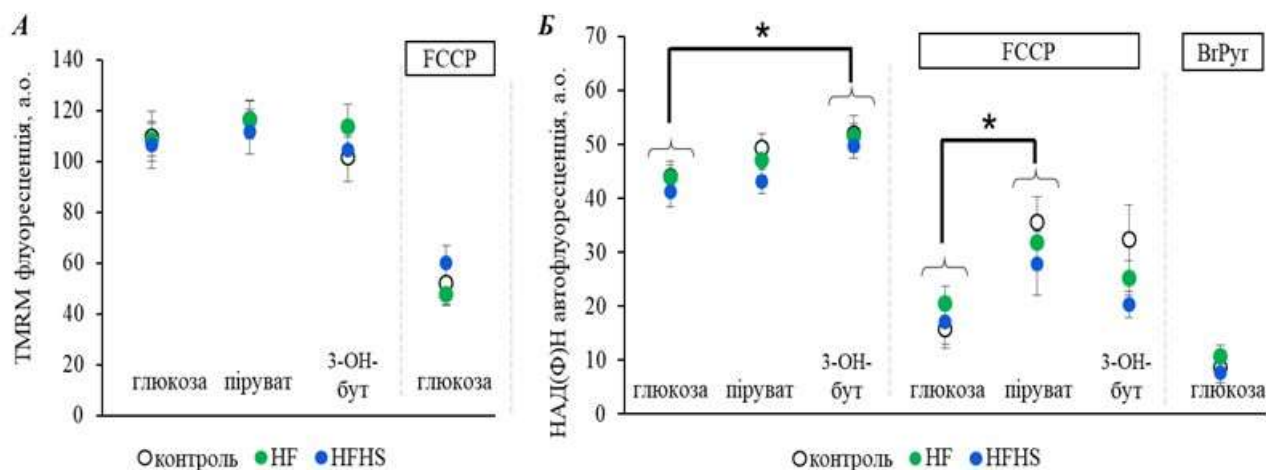


Рис. 3.26. Мембранний потенціал (А) та НАД(Ф)Н-автофлуоресценція (Б) мітохондрій ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів у контролі (білий колір), за дієти HF (зелений колір) і дієти HFHS (синій колір); субстратами були глюкоза (10 ммоль/л) окремо або в комбінації з піруватом (2 ммоль/л) або 3-гідроксибутиратом (2 ммоль/л); [FCCP] = 5 мкмоль/л, [BrPyru] = 500 мкмоль/л; * – достовірна різниця порівняно з контролем згідно з однофакторним дисперсійним аналізом ANOVA та post-hoc тестом Голм-Бонферроні з $p < 0,05$, $n = 5-10$

FCCP викликав різку деполяризацію внутрішньої мембрани мітохондрій ацинарних клітин, що підтверджує високу якість ізольованих ацинусів.

Загальна активність метаболізму клітин, виміряна за допомогою автофлуоресценції НАД(Ф)Н, була подібною в усіх експериментальних групах і знаходилась у діапазоні 41–52 у.о. (рис. 3.26 Б). Додавання до середовища 3-гідроксибутирату значно підвищувало цитозольний НАД(Ф)Н у всіх групах тварин. У контролі автофлуоресценція НАД(Ф)Н збільшилась від 44,1 до 51,9 у.о., за дієти HF – від 43,8 до 51,6 у.о., за дієти HFHS – від 41,3 до 49,7 у.о.

Інгібітор гліколізу бромпіруват (BrPyru, 500 мкмоль/л) майже повністю припиняв автофлуоресценцію NAD(P)H. Використання FCCP для посилення процесів окислення мітохондріального NAD(P)H спричинило зниження його автофлуоресценції, яке не залежало від дієти, але було значно менш вираженим за окислення пірувату, що вказує на підвищення активності циклу трикарбонівих кислот (рис. 3.26 Б). Це підтверджує попередні висновки про те,

що піруват посилює мітохондріальні функції в ізольованих ацинусах підшлункової залози щурів [82].

На завершення ми маємо підстави зробити висновок, що досліджувані дієти практично не впливають на мітохондріальні функції підшлункової залози. Невелике зниження базального дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози за дієти HF не супроводжувалося змінами інших процесів у мітохондріях. Чи пов'язаний виявлений ефект зниження базального дихання за дієти HF із ліпідним перетворенням залози, як описано в літературі [106], ще належить з'ясувати в подальших дослідженнях. Але ми вже можемо стверджувати, що ацинарні клітини підшлункової залози є більш чутливими до жирового навантаження, ніж клітини печінки.

Підсумки до розділу

Отримані результати показали, що короточасні дієти з високим вмістом жиру та/або цукру не призводять до значного ожиріння та не мають негативного впливу на мітохондрії печінки. Водночас за дієти із високим вмістом жиру спостерігається незначне пригнічення базального дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення усіх тестованих нами субстратів – глюкози окремо чи в комбінації з піруватом або 3-гідроксибутиратом. Крім того, нами встановлено, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози здатні утилізувати кетонові тіла, про що свідчить приріст максимальної швидкості роз'єданого дихання та НАД(Ф)Н-автофлуоресценції за окиснення 3-гідроксибутирату.

Результати дослідження опубліковані в:

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. 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 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.

Розділ 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

Застосування методу полярографічної реєстрації дихання ізольованих мітохондрій [114], а згодом і ізольованих клітин [87] спричинило бурхливий розвиток біоенергетики. Були стандартизовані умови таких досліджень [77], що дало змогу описати і встановити механізми дихальної функції мітохондрій різних тканин за різних метаболічних станів. Попри це, однією із найбільш трудомістких процедур полярографічного дослідження було обчислення швидкостей дихання мітохондрій із записаних полярограм. Додатково, із розвитком технологій реєстрації сигналів, не тільки збільшилась роздільна здатність і з'явилась можливість реєструвати найменші зміни біоенергетичних процесів, а ще й зросла складність аналізу записаних сигналів. Серед викликів, які постали перед науковцями, були артефакти записів, осциляторні чи випадкові шуми, а особливо труднощі із вибором лінійних ділянок.

Тому для автоматизації процесу обчислення нами розроблено автоматизоване програмне рішення у вигляді авторського алгоритму для аналізу полярографічних записів, яка дає змогу:

- 1) здійснити автоматичну корекцією артефактів, осциляторних і випадкових шумів;
- 2) встановити оптимальні зони для обчислення швидкостей у різних метаболічних станах;
- 3) усунути можливий суб'єктивний вплив дослідника.

Проведено верифікацію розробленого програмного забезпечення і показано його високу ефективність.

Однією із важливих метрологічних проблем сучасних біоенергетичних досліджень (і не тільки) на препаратах ізольованих клітин є оцінка їхньої життєздатності. Для цього використовуються різноманітні підходи:

- 1) оцінка цілісності плазматичної мембрани з використанням трипанового синього (наприклад, у роботах [115]) чи визначенням ензиматичної активності у позаклітинному середовищі лактатдегідрогенази [116];

- 2) фарбування пропідій йодидом [117] та Hoechst 33342 [118];
- 3) визначення функціональної активності мітохондрій, наприклад, максимальної швидкості роз'єданого дихання чи оптимальної концентрації FCCP [76].

Функціональні підходи мають ряд переваг, оскільки дають змогу зареєструвати такі зміни, які ще не спричинили зміну проникності плазматичних мембран, але вже змінили протікання внутрішньоклітинних процесів. Але незрозумілим залишалось, наскільки інформативним для оцінки життєдіяльності клітин є максимальна швидкість роз'єданого дихання чи оптимальної концентрації FCCP.

Нами обґрунтований новий параметр – стабільність роз'єданого дихання, який характеризує здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість роз'єданого дихання із збільшенням концентрації протонофора. Встановлено, що чим вищою стабільність роз'єданого дихання, тим більша життєздатність клітин ізольованих ацинусів підшлункової залози. Максимальна швидкість роз'єданого дихання виявилася менш інформативним параметром, оскільки не враховує час чи дію протонофора у вищих концентраціях. Враховуючи це, пропонуємо використовувати стабільність роз'єданого дихання як новий метаболічний функціональний тест для оцінки життєздатності ізольованих клітин.

Одним із потенційних патогенних чинників для ацинарних клітин підшлункової залози є жовчні кислоти, які можуть спричиняти розвиток панкреатиту внаслідок біліарно-панкреатичного рефлюксу [92]. Відомо, що жовчна кислота TLC-S у концентрації 25 мкмоль/л спричиняє деполаризацію внутрішньої мембрани мітохондрій у значної частини ацинарних клітин підшлункової залози [93]. У концентрації 0,2 ммоль/л TLC-S активує генерацію глобальних кальцієвих хвиль, а також локальні кальцієві сигнали, які локалізовані в ділянці секреторних гранул ацинарних клітин [14]. Це супроводжується зниженням мітохондріального і цитозольного рівня АТФ [20],

що негативно впливає на ацинарні клітини. Але точний механізм порушення функціонування мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за дії жовчних кислот не був встановлений – порушення окиснення яких субстратів є першопричиною зменшення мембранного потенціалу мітохондрій. Нами встановлено, що жовчна кислота TLC-S за концентрації 0,5 ммоль/л призводить до зменшення мембранного потенціалу мітохондрій внаслідок порушення окиснення аланіну, але не пірувату. У високій концентрації (2 ммоль/л) TLC-S спричиняє порушення цілісності плазматичної і/чи внутрішньоклітинних мембран і, як наслідок, зниження життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози.

Ще одною причиною розвитку патологічних станів підшлункової залози є ожиріння і розвиток метаболічного синдрому [49, 55]. Нас зацікавило, наскільки змінюються процеси енергозабезпечення в ацинарних клітинах підшлункової залози за короткотривалих дієт з високим вмістом жиру та/або цукру. Додатково ми оцінили проходження процесів окисного фосфорилування у ізольованих мітохондріях печінки, щоб перевірити можливість суттєвих змін у функціонуванні інших органів.

Аналіз морфологічних та показників плазми крові показав, що короткотривалі (7 тижнів) дієти з високим вмістом жиру та/або цукру не спричинили збільшення маси тіла, печінки чи рівня глюкози, тригліцеридів, ліпопротеїнів високої та низької щільності у плазмі крові. Попри це спостерігалось незначне збільшення рівня холестеролу за обох експериментальних дієт, а також збільшення маси вісцерального жиру за дієти із високим вмістом жиру і цукру.

У дослідженнях енергетичних процесів у печінці, змін у швидкості клітинного дихання за окиснення різних субстратів не було зареєстровано. Тому припускаємо, що такі короткочасні висококалорійні дієти – з високим вмістом жиру та/або цукру – не мають прямого впливу на дихальну функцію мітохондрій печінки.

За вимірювань швидкості дихання ацинарних клітин підшлункової залози за дієти із високим вмістом жиру спостерігається незначне пригнічення базального дихання за окиснення глюкози окремо чи в комбінації з піруватом або 3-гідроксибутиратом. Окремо варто зазначити, що зареєстроване зростання максимальної швидкості роз'єданого дихання за окиснення 3-гідроксибутирату може слугувати основою для твердження, що мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози здатні утилізувати кетонові тіла. Додатково це підтверджується зареєстрованим зростанням НАД(Ф)Н-автофлуоресценції у порівнянні з контрольною групою.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано авторський алгоритм автоматичного обчислення параметрів полярографічних записів, розроблено та верифіковано програмне рішення для його реалізації, проведено експериментальне дослідження змін енергетичного забезпечення ацинарних клітин підшлункової залози за різних функціональних станів. На основі аналізу отриманих результатів зроблено такі висновки:

1. Розроблене автоматизоване програмне рішення у вигляді авторського алгоритму для аналізу полярографічних записів із автоматичною корекцією артефактів, осциляторних і випадкових шумів, а також пошуку оптимальних зон для обчислення дає змогу суттєво покращити якість та швидкість проведення обчислень і усуває суб'єктивний вплив експериментатора.
2. Стабільність роз'єданого дихання, тобто здатність мітохондрій підтримувати високу швидкість роз'єданого дихання із збільшенням концентрації протонофора, є тим вищою, чим більша життєздатність клітин ізольованих ацинусів підшлункової залози. Максимальна швидкість роз'єданого дихання є менш інформативним параметром, тому пропонуємо використовувати стабільність роз'єданого дихання як новий метаболічний функціональний тест для оцінки життєздатності ізольованих клітин.
3. Жовчна кислота TLC-S за низької концентрації (0,5 ммоль/л) призводить до порушення генерації мембранного потенціалу мітохондрій внаслідок порушення окиснення аланіну, але не пірувату. У високій концентрації (2 ммоль/л) TLC-S спричиняє порушення цілісності плазматичної і/чи внутрішньоклітинних мембран і, як наслідок, зниження життєздатності ацинарних клітин підшлункової залози.
4. Короткочасні (7 тижнів) дієти з високим вмістом жиру та/або цукру не спричинили (відносно контролю) збільшення маси тіла, печінки, рівня глюкози, тригліцеридів та ліпопротеїнів високої та низької щільності у плазмі

крові. Спостерігається лише незначне збільшення рівня холестеролу за обох експериментальних дієт та маса вісцерального жиру за дієти із високим вмістом жиру і цукру.

5. Обидві короткочасні висококалорійні дієти – з високим вмістом жиру та/або цукру – не мають прямого впливу на дихальну функцію мітохондрій печінки у щурів без ознак ожиріння. Водночас за дієти із високим вмістом жиру спостерігається незначне пригнічення базального дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення глюкози окремо чи в комбінації з піруватом або 3-гідроксибутиратом.
6. Мітохондрії ацинарних клітин підшлункової залози здатні утилізувати кетонові тіла, про що свідчить збільшення максимальної швидкості роз'єданого дихання та приріст НАД(Ф)Н-автофлуоресценції за окиснення 3-гідроксибутирату.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1] O. H. Petersen, J. V. Gerasimenko, O. V. Gerasimenko, O. Gryshchenko та S. Peng, «The roles of calcium and ATP in the physiology and pathology of the exocrine pancreas,» *Physiological Reviews*, т. 101, p. 1691–1744, October 2021.
- [2] O. V. Gerasimenko and J. V. Gerasimenko, "Mitochondrial function and malfunction in the pathophysiology of pancreatitis," *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, vol. 464, p. 89–99, July 2012.
- [3] D. N. Criddle, Tepikin and V. Alexei, "Bioenergetics of the Exocrine Pancreas: Physiology to Pathophysiology," *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, December 2020.
- [4] R. C. Liddle and A. Rodger, "Regulation of Pancreatic Secretion (Version 1.0)," *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, September 2015.
- [5] M. M. Bayliak, M. V. Vatashchuk, D. V. Gospodaryov, V. V. Hurza, O. I. Demianchuk, M. V. Ivanochko, N. I. Burdyliuk, K. B. Storey, O. Lushchak та V. I. Lushchak, «High fat high fructose diet induces mild oxidative stress and reorganizes intermediary metabolism in male mouse liver: Alpha-ketoglutarate effects,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, т. 1866, p. 130226, December 2022.
- [6] B. Caballero, "Humans against Obesity: Who Will Win?," *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, vol. 10, p. S4–S9, January 2019.
- [7] K. M. Fock and J. Khoo, "Diet and exercise in management of obesity and overweight," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 28 Suppl 4, p. 59–63, December 2013.

- [8] P. E. Scherer, S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini and H. F. Lodish, "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, p. 26746–26749, November 1995.
- [9] A. Otero, S. Becerril, M. Martín, J. A. Cienfuegos, V. Valentí, R. Moncada, V. Catalán, J. Gómez-Ambrosi, M. A. Burrell, G. Frühbeck та A. Rodríguez, «Effect of guanylin peptides on pancreas steatosis and function in experimental diet-induced obesity and after bariatric surgery,» *Frontiers in Endocrinology*, т. 14, 2023.
- [10] R. Ramkissoon and T. B. Gardner, "Pancreatic Steatosis: An Emerging Clinical Entity," *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 114, p. 1726–1734, November 2019.
- [11] L. C. Clark and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, p. 29–45, October 1962.
- [12] S. Cassim, P.-Y. Martin and E. Pascolo-Rebouillat, "ADD10 protects renal cells from cold injuries by improving energy metabolism," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 634, p. 62–69, December 2022.
- [13] J. Pflieger, M. He and M. Abdellatif, "Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival," *Cell Death & Disease*, vol. 6, p. e1835–e1835, July 2015.
- [14] S. Voronina, R. Longbottom, R. Sutton, O. H. Petersen and A. Tepikin, "Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology," *The Journal of Physiology*, vol. 540, p. 49–55, April 2002.

- [15] P. S. Leung, "Physiology of the Pancreas," in *The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in The Pancreas: The RAS in the Pancreas*, P. S. Leung, Ed., Dordrecht, Springer Netherlands, 2010, p. 13–27.
- [16] P. A. Hart, Conwell and L. Darwin, "Secretion of the Human Exocrine Pancreas in Health and Disease," *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, January 2021.
- [17] R. P. Bolender, «STEREOLOGICAL ANALYSIS OF THE GUINEA PIG PANCREAS : I. Analytical Model and Quantitative Description of Nonstimulated Pancreatic Exocrine Cells,» *Journal of Cell Biology*, т. 61, p. 269–287, May 1974.
- [18] M. Chvanov, S. Voronina, X. Zhang, S. Telnova, R. Chard, Y. Ouyang, J. Armstrong, H. Tanton, M. Awais, D. Latawiec, R. Sutton, D. N. Criddle and A. V. Tepikin, "Knockout of the Mitochondrial Calcium Uniporter Strongly Suppresses Stimulus-Metabolism Coupling in Pancreatic Acinar Cells but Does Not Reduce Severity of Experimental Acute Pancreatitis," *Cells*, vol. 9, p. 1407, June 2020.
- [19] S. Voronina, T. Sukhomlin, P. R. Johnson, G. Erdemli, O. H. Petersen and A. Tepikin, "Correlation of NADH and Ca²⁺ signals in mouse pancreatic acinar cells," *The Journal of Physiology*, vol. 539, p. 41–52, February 2002.
- [20] S. G. Voronina, S. L. Barrow, A. W. M. Simpson, O. V. Gerasimenko, G. da Silva Xavier, G. A. Rutter, O. H. Petersen and A. V. Tepikin, "Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells," *Gastroenterology*, vol. 138, p. 1976–1987, May 2010.
- [21] P. Mankad, A. James, A. K. Siriwardena, A. C. Elliott and J. I. E. Bruce, "Insulin protects pancreatic acinar cells from cytosolic calcium overload and inhibition of plasma membrane calcium pump," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, p. 1823–1836, January 2012.

- [22] A. Samad, A. James, J. Wong, P. Mankad, J. Whitehouse, W. Patel, M. Alves-Simoes, A. K. Siriwardena and J. I. E. Bruce, "Insulin protects pancreatic acinar cells from palmitoleic acid-induced cellular injury," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, p. 23582–23595, August 2014.
- [23] Y. Maruyama and P. Oh, "Delay in granular fusion evoked by repetitive cytosolic Ca²⁺ spikes in mouse pancreatic acinar cells," *Cell calcium*, vol. 16, November 1994.
- [24] B. R. Alevriadou, A. Patel, M. Noble, S. Ghosh, V. M. Gohil, P. B. Stathopoulos and M. Madesh, "Molecular nature and physiological role of the mitochondrial calcium uniporter channel," *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, vol. 320, p. C465–C482, April 2021.
- [25] P. R. Johnson, A. V. Tepikin and G. Erdemli, «Role of mitochondria in Ca²⁺ homeostasis of mouse pancreatic acinar cells,» *Cell Calcium*, т. 32, p. 59–69, August 2002.
- [26] J. Maléth, Z. Rakonczay, V. Venglovecz, N. J. Dolman and P. Hegyi, "Central role of mitochondrial injury in the pathogenesis of acute pancreatitis," *Acta Physiologica (Oxford, England)*, vol. 207, p. 226–235, February 2013.
- [27] M. K. Park, M. C. Ashby, G. Erdemli, O. H. Petersen and A. V. Tepikin, "Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport," *The EMBO journal*, vol. 20, p. 1863–1874, April 2001.
- [28] S. Voronina, M. Sherwood, S. Barrow, N. Dolman, A. Conant and A. Tepikin, "Downstream from calcium signalling: mitochondria, vacuoles and pancreatic acinar cell damage," *Acta Physiologica*, vol. 195, p. 161–169, 2009.
- [29] H. Tinel, J. M. Cancela, H. Mogami, J. V. Gerasimenko, O. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin and O. H. Petersen, "Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local

- cytosolic Ca(2+) signals," *The EMBO journal*, vol. 18, p. 4999–5008, September 1999.
- [30] G. Lur, L. P. Haynes, I. A. Prior, O. V. Gerasimenko, S. Feske, O. H. Petersen, R. D. Burgoyne and A. V. Tepikin, "Ribosome-free terminals of rough ER allow formation of STIM1 puncta and segregation of STIM1 from IP(3) receptors," *Current biology: CB*, vol. 19, p. 1648–1653, October 2009.
- [31] S. V. Straub, D. R. Giovannucci and D. I. Yule, "Calcium wave propagation in pancreatic acinar cells: functional interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, ryanodine receptors, and mitochondria," *The Journal of General Physiology*, vol. 116, p. 547–560, October 2000.
- [32] L. K. Townsend, H. S. Brunetta and M. A. S. Mori, "Mitochondria-associated ER membranes in glucose homeostasis and insulin resistance," *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 319, p. E1053–E1060, December 2020.
- [33] S. L. Barrow, S. G. Voronina, G. da Silva Xavier, M. A. Chvanov, R. E. Longbottom, O. V. Gerasimenko, O. H. Petersen, G. A. Rutter and A. V. Tepikin, "ATP depletion inhibits Ca²⁺ release, influx and extrusion in pancreatic acinar cells but not pathological Ca²⁺ responses induced by bile," *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, vol. 455, p. 1025–1039, March 2008.
- [34] J. M.-J. Romac, R. A. Shahid, S. M. Swain, S. R. Vigna and R. A. Liddle, "Piezo1 is a mechanically activated ion channel and mediates pressure induced pancreatitis," *Nature Communications*, vol. 9, p. 1715, April 2018.
- [35] R. C. Liddle and A. Rodger, "Cholecystokinin," *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, July 2018.
- [36] P. Hildebrand, C. Beglinger, K. Gyr, J. B. Jansen, L. C. Rovati, M. Zuercher, C. B. Lamers, I. Setnikar and G. A. Stalder, "Effects of a cholecystokinin receptor

antagonist on intestinal phase of pancreatic and biliary responses in man," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 85, p. 640–646, March 1990.

- [37] T. Hiraoka, T. Fukuwatari, M. Imaizumi та T. Fushiki, «Effects of oral stimulation with fats on the cephalic phase of pancreatic enzyme secretion in esophagostomized rats,» *Physiology & Behavior*, т. 79, p. 713–717, September 2003.
- [38] C. K. Kim, K. Y. Lee, T. Wang, G. Sun, T. M. Chang and W. Y. Chey, "Role of endogenous cholecystokinin on vagally stimulated pancreatic secretion in dogs," *The American Journal of Physiology*, vol. 257, p. G944–949, December 1989.
- [39] N. Furukawa та H. Okada, «Effects of stimulation of the hypothalamic area on pancreatic exocrine secretion in dogs,» *Gastroenterology*, т. 97, p. 1534–1543, December 1989.
- [40] G. Holtmann, M. V. Singer, R. Kriebel, K. H. Stäcker and H. Goebell, "Differential effects of acute mental stress on interdigestive secretion of gastric acid, pancreatic enzymes, and gastroduodenal motility," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 34, p. 1701–1707, November 1989.
- [41] A. Schafmayer, R. Nustede, A. Pompino and H. Köhler, "Vagal influence on cholecystokinin and neurotensin release in conscious dogs," *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 23, p. 315–320, April 1988.
- [42] M. Katschinski, G. Dahmen, M. Reinshagen, C. Beglinger, H. Koop, R. Nustede та G. Adler, «Cephalic stimulation of gastrointestinal secretory and motor responses in humans,» *Gastroenterology*, т. 103, p. 383–391, August 1992.
- [43] J. M. Cargill and K. G. Wormsley, "Effect of gastric distension on human pancreatic secretion," *Acta hepato-gastroenterologica*, vol. 26, June 1979.
- [44] W. E. Dale, C. M. Turkelson та T. E. Solomon, «Role of cholecystokinin in intestinal phase and meal-induced pancreatic secretion,» *American Journal of*

Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, т. 257, p. G782–G790, November 1989.

- [45] O. O. Bilonoha, B. Manko та V. Manko, «THE EFFECTS OF ACETYLCHOLINE AND CHOLECYSTOKININE ON MITOCHONDRIAL ADAPTIVE CAPACITY OF PANCREATIC ACINAR CELLS,» *Fiziolohichnyi zhurnal*, т. 65, p. 73–81, July 2019.
- [46] B. O. Manko and V. V. Manko, "Mechanisms of respiration intensification of rat pancreatic acini upon carbachol-induced Ca²⁺ release," *Acta Physiologica*, vol. 208, p. 387–399, 2013.
- [47] M. Bastías-Pérez, D. Serra and L. Herrero, "Dietary Options for Rodents in the Study of Obesity," *Nutrients*, vol. 12, p. 3234, October 2020.
- [48] G. B. Ehret, P. B. Munroe, K. M. Rice, M. Bochud, A. D. Johnson, D. I. Chasman, A. V. Smith, M. D. Tobin, G. C. Verwoert, S.-J. Hwang, V. Pihur, P. Vollenweider, P. F. O'Reilly, N. Amin, J. L. Bragg-Gresham, A. Teumer, N. L. Glazer, L. Launer, J. Hua Zhao, Y. Aulchenko, S. Heath, S. Söber, A. Parsa, J. Luan, P. Arora, A. Dehghan, F. Zhang, G. Lucas, A. A. Hicks, A. U. Jackson, J. F. Peden, T. Tanaka, S. H. Wild, I. Rudan, W. Igl, Y. Milaneschi, A. N. Parker, C. Fava, J. C. Chambers, E. R. Fox, M. Kumari, M. Jin Go, P. van der Harst, W. Hong Linda Kao, M. Sjögren, D. G. Vinay, M. Alexander, Y. Tabara, S. Shaw-Hawkins, P. H. Whincup, Y. Liu, G. Shi, J. Kuusisto, B. Tayo, M. Seielstad, X. Sim, K.-D. Hoang Nguyen, T. Lehtimäki, G. Matullo, Y. Wu, T. R. Gaunt, N. Charlotte Onland-Moret, M. N. Cooper, C. G. P. Platou, E. Org, R. Hardy, S. Dahgam, J. Palmen, V. Vitart, P. S. Braund, T. Kuznetsova, C. S. P. M. Uiterwaal, A. Adeyemo, W. Palmas, H. Campbell, B. Ludwig, M. Tomaszewski, I. Tzoulaki, N. D. Palmer, T. Aspelund, M. Garcia, Y.-P. C. Chang, J. R. O'Connell, N. I. Steinle, D. E. Grobbee, D. E. Arking, S. L. Kardia, A. C. Morrison, D. Hernandez, S. Najjar, W. L. McArdle, D. Hadley, M. J. Brown, J. M. Connell, A. D. Hingorani, I. N. M. Day, D. A. Lawlor, J. P. Beilby,

R. W. Lawrence, R. Clarke, J. C. Hopewell, H. Ongen, A. W. Dreisbach, Y. Li, J. Hunter Young, J. C. Bis, M. Kähönen, J. Viikari, L. S. Adair, N. R. Lee, M.-H. Chen, M. Olden, C. Pattaro, J. A. Hoffman Bolton, A. Köttgen, S. Bergmann, V. Mooser, N. Chaturvedi, T. M. Frayling, M. Islam, T. H. Jafar, J. Erdmann, S. R. Kulkarni, S. R. Bornstein, J. Grässler, L. Groop, B. F. Voight, J. Kettunen, P. Howard, A. Taylor, S. Guarrera, F. Ricceri, V. Emilsson, A. Plump, I. Barroso, K.-T. Khaw, A. B. Weder, S. C. Hunt, Y. V. Sun, R. N. Bergman, F. S. Collins, L. L. Bonnycastle, L. J. Scott, H. M. Stringham, L. Peltonen, M. Perola, E. Vartiainen, S.-M. Brand, J. A. Staessen, T. J. Wang, P. R. Burton, M. Soler Artigas, Y. Dong, H. Snieder, X. Wang, H. Zhu, K. K. Lohman, M. E. Rudock, S. R. Heckbert, N. L. Smith, K. L. Wiggins, A. Doumatey, D. Shriner, G. Veldre, M. Viigimaa, S. Kinra, D. Prabhakaran, V. Tripathy, C. D. Langefeld, A. Rosengren, D. S. Thelle, A. Maria Corsi, A. Singleton, T. Forrester, G. Hilton, C. A. McKenzie, T. Salako, N. Iwai, Y. Kita, T. Ogiwara, T. Ohkubo, T. Okamura, H. Ueshima, S. Umemura, S. Eyheramendy, T. Meitinger, H.-E. Wichmann, Y. Shin Cho, H.-L. Kim, J.-Y. Lee, J. Scott, J. S. Sehmi, W. Zhang, B. Hedblad, P. Nilsson, G. Davey Smith, A. Wong, N. Narisu, A. Stančáková, L. J. Raffel, J. Yao, S. Kathiresan, C. J. O'Donnell, S. M. Schwartz, M. Arfan Ikram, W. T. Longstreth Jr, T. H. Mosley, S. Seshadri, N. R. G. Shrine, L. V. Wain, M. A. Morcken, A. J. Swift, J. Laitinen, I. Prokopenko, P. Zitting, J. A. Cooper, S. E. Humphries, J. Danesh, A. Rasheed, A. Goel, A. Hamsten, H. Watkins, S. J. L. Bakker, W. H. van Gilst, C. S. Janipalli, K. Radha Mani, C. S. Yajnik, A. Hofman, F. U. S. Mattace-Raso, B. A. Oostra, A. Demirkan, A. Isaacs, F. Rivadeneira, E. G. Lakatta, M. Orru, A. Scuteri, M. Ala-Korpela, A. J. Kangas, L.-P. Lyytikäinen, P. Soininen, T. Tukiainen, P. Würtz, R. Twee-Hee Ong, M. Dörr, H. K. Kroemer, U. Völker, H. Völzke, P. Galan, S. Hercberg, M. Lathrop, D. Zelenika, P. Deloukas, M. Mangino, T. D. Spector, G. Zhai, J. F. Meschia, M. A. Nalls, P. Sharma, J. Terzic, M. V. Kranthi Kumar, M. Denniff,

- E. Zukowska-Szczechowska, L. E. Wagenknecht, F. Gerald R. Fowkes, F. J. Charchar, P. E. H. Schwarz, C. Hayward, X. Guo, C. Rotimi, M. L. Bots, E. Brand, N. J. Samani, O. Polasek, P. J. Talmud, F. Nyberg, D. Kuh, M. Laan, K. Hveem, L. J. Palmer, Y. T. van der Schouw, J. P. Casas, K. L. Mohlke, P. Vineis, O. Raitakari, S. K. Ganesh, T. Y. Wong, E. Shyong Tai, R. S. Cooper, M. Laakso, D. C. Rao, T. B. Harris, R. W. Morris, A. F. Dominiczak, M. Kivimaki, T. I. C. for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, C. A. M. consortium, C. Consortium, K. Consortium, E. consortium and C. H. A. R. G. E.-H. F. consortium, "Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk," *Nature*, vol. 478, p. 103–109, October 2011.
- [49] T. Alempijevic, S. Dragasevic, S. Zec, D. Popovic and T. Milosavljevic, "Non-alcoholic fatty pancreas disease," *Postgraduate Medical Journal*, vol. 93, p. 226–230, April 2017.
- [50] A. D. Ciaula and P. Portincasa, "Fat, epigenome and pancreatic diseases. Interplay and common pathways from a toxic and obesogenic environment," *European Journal of Internal Medicine*, vol. 25, p. 865–873, December 2014.
- [51] S. Castro-Barquero, A. M. Ruiz-León, M. Sierra-Pérez, R. Estruch and R. Casas, "Dietary Strategies for Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review," *Nutrients*, vol. 12, p. 2983, September 2020.
- [52] L. Pinte, D. V. Balaban, C. Băicuș and M. Jinga, "Non-alcoholic fatty pancreas disease – practices for clinicians," *Romanian Journal of Internal Medicine*, vol. 57, p. 209–219, September 2019.
- [53] H.-Y. Ou, C.-Y. Wang, Y.-C. Yang, M.-F. Chen and C.-J. Chang, "The Association between Nonalcoholic Fatty Pancreas Disease and Diabetes," *PLOS ONE*, vol. 8, p. e62561, May 2013.
- [54] G. Klöppel, T. Dreyer, S. Willemer, H. F. Kern and G. Adler, "Human acute pancreatitis: Its pathogenesis in the light of immunocytochemical and

- ultrastructural findings in acinar cells," *Virchows Archiv A*, vol. 409, p. 791–803, November 1986.
- [55] S. N. (. Singh (2) and P. Vijay, "Relationship between obesity and pancreatitis," *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, June 2015.
- [56] A. C. Choh, E. W. Demerath, M. Lee, K. D. Williams, B. Towne, R. M. Siervogel, S. A. Cole and S. A. Czerwinski, "Genetic analysis of self-reported physical activity and adiposity: the Southwest Ohio Family Study," *Public Health Nutrition*, vol. 12, p. 1052–1060, August 2009.
- [57] C. Acharya, R. A. Cline, D. Jaligama, P. Noel, J. P. Delany, K. Bae, A. Furlan, C. J. Baty, J. M. Karlsson, B. L. Rosario, K. Patel, V. Mishra, C. Dugampudi, D. Yadav, S. Navina and V. P. Singh, "Fibrosis reduces severity of acute-on-chronic pancreatitis in humans," *Gastroenterology*, vol. 145, p. 466–475, August 2013.
- [58] E. A. Laposata and L. G. Lange, "Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 231, p. 497–499, January 1986.
- [59] V. Venglovecz (1), Z. R. J. (. Hegyi (2) and Péter, "The effects of bile acids on pancreatic ductal cells," *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*, May 2016.
- [60] G.-J. Wang, C.-F. Gao, D. Wei, C. Wang and S.-Q. Ding, "Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, p. 1427–1430, March 2009.
- [61] T. Zhang, Q. Zhang and Q. Wang, «Model detection for functional polynomial regression,» *Computational Statistics & Data Analysis*, т. 70, p. 183–197, February 2014.

- [62] A. A. Pais, J. L. Pereira and J. S. Redinha, "Nonlinear regression in parameter estimation from polarographic signals," *Computers & Chemistry*, vol. 24, p. 533–539, May 2000.
- [63] W. R. Schucany, «Kernel Smoothers: An Overview of Curve Estimators for the First Graduate Course in Nonparametric Statistics,» *Statistical Science*, т. 19, p. 663–675, November 2004.
- [64] R. V. Garimella, "A Simple Introduction to Moving Least Squares and Local Regression Estimation," 2017.
- [65] D. Ruppert, S. J. Sheather та M. P. Wand, «An Effective Bandwidth Selector for Local Least Squares Regression,» *Journal of the American Statistical Association*, т. 90, p. 1257–1270, 1995.
- [66] H. V. Danylovyh, A. Y. Chunikhin, Y. V. Danylovyh and S. O. Kosterin, "Application of petri nets methodology to determine biophysicochemical parameters of mitochondria functioning," *Ukrainian Biochemical Journal*, vol. 93, p. 101–110, 2021.
- [67] J. S. Jhang, C.-C. Chang, D. J. Fink and M. H. Kroll, "Evaluation of linearity in the clinical laboratory," *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 128, p. 44–48, January 2004.
- [68] R. Ismail, H. Y. Lee, N. A. Mahyudin та F. Abu Bakar, «Linearity study on detection and quantification limits for the determination of avermectins using linear regression,» *Journal of Food and Drug Analysis*, т. 22, p. 407–412, December 2014.
- [69] J. L. Sebaugh and P. D. McCray, "Defining the linear portion of a sigmoid-shaped curve: bend points," *Pharmaceutical Statistics*, vol. 2, p. 167–174, 2003.
- [70] D. Tholen, CLSI EP06A: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline, EP06-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.

- [71] W. Huber, "On the use of the correlation coefficient r for testing the linearity of calibration functions," *Accreditation and Quality Assurance*, vol. 9, p. 726–726, October 2004.
- [72] J. A. Williams, M. Korc and R. L. Dormer, "Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini," *The American Journal of Physiology*, vol. 235, p. 517–524, November 1978.
- [73] C. Frezza, S. Cipolat and L. Scorrano, "Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts," *Nature Protocols*, vol. 2, p. 287–295, 2007.
- [74] C. A. Schneider, W. S. Rasband and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nature Methods*, vol. 9, p. 671–675, July 2012.
- [75] Б. О. Манько, Д. Волошин and В. Манько, "Дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів," *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*, January 2013.
- [76] В. Манко, О. Билоша та V. Манко, «Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization,» *The Ukrainian Biochemical Journal*, т. 91, p. 34–35, May 2019.
- [77] B. Chance and G. R. Williams, "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 217, p. 409–427, November 1955.
- [78] J. Litten, "Applying Sigma Metrics to Reduce Outliers," *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 37, p. 177–186, March 2017.
- [79] J. A. Armstrong, N. J. Cash, Y. Ouyang, J. C. Morton, M. Chvanov, D. Latawiec, M. Awais, A. V. Tepikin, R. Sutton and D. N. Criddle, "Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 293, p. 8032–8047, May 2018.

- [80] J. A. Armstrong, N. J. Cash, J. C. Morton, A. V. Tepikin, R. Sutton and D. N. Criddle, "Mitochondrial Targeting of Antioxidants Alters Pancreatic Acinar Cell Bioenergetics and Determines Cell Fate," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, p. 1700, January 2019.
- [81] F. J. Bock and S. W. G. Tait, "Mitochondria as multifaceted regulators of cell death," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 21, p. 85–100, February 2020.
- [82] B. O. Manko, O. O. Bilonoha, D. M. Voloshyn, A. M. Zub, I. I. Ivasechko and V. V. Manko, "Pyruvate and Glutamine Define the Effects of Cholecystokinin and Ethanol on Mitochondrial Oxidation, Necrosis, and Morphology of Rat Pancreatic Acini," *Pancreas*, vol. 50, p. 972–981, August 2021.
- [83] R. O. Horbay, B. O. Manko, V. V. Manko, M. D. Lootsik and R. S. Stoika, "Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma," *Cell Biology International*, vol. 36, p. 71–77, January 2012.
- [84] B. O. Manko, M. Y. Klevets and V. V. Manko, "An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under in situ conditions," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 31, p. 115–121, 2013.
- [85] D. Pesta and E. Gnaiger, "High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle," *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 810, p. 25–58, 2012.
- [86] S. Rose, E. Carvalho, E. C. Diaz, M. Cotter, S. C. Bennuri, G. Azhar, R. E. Frye, S. H. Adams and E. Børsheim, "A comparative study of mitochondrial respiration in circulating blood cells and skeletal muscle fibers in women," *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, vol. 317, p. E503–E512, September 2019.

- [87] Б. О. Манько and В. Манько, "Вплив $\text{Ca}(2+)$ на кінетичні параметри дихання мітохондрій *in situ* ацинарних панкреатитів," *Український Біохімічний Журнал (1999)*, vol. 85, p. 48–60, 2013.
- [88] J. Maléth and P. Hegyi, " Ca^{2+} toxicity and mitochondrial damage in acute pancreatitis: translational overview," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, vol. 371, p. 20150425, August 2016.
- [89] N. Shrestha, J. S. M. Cuffe, O. J. Holland, A. V. Perkins, A. J. McAinch and D. H. Hryciw, "Linoleic Acid Increases Prostaglandin E2 Release and Reduces Mitochondrial Respiration and Cell Viability in Human Trophoblast-Like Cells," *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 52, p. 94–108, 2019.
- [90] X. Yan, Z. F. Shi, L. X. Xu, J. X. Li, M. Wu, X. X. Wang, M. Jia, L. P. Dong, S. H. Yang and F. Yuan, "Glutamate Impairs Mitochondria Aerobic Respiration Capacity and Enhances Glycolysis in Cultured Rat Astrocytes," *Biomedical and environmental sciences: BES*, vol. 30, p. 44–51, January 2017.
- [91] A. A. Stepanenko and V. V. Dmitrenko, "Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability," *Gene*, vol. 574, p. 193–203, December 2015.
- [92] I. M. Modlin, M. Kidd, C. Hults and T. Hinoue, "Surgery of chronic pancreatitis: chronicle of confusion and despair," *World Journal of Surgery*, vol. 26, p. 1382–1396, November 2002.
- [93] S. G. Voronina, S. L. Barrow, O. V. Gerasimenko, O. H. Petersen and A. V. Tepikin, "Effects of Secretagogues and Bile Acids on Mitochondrial Membrane Potential of Pancreatic Acinar Cells: COMPARISON OF DIFFERENT MODES OF EVALUATING $\Delta\Psi_m^*$," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, p. 27327–27338, June 2004.

- [94] D. M. Booth, J. A. Murphy, R. Mukherjee, M. Awais, J. P. Neoptolemos, O. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin, O. H. Petersen, R. Sutton and D. N. Criddle, "Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells," *Gastroenterology*, vol. 140, p. 2116–2125, June 2011.
- [95] S. Peng, J. V. Gerasimenko, T. M. Tsugorka, O. Gryshchenko, S. Samarasinghe, O. H. Petersen and O. V. Gerasimenko, "Galactose protects against cell damage in mouse models of acute pancreatitis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 128, p. 3769–3778, August 2018.
- [96] *Tissue expression of GPT - Summary - The Human Protein Atlas.*
- [97] A. Zub, B. Manko ta V. Manko, «Screening of amino acids as a safe energy source for isolated rat pancreatic acin,» 2023.
- [98] A. Danielsson and J. Sehlin, "Transport and oxidation of amino acids and glucose in the isolated exocrine mouse pancreas: effects of insulin and pancreozymin," *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 91, p. 557–565, August 1974.
- [99] S. Kim, I. Sohn, J.-I. Ahn, K.-H. Lee, Y. S. Lee and Y. S. Lee, "Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model," *Gene*, vol. 340, p. 99–109, September 2004.
- [100] Y. He, T. Yang, Y. Du, L. Qin, F. Ma, Z. Wu, H. Ling, L. Yang, Z. Wang, Q. Zhou, G. Ge ta Y. Lu, «High fat diet significantly changed the global gene expression profile involved in hepatic drug metabolism and pharmacokinetic system in mice,» *Nutrition & Metabolism*, т. 17, p. 37, May 2020.
- [101] S. C. Woods, R. J. Seeley, P. A. Rushing, D. D'Alessio and P. Tso, "A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats," *The Journal of Nutrition*, vol. 133, p. 1081–1087, April 2003.

- [102] C. Nilsson, K. Raun, F.-f. Yan, M. O. Larsen and M. Tang-Christensen, "Laboratory animals as surrogate models of human obesity," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 33, p. 173–181, February 2012.
- [103] I. Preguiça, A. Alves, S. Nunes, R. Fernandes, P. Gomes, S. D. Viana and F. Reis, "Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—A guide to a translational perspective," *Obesity Reviews*, vol. 21, p. e13081, 2020.
- [104] R. S. Surwit, M. N. Feinglos, J. Rodin, A. Sutherland, A. E. Petro, E. C. Opara, C. M. Kuhn and M. Rebuffé-Scrive, "Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 44, p. 645–651, May 1995.
- [105] J. Ciapaite, S. J. L. Bakker, G. Van Eikenhorst, M. J. Wagner, T. Teerlink, C. G. Schalkwijk, M. Fodor, D. M. Ouwens, M. Diamant, R. J. Heine, H. V. Westerhoff and K. Krab, "Functioning of oxidative phosphorylation in liver mitochondria of high-fat diet fed rats," *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1772, p. 307–316, March 2007.
- [106] M.-X. Yan, Y.-Q. Li, M. Meng, H.-B. Ren and Y. Kou, "Long-term high-fat diet induces pancreatic injuries via pancreatic microcirculatory disturbances and oxidative stress in rats with hyperlipidemia," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 347, p. 192–199, August 2006.
- [107] A. Matsuda, N. Makino, T. Tozawa, N. Shirahata, T. Honda, Y. Ikeda, H. Sato, M. Ito, Y. Kakizaki, M. Akamatsu, Y. Ueno and S. Kawata, "Pancreatic fat accumulation, fibrosis, and acinar cell injury in the Zucker diabetic fatty rat fed a chronic high-fat diet," *Pancreas*, vol. 43, p. 735–743, July 2014.
- [108] A. Ruiz-Ramírez, M. Chávez-Salgado, J. A. Peñeda-Flores, E. Zapata, F. Masso ta M. El-Hafidi, «High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria,» *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, т. 301, p. E1198–E1207, December 2011.

- [109] P. Vancells Lujan, E. Viñas Esmel and E. Sacanella Meseguer, "Overview of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and the Role of Sugary Food Consumption and Other Dietary Components in Its Development," *Nutrients*, vol. 13, p. 1442, May 2021.
- [110] Y. Guo, M. Darshi, Y. Ma, G. A. Perkins, Z. Shen, K. J. Haushalter, R. Saito, A. Chen, Y. S. Lee, H. H. Patel, S. P. Briggs, M. H. Ellisman, J. M. Olefsky and S. S. Taylor, "Quantitative proteomic and functional analysis of liver mitochondria from high fat diet (HFD) diabetic mice," *Molecular & cellular proteomics: MCP*, vol. 12, p. 3744–3758, December 2013.
- [111] M. S. Petrov and R. Taylor, "Intra-pancreatic fat deposition: bringing hidden fat to the fore," *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 19, p. 153–168, March 2022.
- [112] P. Simon, F. U. Weiss, K. P. Zimmer, H. G. Koch and M. M. Lerch, "Acute and chronic pancreatitis in patients with inborn errors of metabolism," *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, vol. 1, p. 448–456, 2001.
- [113] D. N. Criddle, J. Murphy, G. Fistetto, S. Barrow, A. V. Tepikin, J. P. Neoptolemos, R. Sutton and O. H. Petersen, "Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis," *Gastroenterology*, vol. 130, p. 781–793, March 2006.
- [114] A. M. Silva and P. J. Oliveira, "Evaluation of Respiration with Clark-Type Electrode in Isolated Mitochondria and Permeabilized Animal Cells," *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1782, p. 7–29, 2018.
- [115] W. Strober, "Trypan blue exclusion test of cell viability," *Current Protocols in Immunology*, vol. Appendix 3, p. Appendix 3B, May 2001.

- [116] P. Kumar, A. Nagarajan and P. D. Uchil, "Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay," *Cold Spring Harbor Protocols*, vol. 2018, June 2018.
- [117] A. M. Rieger, K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk and D. R. Barreda, "Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death," *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, p. 2597, April 2011.
- [118] K. S. Hubbard, I. M. Gut, S. M. Scheeler, M. E. Lyman and P. M. McNutt, "Compatibility of SYTO 13 and Hoechst 33342 for longitudinal imaging of neuron viability and cell death," *BMC research notes*, vol. 5, p. 437, August 2012.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:

1. **Manko B.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> (Scopus). *(Здобувач виконав основну частину експериментальну досліджень, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
2. Zub A., **Manko B.V.**, Manko B.O., Manko V.V., Babsky A. Uncoupled respiration stability of isolated pancreatic acini as a novel functional test for cell vitality // Biologicni Studii. – 2023. – Vol. 17, № 3. – P. 243–252. – DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1703.735> (Scopus). *(Здобувач виконав експериментальну частину досліджень, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні й оформленні статті).*
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 B.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. – Р. 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.

Відомості про апробацію результатів дисертації:

1. II Міжнародна міждисциплінарна дослідницька конференції “Young Science Beyond Borders”, Польща, 1-2 червня 2023 р. (Польща, форма участі on line, 2023).
2. XIV, XVIII та XIX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів “Молодь і поступ біології”, Львів, 2018, 2022, 2023р. (очна форма участі, усна доповідь).
3. VIII Міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології», присвяченій 175-річчю кафедри фізіології та

анатомії людини та тварин Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, 2017. (усна доповідь)