

ДИХАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ АЦИНУСІВ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ЩУРІВ

Б. Манько, Д. Волошин, В. Манько

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: mankobo@gmail.com*

З використанням електрода Кларка досліджено залежність дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів від умов перемішування їхньої суспензії у полярнографічній комірці. Суспензію ізольованих ацинусів отримували з використанням колагенази. Клітини у складі ізольованих ацинусів після виділення зберігали структурну і функціональну інтактність: 0,1%-ний розчин трипанового синього не фарбував понад 95% клітин препарату, а карбахолін у концентрації 1 чи 10 мкмоль/л стимулював їхню секрецію, внаслідок чого амілазна активність середовища інкубації зростала у 5 і 6,5 разу відповідно. Початкова швидкість дихання ацинусів була однаковою за обох способів перемішування суспензії, однак за використання магнітної мішалки суттєво знижувалася з часом. Протонофор FCCP збільшував швидкість дихання на 46,7 і 50,3% відповідно за використання магнітної та пропелерної мішалки. Водночас незначна за амплітудою інтенсифікація дихання внаслідок дії карбахоліну маскувалася плавним зниженням швидкості за використання магнітної мішалки, яке розвивається з часом і не залежить від вмісту O_2 . Отже, для адекватної реєстрації ефектів і аналізу дії різних регуляторів на швидкість дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози дослідження необхідно проводити за умови стабільності базальної швидкості споживання кисню. Цього можна досягнути, зокрема, використовуючи пропелерну мішалку.

Ключові слова: панкреатичні ацинуси, споживання кисню, карбахолін, магнітна мішалка, пропелерна мішалка.

Клітинне дихання є важливим процесом, за швидкістю якого можна судити про інтенсивність мітохондріальних окисних процесів. Останнім часом спостерігається зростання зацікавленості процесами дихання інтактних клітин [1, 2, 4, 7, 9]. Використання цілісних клітин дає змогу дослідити взаємозв'язки між диханням та іншими клітинними процесами, які неможливо встановити, використовуючи препарати ізольованих мітохондрій.

Ізольовані ацинарні панкреатичні **вже тривалий час використовують для дослідження** клітинного дихання [8, 10]. Але досі не проведено стандартизації умов дослідження дихання на ізольованих панкреатичних ацинусах, які є кращою моделлю, ніж ізольовані панкреатичні. Так, зокрема, ізольовані ацинуси є більш чутливі до дії секретогогів (наприклад, карбахоліну) [11] завдяки, мабуть, збереженню міжклітинних контактів і нативної орієнтації поляризованих клітин у їхньому складі. Тому нашою метою було дослідити закономірності споживання кисню суспензією ізольованих панкреатичних ацинусів за дії карбахоліну та різних умов перемішування суспензії.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Досліди виконували на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–300 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах

віварію за постійної температури на основному раціоні. Декапітацію наркотизованих хлороформом тварин здійснювали в лабораторії, ізольовано від інших.

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримували з використанням колагенази (тип 4, 220 од./мл) за модифікованим методом Вільямса і співавт. [11], як це описано раніше [9]. Клітини підраховували за допомогою камери Горяєва. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували трипановим синім (0,1%-ний розчин). Амілазну активність середовища інкубації ацинусів визначали за методом Каравея [5]. Після виділення ацинуса зберігали у базовому позаклітинному середовищі у відкритій конічній колбі за кімнатної температури, струшуючи з частотою 120 циклів за хв. У колбу подавали свіже повітря з-поза об'єму колби, як і під час інкубації з колагеназою.

Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом за допомогою установки, зібраної на базі електрода Кларка, полярографа YSI 5300, цифрового вольтметра, комп'ютера та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл, за температури 37°C.

У полярографічну комірку вносили суспензію інтактних панкреатичних ацинусів (приблизно 1,6–2 млн клітин) у базовому позаклітинному середовищі, що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl₂ – 1,3, MgCl₂ – 1,0, HEPES – 10,0, глюкоза – 10,0; БСА – 2,5 мг/мл; соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл; рН 7,4. Перемішування суспензії у полярографічній комірці здійснювали за допомогою магнітної або пропелерної мішалки (рис. 1). Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль O₂ [6].

Кожен експеримент повторювали як мінімум на трьох окремих препаратах ізольованих клітин, отриманих із різних тварин (n≥3). Необхідні статистичні розрахунки проводили за допомогою

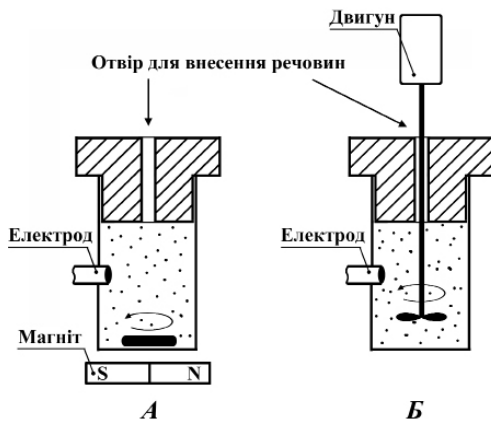
Рис. 1. Схема полярографічної комірки за використання магнітної (А) та пропелерної (Б) мішалок.

комп'ютера з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*. Цифрові результати подані як $M \pm m$. Вірогідність різниці середніх арифметичних двох вибірок (Р) визначали за парним t-тестом Стьюдента.

Результати і їхнє обговорення

Для оцінки структурної та функціональної інтактності клітин у складі ацинусів визначали проникність їхньої плазматичної мембрани й активність секретованої амілази. Після виділення частка трипан-негативних клітин у складі ацинусів становила понад 95%. Крім цього, амілазна активність середовища інкубації ізольованих ацинусів була незначною. Отже, в ході отримання препарату ацинусів плазматична мембрана абсолютної більшості клітин не порушується.

За дії карбахоліну в концентрації 0,1 мкмоль/л амілазна активність середовища інкубації ацинусів збільшилася приблизно удвічі, однак вірогідність цих змін не досягла першого рівня значимості (P=0,08, n=5; рис. 2). За концентрації карбахоліну 1 мкмоль/л амілазна активність середовища інкубації підвищувалася на 400%, а у концентрації 10 мкмоль/л – на 568% (P≤0,01, n=5; рис. 2). Ці дані близькі до отриманих іншими авторами [11].



Це дає нам підстави стверджувати, що клітини у складі ізолюваних ацинусів після їхнього виділення зберігають здатність відповідати секреторною активністю на дію карбахоліну.

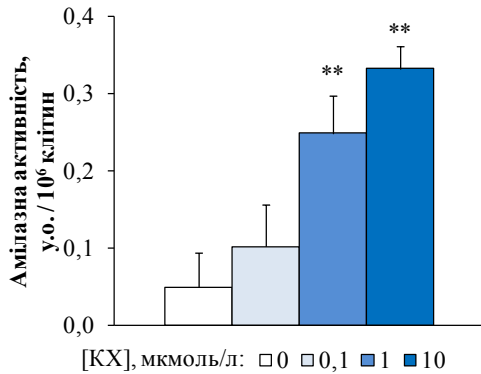


Рис. 2. Вплив карбахоліну на секретію амілази ізолюваними панкреатичними ацинусами: секретію амілази оцінювали за різницею між амілазною активністю середовища до та після 5 хв інкубації ацинусів з карбахоліном (КХ) за температури 37°C; ** – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P \leq 0,01$; $n=5$.

Підтвердженням функціональної нативності панкреатитів у складі отриманих ацинусів служить також і реєстрація їхнього дихання.

Початкова швидкість споживання кисню за перемішування суспензії ацинусів магнітною мішалкою становила $0,258 \pm 0,018$ нмоль O_2 / (с $\times 10^6$ клітин), $n=15$. Але з'ясувалося, що швидкість дихання суспензії ізолюваних ацинусів, як і ізолюваних ацинарних клітин підшлункової залози [10], залежить від вмісту O_2 у середовищі (або від тривалості досліду). На графіку залежності швидкості дихання суспензії ацинусів від вмісту O_2 у комірці (рис. 3) можна виділити кілька фаз. Протягом першої фази (від 270 до 210 нмоль O_2 у комірці) швидкість дихання суттєво не змінювалася. Після цього наставала фаза практично лінійного, але плавного, зниження швидкості дихання, яке тривало приблизно до 45 нмоль O_2 у середовищі. У діапазоні 45–8 нмоль відбувалось різке, практично до нуля, зниження швидкості дихання. Варто додати, що дихання пермеабілізованих ацинарних панкреатитів у діапазоні 270–45 нмоль O_2 взагалі не змінювалось [9].

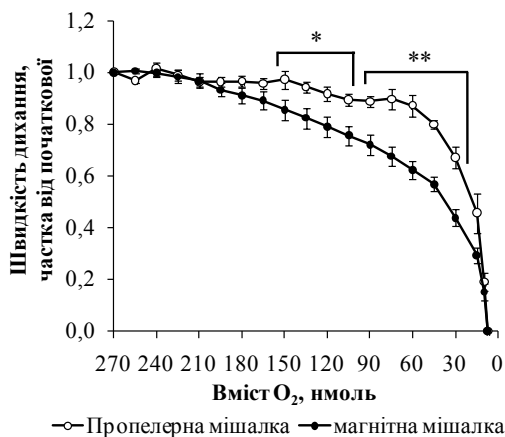


Рис. 3. Залежність швидкості споживання кисню інтактними ацинусами підшлункової залози від його вмісту в полярографічній комірці за різних способів перемішування суспензії; * – статистично вірогідна різниця з $P \leq 0,05$; ** – з $P \leq 0,01$; $n=3$ (магнітна мішалка) або 5 (пропелерна мішалка).

За використання пропелерної мішалки початкова швидкість споживання кисню виявилася такою самою і становила $0,264 \pm 0,019$ нмоль O_2 / (с $\times 10^6$ клітин), але залежність від вмісту O_2 у середовищі інкубації була дещо інакшою (рис. 3). Зокрема, перша фаза зниження швидкості дихання, яка тривала приблизно до 60 нмоль O_2 , була менш вираженою,

ніж за використання магнітної мішалки. Швидкість дихання у цій точці становила $87 \pm 4\%$ від початкової (за використання магнітної мішалки – лише $62 \pm 3\%$). Тобто, ця фаза в обох випадках є не стільки чутливою до вмісту O_2 у полярографічній комірці, скільки залежить від способу перемішування суспензії.

Друга фаза – фаза різкого зниження швидкості дихання – є однаковою за використання обох типів мішалок і спричинена, очевидно, сповільненням дифузії кисню у клітини за низького його вмісту у комірці. Отже, за використання пропелерної мішалки, на відміну від магнітної, швидкість дихання ізольованих панкреатичних ацинусів є відносно стабільною впродовж тривалого часу експерименту.

На наступному етапі ми порівняли вплив стимуляторів клітинного дихання на швидкість споживання кисню ізольованими панкреатичними ацинусами за різних способів перемішування суспензії. Внесення протонофора FCCP (за вмісту O_2 у комірці 240–180 нмоль) у концентрації 0,5 мкмоль/л спричинило значне збільшення швидкості дихання ацинусів в обох випадках: на 46,73% за використання магнітної мішалки ($P \leq 0,001$, $n=7$; рис. 4) і на 50,33% – за використання пропелерної ($P \leq 0,01$, $n=4$; рис. 4). Між ефектами FCCP не виявлено статистично вірогідної різниці. В обох випадках ефект FCCP суттєво не знижувався протягом O_2 -нечутливої фази дихання. Отже, спосіб перемішування суспензії ацинусів суттєво не впливає на інтенсивність FCCP-стимульованого дихання.

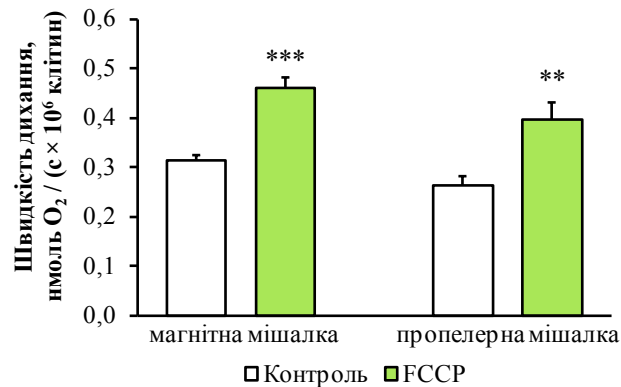


Рис. 4. Вплив FCCP на швидкість споживання кисню інтактними панкреатичними ацинусами за різних способів перемішування суспензії: ** – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P \leq 0,01$; *** – з $P \leq 0,001$; $n=7$ (за використання магнітної мішалки) та 4 (пропелерної мішалки).

Ефект FCCP є досить значним, виникає практично негайно після його внесення у комірку, тому немає практичної потреби здовжувати тривалість досліду. Як наслідок, використання магнітної мішалки суттєво не впливає на результати дослідження. Однак незначні зміни інтенсивності дихання можуть суттєво маскуватися і, таким чином, залежати від способу перемішування суспензії. Карбахолін, наприклад, інтенсифікує дихання зрізів підшлункової залози лише приблизно на 10% [3], внаслідок стимуляції секреторної активності ацинарних клітин і, відтак, зростання енергетичних потреб. Для дослідження впливу карбахоліну на дихання інтактних панкреатичних ацинусів за різних способів перемішування суспензії ми додавали його безпосередньо у полярографічну комірку в концентраціях 1 або 10 мкмоль/л.

Виявилось, що за використання магнітної мішалки карбахолін у концентрації 1 мкмоль/л не впливав на швидкість споживання кисню, принаймні, протягом 2–3 хв (рис. 5, В). Можливі пізніші ефекти карбахоліну в цьому експерименті виявити не вдалося – внаслідок,

цілком імовірно, зниження швидкості дихання суспензії ацинарних панкреатитів з часом. За дії карбахоліну в концентрації 10 мкмоль/л швидкість споживання кисню спочатку зростала – від $0,26 \pm 0,02$ до $0,32 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (с \times млн клітин), тобто на 23,44% ($P \leq 0,001$, $n=15$; рис. 5, А і В). Після першої фази інтенсифікації, яка тривала 33 ± 3 с, наступала фаза 2, котра характеризувалася зниженням швидкості дихання (рис. 5, А). У першу хвилину фази 2 зафіксовано різке зменшення швидкості споживання кисню до $0,25 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (с \times млн клітин), рис. 5, В. Надалі у цьому досліді швидкість продовжувала плавно знижуватися.

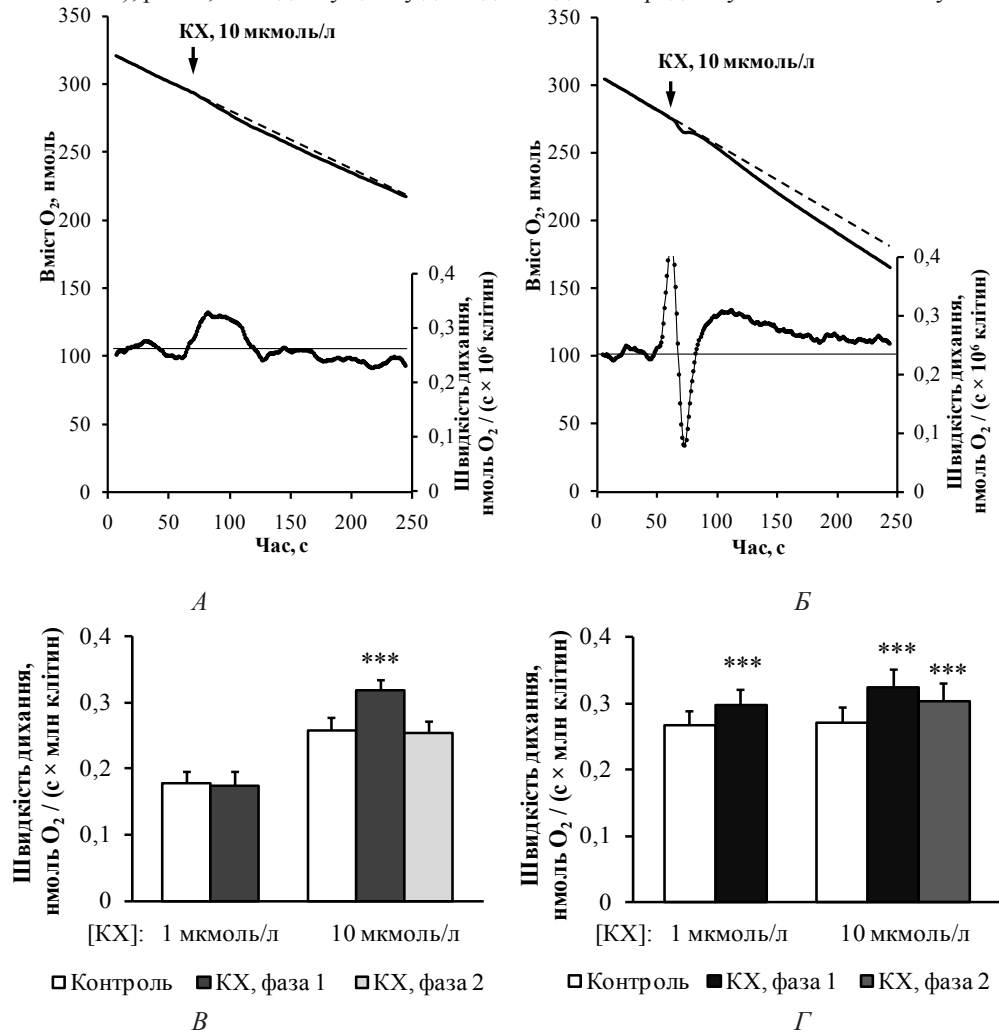


Рис. 5. Вплив карбахоліну на дихання ізолюваних ацинусів підшлункової залози; у комірку вносили 1 або 10 мкмоль/л карбахоліну (КХ); А, Б – оригінальний запис споживання кисню панкреатичними ацинусами (зверху) та розраховані миттєві швидкості дихання (знизу), тонка чорна лінія відображає середній рівень швидкості дихання у контролі; В, Г – усереднені значення, швидкість дихання у контролі розраховували як середню протягом 1 хв до внесення карбахоліну, у фазі 1 – як середню протягом тривалості фази, у фазі 2 – протягом 1 хв після завершення фази 1; за внесення 1 мкмоль/л карбахоліну фаза 2 не виникала; у досліді використовували магнітну (А, В) або пропелерну (Б, Г) мішалку; *** – статистично вірогідна різниця щодо контролю з $P \leq 0,001$; $n=3$ (В, 1 мкмоль/л) або 15 (В, 10 мкмоль/л), 8 (Г, 1 мкмоль/л) або 6 (Г, 10 мкмоль/л).

Трохи інші дані було отримано за використання пропелерної мішалки. Карбахолін у концентрації 1 мкмоль/л підвищував швидкість дихання на 11,54% ($P \leq 0,001$, $n=8$; рис. 5, Г), що тривало протягом усього досліджу. За внесення цього секретораго у вищій концентрації (10 мкмоль/л) зареєстровано початкову інтенсифікацію дихання на 20,14% ($P \leq 0,001$, $n=9$). У частині експериментів ($n=6$; ці дані представлені на рис. 5, Б, Г) приблизно через 1 хв спостерігалася друга фаза дії карбахоліну, тобто деяке зниження його стимулюючого впливу на дихання. Однак у цьому випадку, на відміну від дослідів із магнітною мішалкою, швидкість дихання залишалася вищою, ніж у контролі, на 11,51% ($P \leq 0,001$, $n=6$). У інших трьох експериментах друга фаза не виникала, тобто швидкість дихання суттєво не знижувалась.

Недоліком використання пропелерної мішалки є необхідність відкривати полярографічну комірку для внесення досліджуваних речовин, оскільки отвір для їхнього внесення зайнятий стрижнем пропелерної мішалки. Це призводить до виникнення досить значного артефакту дослідження у вигляді «стрибка» поглинання O_2 (рис. 5, Б), внаслідок порушення герметичності комірки та короточасного припинення перемішування. Щоб усунути цей артефакт, необхідно розділити канали для стрижня мішалки і внесення речовин.

Отже, використання пропелерної мішалки дало змогу виявити ті ефекти карбахоліну, які маскувалися поступовим зниженням інтенсивності дихання, спричиненим використанням магнітної мішалки. Таке зниження не перешкоджає дослідженню короточасних впливів речовин, що спричиняють сильну інтенсифікацію дихання (наприклад, FCCP), але не дає можливості адекватно дослідити динаміку незначних змін дихання. За описаного способу використання пропелерної мішалки можна досягти стабільності базальної швидкості споживання кисню ізольованими ацинусами підшлункової залози, що є необхідною умовою для адекватної реєстрації ефектів різних речовин-регуляторів і аналізу їх дії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Великопольська О. Ю., Манько Б. О., Манько В. В. Ендоплазматично-мітохондріальна Ca^{2+} -функціональна одиниця: залежність дихання секреторних клітин від активності ріанодин- та IP_3 -чутливих Ca^{2+} -каналів // Укр. біохім. журнал. 2012. Т. 84. № 5. С. 76–88.
2. Мерлавський В. М., Манько Б. О., Іккерт О. В., Манько В. В. Енергетичні процеси ізольованих гепатоцитів за різної тривалості дії інсуліну // Біологічні Студії / *Studia Biologica*. 2010. Т. 4. № 3. С. 15–22.
3. Bauduin H., Colin M., Dumont J. E. Energy sources for protein synthesis and enzymatic secretion in rat pancreas in vitro // *Biochim. Biophys. Acta*. 1969. Vol. 174. P. 722–733.
4. Brand M. D., Nicholls D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells // *Biochem. J*. 2011. Vol. 435. P. 297–312.
5. Caraway W. T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids // *Am. J. Clin. Pathol.* 1959. Vol. 32. P. 97–99.
6. Carpenter J. H. New measurements of oxygen solubility in pure and natural water // *Limnol. Oceanogr.* 1966. Vol. 11. P. 264–277.
7. Horbay R. O., Manko B. O., Manko V. V. et al. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma // *Cell Biol. Int.* 2012. Vol. 36. P. 71–77.
8. Kosowski H., Schild L., Kunz D., Halangk W. L. Energy metabolism in rat pancreatic acinar cells during anoxia and reoxygenation // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. Vol. 1367. P. 118–126.
9. Manko B. O., Klevets M. Yu., Manko V. V. An implication of novel methodology to study pancreatic acinar mitochondria under *in situ* conditions // *Cell biochem. funct.* 2012. DOI:

- 10.1002/cbf.2864.
10. Schulz H. U., Pross M., Meyer F. et al. Acinar cell respiration in experimental acute pancreatitis // Shock. 1995. Vol. 3. P. 184–188.
 11. 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.

Стаття: надійшла до редакції 27.12.12

доопрацьована 14.02.13

прийнята до друку 27.02.13

RESPIRATION OF ISOLATED ACINI OF RAT PANCREAS

B. Manko, D. Voloshyn, V. Manko

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: mankobo@gmail.com*

Dependence of respiration of isolated rat pancreatic acini on conditions of their suspension stirring in the polarographic cell was investigated using Clark electrode. The suspension of isolated acini was obtained using collagenase. Cells within isolated acini retained the structural and functional intactness after isolation: 0.1% solution of trypan blue did not stain more than 95% of the cells of the preparation, while carbachol in concentrations of 1 or 10 μM stimulated their secretion, resulting in 5- or 6.5-fold increase of amylase activity in the incubation medium, respectively. The initial respiration rate of acini was equal at both methods of suspension stirring, but due to application of a magnetic stirrer the rate significantly decreased with time. Protonophore FCCP increased the respiration rate by 46.7 and 50.3% while using a magnetic or propeller stirrer, respectively. However, the carbachol-induced intensification of respiration was masked by a smooth decline of the respiration rate at magnetic stirrer application. This decline develops over time and is not dependent on the content of O_2 in chamber. Thus, polarographic studies of isolated pancreatic acini should be conducted in conditions of stability of the basal oxygen consumption rate to adequately register and analyze effects of various regulators on the cellular respiration rate. This can be achieved, in particular, using propeller stirrer.

Keywords: pancreatic acini, oxygen consumption, carbachol, magnetic stirrer, propeller stirrer.

ДЫХАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ АЦИНУСОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫС

Б. Манько, Д. Волошин, В. Манько

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: mankobo@gmail.com*

С использованием электрода Кларка исследована зависимость дыхания изолированных ацинусов поджелудочной железы крыс от условий перемешивания

их суспензии в полярографической ячейке. Суспензию изолированных ацинусов получали с использованием коллагеназы. Клетки в составе изолированных ацинусов после выделения сохраняли структурную и функциональную интактность: 0,1%-ный раствор трипанового синего не красил более 95% клеток препарата, а карбахолин в концентрации 1 или 10 мкмоль/л стимулировал их секрецию, вследствие чего амилазная активность среды инкубации увеличилась в 5 и 6,5 раза соответственно. Начальная скорость дыхания ацинусов была одинаковой при обоих способах перемешивания суспензии, однако при использовании магнитной мешалки существенно снижалась со временем. Протонофор FCCP увеличивал скорость дыхания на 46,7 и 50,3% соответственно при использовании магнитной и пропеллерной мешалки. В то же время незначительная по амплитуде интенсификация дыхания вследствие действия карбахолина маскировалась плавным снижением скорости при использовании магнитной мешалки, которое развивается со временем и не зависит от содержания O_2 . Итак, для адекватной регистрации эффектов и анализа воздействия различных регуляторов на скорость дыхания изолированных ацинусов поджелудочной железы исследования необходимо проводить при условии стабильности базальной скорости потребления кислорода. Этого можно достичь, в частности, используя пропеллерную мешалку.

Ключевые слова: панкреатические ацинусы, потребление кислорода, карбахолин, магнитная мешалка, пропеллерная мешалка.