

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА РІВЕНЬ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦІАЛУ МІТОХОНДРІЙ ЗА ДІЇ ЖОВЧЕВОЇ КИСЛОТИ TLC-S

Б. В. Манько

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: bohdan.manko.ablb@lnu.edu.ua*

Для з'ясування механізму дії жовчевої кислоти TLC-S досліджено виживаність ацинарних клітин підшлункової залози і рівень мембранного потенціалу мітохондрій за використання різних субстратів окиснення. Досліди проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 250–300 г. Суспензію ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози отримували за допомогою колагенази (тип IV, 0,2 мг/мл). Частка живих клітин після ізольовання становила > 90 %, що було оцінено за допомогою тесту з трипановим синім. Виживаність ацинарних клітин після тривалої інкубації у різних середовищах визначали за допомогою флуоресцентних барвників пропідій йодиду (0,5 мг/мл) та Hoechst 33258 (5 мг/мл). Мембранний потенціал мітохондрій реєстрували за додавання барвника TMRM (50 нмоль/л). Фотографували клітини інвертованим мікроскопом Olympus IX73 з цифровою камерою DP-74. Підрахунок забарвлених клітин і визначення інтенсивності флуоресценції TMRM здійснювали з використанням програмного забезпечення ImageJ. Встановлено, що наявність у середовищі TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л за використання як субстрату окиснення глюкози (10 ммоль/л), пірувату (2 ммоль/л) чи аланіну (2 ммоль/л) суттєво не впливало на частку живих клітин після 2 і 4 год інкубування. Коли ж до середовища додавали TLC-S у концентрації 2 ммоль/л, частка живих клітин значно зменшувалася. Це зменшення було найменшим за окиснення пірувату. За дії TLC-S (25 хв) у присутності лише глюкози мембранний потенціал мітохондрій зменшився на 9,8 % ($P < 0,05$, $n = 3$), 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. Наведені результати дають змогу припустити про наявність кількох різних механізмів негативної дії TLC-S на ацинарні клітини підшлункової залози: 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.

Ключові слова: жовчева кислота TLC-S (сульфат тауролітохолевої кислоти), піруват, аланін, ацинарні клітини підшлункової залози, виживаність, мембранний потенціал мітохондрій

Найпоширенішою формою гострого панкреатиту є біліарний панкреатит. Він виникає внаслідок того, що жовчне каміння закупорює сфінктер Одді та призводить до біліарно-панкреатичного рефлюксу [1].

Одним із чинників, який активує патологічні процеси в ацинарних клітинах підшлункової залози, що призводить до розвитку апоптозу чи некрозу, є, очевидно, жовчеві кислоти. Встановлено, що жовчева 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 деполаризацію внутрішньої мембрани

мітохондрій у значної частини ацинарних клітин підшлункової залози [2]. 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 [3]. Це супроводжується зниженням мітохондріального і цитозольного рівня АТФ (за 10 ммоль/л глюкози і 2 ммоль/л пірувату у позаклітинному розчині) [4], що негативно впливає на ацинарні клітини. Іншими дослідниками показано, що TLC-S індукує тривале підвищення концентрації Ca^{2+} у цитозолі й матриці мітохондрій, що призводить до дозозалежного збільшення процесів перекисного окиснення ліпідів, погіршення продукції АТФ, індукує апоптоз і некроз [5].

Точний механізм порушення функціонування мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози за дії жовчєвих 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 жовчєвих 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) [6]. Але як змінюється мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози під впливом жовчєвих кислот за окиснення різних субстратів, залишається недослідженим.

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

Матеріали та методи

Досліди проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 250–300 г. Тварин утримували за постійної кімнатної температури, з 12-годинним циклом освітлення, з вільним доступом до води та стандартного харчування (D-Mix, Україна). Усі процедури здійснювали згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях (Рада Європи № 123, Страсбург 1986). Експериментальні протоколи були затверджені комісією з питань догляду та використання тварин Львівського національного університету імені Івана Франка.

Суспензію ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози отримували за допомогою колагенази (тип IV, 0,2 мг/мл) [7]. Основний позаклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl_2 – 1,3, MgCl_2 – 1,0, HEPES – 10,0, глутамін – 2,0, натрію піруват – 2,0, глюкоза – 10,0; BSA – 2,5 мг/мл, соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл і добавку основних амінокислот MEM; pH 7,4. Усі реактиви були виробництва Sigma-Aldrich, якщо не зазначено інше. Клітини підраховували за допомогою гемоцитометра. Життєздатність клітин після ізолювання становила > 90 %, що було оцінено за допомогою тесту з трипановим синім.

Для дослідження виживаності ізольованих ацинарних клітин підшлункової залози спочатку їх преінкубували 30 хв у відповідному середовищі. У контролі базове середовище інкубації містило (ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl_2 – 1,3, MgCl_2 – 1,0, HEPES – 10,0, глюкоза – 10,0; BSA – 2,5 мг/мл, соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл. У частині випадків до базового середовища інкубації додавали піруват (2,0 ммоль/л) або аланін (2,0 ммоль/л). Після преінкубації до трьох середовищ (базового, піруватвмісного й аланінвмісного) додавали TLC-S у концентрації 0,5 або 2 ммоль/л і продовжували інкубацію усіх контрольних та дослідних зразків 2 або 4 год за температури 37 °C.

Вживаність ацинарних клітин після інкубації у різних середовищах визначали за допомогою інвертованого мікроскопа Olympus IX73 і цифрової камери DP-74 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). Популяцію клітин розділяли на дві групи: а) живі клітини – з низьким рівнем блакитної флуоресценції і незафарбованими ядрами; б) нежиттєздатні клітини – з високим рівнем блакитної флуоресценції (характерно для апоптозу) або низьким рівнем блакитної флуоресценції з яскраво-червоними ядрами (характерними для некрозу).

Мембранний потенціал мітохондрій реєстрували за додавання барвника тетраметилродамінметилестеру (TMRM) у концентрації 50 нмоль/л. Для цього ізольовані ацинарні клітини спочатку преінкубували 30 хв у базовому, піруватвмісному або аланінвмісному середовищі. Після преінкубації до дослідних зразків додавали TLC-S у концентрації 0,5 ммоль/л та інкубували ще 25 хв (із додаванням TMRM на 5-й хвилині інкубування до контрольних і дослідних зразків).

Підрахунок забарвлених клітин і визначення інтенсивності флуоресценції TMRM здійснювали з використанням програмного забезпечення ImageJ. Результати наведені як $M \pm m$. Достовірність різниці між вибірками встановлювали за Стьюдентом. Статистичний аналіз проводився за допомогою Microsoft Office Excel 2016.

Результати і їхнє обговорення

Наявність у середовищі жовчевої 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. 1 А–Б, Г) і чотирьох годин інкубації (рис. 1 Д).

Коли ж до середовища додавали TLC-S у концентрації 2 ммоль/л, частка живих клітин катастрофічно зменшувалася (рис. 1 В і Г). 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.

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.

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. 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.

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 [8], але достатньою для підтримання окисних процесів у мітохондріях. Попередніми дослідженнями показано, що такі амінокислоти, як глутамат, глутамін, аланін, лізин і аспарат здатні підтримувати високі швидкості роз'єданого дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів, а аргінін, гістидин і аспарагін – ні [9]. Було також встановлено [10], що ацинарні клітини підшлункової залози мишей віддають перевагу аланіну та лейцину перед глюкозою як субстратами для енергетичного метаболізму. Швидкість окислення глюкози у шматочках 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 [10].

У наших дослідженнях відносно високий відсоток ацинарних клітин, які вижили після 2 і 4 год інкубації у середовищі, що містило аланін (див. рис. 1), 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:

- 1) інгібуванням аланінамінотрансферази (АЛТ);
- 2) зменшенням рівня α -кетоглутарату;
- 3) 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 мало ймовірними, 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.

Отже, є кілька механізмів негативної дії TLC-S на ацинарні клітини підшлункової залози: за низьких концентрацій (або на початкових етапах дії) в її основі лежить порушення окиснення аланіну, що призводить до порушення генерування мембранного потенціалу мітохондрій, а за високих – порушення цілісності плазматичної і/чи внутрішньоклітинних мембран.

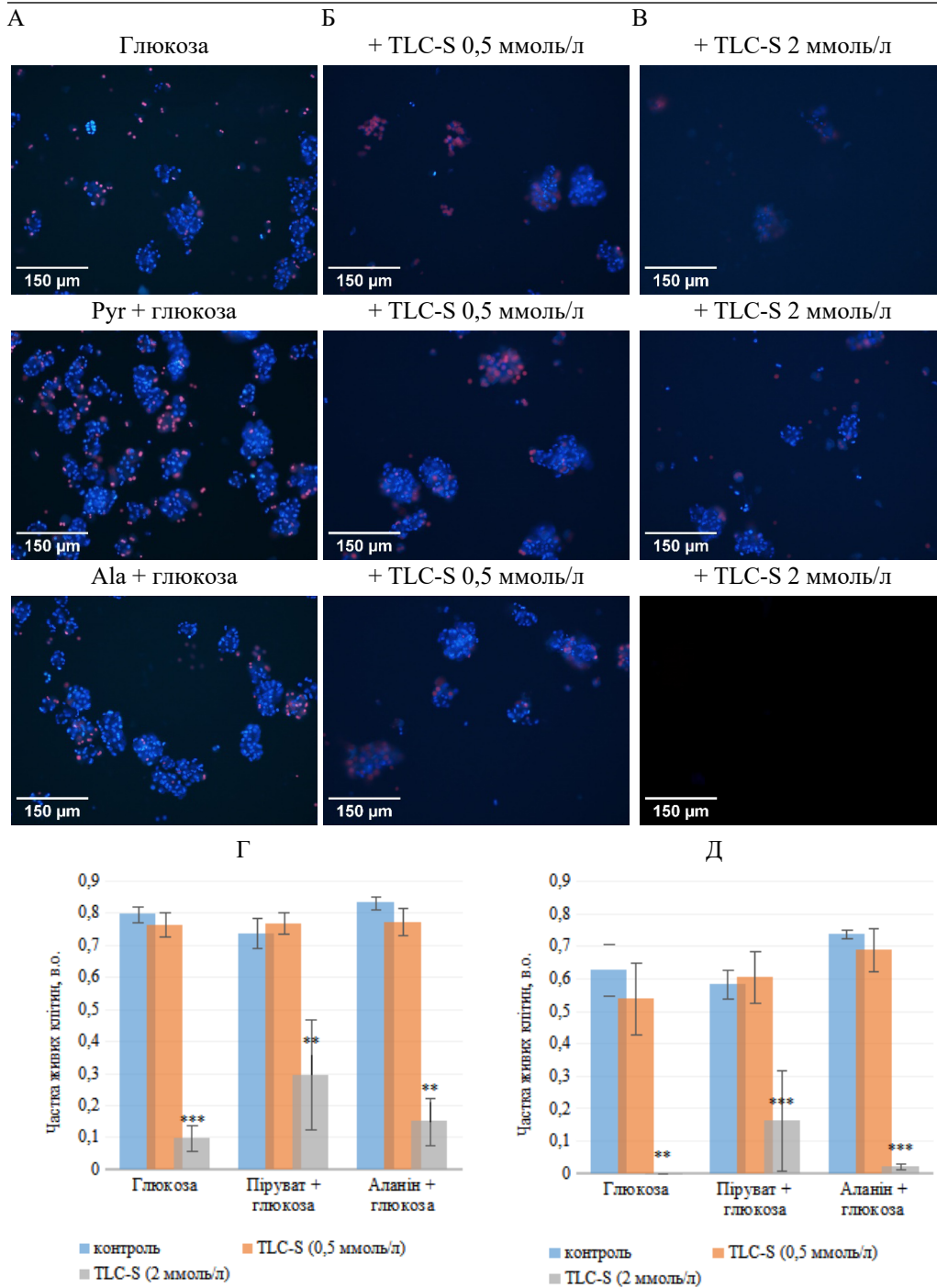


Рис. 1. Життєздатність ацинарних клітин підшлункової залози після інкубації з жовчевою кислотою TLC-S; А–В – фото клітин однієї серії, зафарбованих пропідій йодидом (0,5 мг/мл) та Hoechst 33342 (5 мг/мл), після преінкубації 2 год із різними субстратами окиснення у контролі (А)

та з TLC-S у концентрації 0,5 (Б) і 2 ммоль/л (В); Г і Д – залежність частки живих клітин від наявності субстратів окиснення і жовчевої кислоти після преінкубації 2 (Г) або 4 год (Д); [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 $P < 0,001$; $n = 3-4$

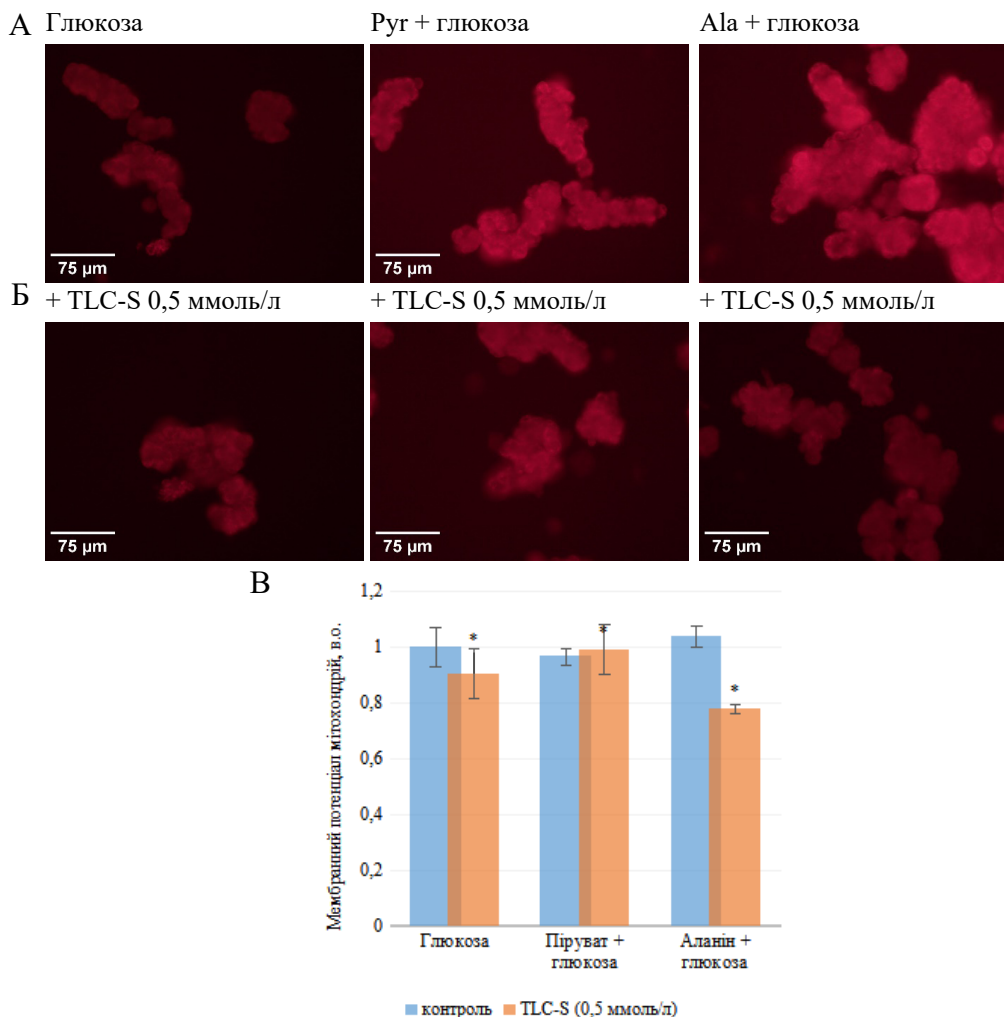


Рис. 2. Мембранний потенціал мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози після інкубації з жовчевою кислотою TLC-S; А – фото клітин, зафарбованих TMRM (50 нмоль/л), після преінкубації у контролі за наявності у середовищі лише глюкози, глюкози і пірувату чи глюкози і аланіну; Б – після преінкубації у відповідних середовищах із TLC-S; В – залежність мембранного потенціалу мітохондрій від складу середовища інкубації у контролі та після додавання жовчевої 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 $P < 0,05$; $n = 3-4$

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Modlin I. M., Kidd M., Hults C., Hinoue T.* Surgery of chronic pancreatitis: Chronicle of confusion and despair // *World J. Surg.* 2002. Vol. 26. P. 1382–1396.
2. *Voronina S. G., Barrow S. L., Gerasimenko O. V.* et al. Effects of secretagogues and bile acids on mitochondrial membrane potential of pancreatic acinar cells: comparison of different modes of evaluating DeltaPsim // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279 (26). P. 27327–27338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311698200>
3. *Voronina S., Longbottom R., Sutton R.* et al. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology // *J. Physiol.* 2002. Vol. 540. P. 49–55.
4. *Voronina S. G., Barrow S. L., Simpson A. W. M.* et al. Dynamic changes in cytosolic and mitochondrial ATP levels in pancreatic acinar cells // *Gastroenterol.* 2010. Vol. 138. P. 1976–1987.
5. *Booth D. M., Murphy J. A., Mukherjee R.* et al. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells // *Gastroenterol.* 2011. Vol. 140. P. 2116–2125.
6. *Peng S., Gerasimenko J. V., Tsugorka T. M.* et al. Galactose protects against cell damage in mouse models of acute pancreatitis // *J. Clin. Invest.* 2018. Vol. 128(9). P. 3769–3778.
7. *Williams J. A., Korc M., Dormer R. L.* Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini // *Am. J. Physiol.* 1978. Vol. 235. P. 517–524.
8. Tissue expression of GPT – Summary – The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000167701-GPT/tissue>
9. *Zub A. M., Manko B. O., Manko V. V.* Screening of amino acids as a safe energy source for isolated rat pancreatic acini. Preprint. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3153597/v1>
10. *Danielsson A., Sehlin J.* Transport and oxidation of amino acids and glucose in the isolated exocrine mouse pancreas: effects of insulin and pancreozymin // *Acta Physiologica Scandinavica.* 1974. Vol. 91. P. 557–565.

Стаття надійшла до редакції 28.08.23

доопрацьована 07.09.23

прийнята до друку 11.09.23

THE EFFECT OF BILE ACID TLC-S VITALITY OF PANTACRIC ACINARY CELLS AND LEVEL OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL**B. V. Manko**

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: bohdan.manko.ablb@lnu.edu.ua*

To investigate the mechanism of action of bile acids, TLC-S, the viability of pancreatic acinar cells, and the level of mitochondrial membrane potential were studied using various oxidation substrates. The experiments were conducted on male Wistar rats weighing 250–300 g. A suspension of isolated pancreatic acinar cells was obtained using collagenase (type IV, 0.2 mg/ml). The trypan blue exclusion test assessed cell viability after isolation and the amount was >90 %. The survival of acinar cells after prolonged incubation in different environments was determined by fluorescent dyes propidium iodide (0.5 mg/ml) and Hoechst 33258 (5 mg/ml) dyes. Mitochondrial membrane potential was recorded by adding the dye TMRM (50 nM). Cells were photographed using an inverted microscope Olympus IX73 with a digital camera DP-74. Cell counting and fluorescence intensity of TMRM were analyzed using ImageJ software. It was found that the presence of TLC-S in the medium at a concentration of 0.5 mmol/L, when used as an oxidation substrate for glucose (10 mmol/L), pyruvate (2 mmol/L), or alanine (2 mmol/L), did not significantly affect the proportion of live cells after 2 and 4 hours of incubation. However, when TLC-S was added to the medium at a concentration of 2 mmol/L, the proportion of live cells significantly decreased. This decrease was least pronounced during pyruvate oxidation. Under the action of TLC-S (after 25 min) in the presence of glucose alone, the mitochondrial membrane potential decreased by 9.8 % ($P < 0.05$, $n = 3$), in the presence of alanine (in the presence of glucose) – by 23.5 % ($P < 0.05$, $n = 4$). When pyruvate was added to the medium (in the presence of glucose), the mitochondrial membrane potential likely did not change significantly. These results suggest the presence of several different mechanisms of TLC-S's negative effects on pancreatic acinar cells: at low concentrations (or at early stages), it disrupts alanine transamination reactions, leading to the disruption of mitochondrial membrane potential generation, while at high concentrations, it affects the integrity of plasma and/or intracellular membranes.

Keywords: bile acid TLC-S (tauro lithocholic acid 3-sulfate), pyruvate, alanine, pancreatic acinar cells, survival, mitochondrial membrane potential