

ПОШУК ОПТИМАЛЬНИХ КОМБІНАЦІЙ АЛАНІНУ, ПІРУВАТУ І ГЛУТАМАТУ ДЛЯ ДОСЯГНЕННЯ МАКСИМАЛЬНОЇ ШВИДКОСТІ РОЗ'ЄДНАНОГО ДИХАННЯ АЦИНАРНИХ КЛІТИН ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ

А. Абрамович, Б. В. Манько, Б. О. Манько, О. Іккерт

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

Відомо, що такі субстрати окиснення як аланін, піруват і глутамат здатні здійснювати позитивний вплив на ацинарні клітини підшлункової залози, інтенсифікуючи проходження в них мітохондріальних процесів. Тому мета нашого дослідження – з'ясувати, чи буде використання різних комбінацій субстратів, а саме аланіну, глутамату і пірувату в середовищі інкубації, покращувати показники максимальної швидкості роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози сильніше, ніж вплив кожного субстрату окремо.

Дослідження проводили на щурах-самцях масою 250–300 г. Ізолювання панкреатичних ацинусів проводили модифікованим методом Вільямса і співавторів. Швидкість споживання кисню клітинами визначали за допомогою полярографа RC650 6-cell respirometer (Strathkelvin). Ацинарні клітини підшлункової залози інкубували протягом 15 хв у розчині глюкози з окремими субстратами окиснення (аланіном, глутаматом, піруватом у концентраціях 2 ммоль/л) або їхніми комбінаціями. Після внесення ацинарних клітин у полярографічні комірки та реєстрації базального дихання кожні 1–2 хв додавали протонофор FCCP у концентраціях 0,5; 1; 1,5 і 2 мкмоль/л.

Максимальну швидкість дихання за окиснення пірувату досягали за дії FCCP у концентрації 1 мкмоль/л, а за окиснення глутамату – за дії FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л. Аланін підвищував швидкість дихання, порівняно з контролем, лише за наявності роз'єднувача у концентрації 2 мкмоль/л.

За окиснення комбінації аланіну з піруватом максимальну швидкість дихання ацинарних клітин спостерігали за наявності FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л. Порівняно з контролем, комбінація аланіну з глутаматом найбільше підвищувала швидкість споживання кисню за дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л. Лише комбінація глутамату з піруватом зумовлювала суттєве статистично достовірне зростання швидкості клітинного дихання, порівняно з контролем.

Ключові слова: амінокислоти, клітинне дихання, панкреатичні ацинарні клітини

Ацинарні клітини підшлункової залози здатні підтримувати дуже високий рівень синтезу білка, оскільки їм необхідно синтезувати велику кількість травних ферментів [1]. Для виконання цієї функції в ацинарних клітинах виявлено багато систем, які транспортують амінокислоти з крові [12]. Окрім цього, функція ацинарних клітин дуже залежить від достатнього енергопостачання і, відповідно, від правильного перебігу мітохондріального енергетичного метаболізму [7]. Тому пошкодження мітохондрій і порушення процесів клітинного дихання й окисного фосфорилування можуть призводити до розвитку різних захворювань підшлункової залози, зокрема, панкреатиту [4; 5].

Останніми роками досліджено вплив низки субстратів на життєздатність і підтримання мітохондріальних процесів ацинарних клітин підшлункової залози за норми та патології. Наприклад, вважається, що глутамін може мати трофічний ефект на екзокринну частину підшлункової залози та на тонкий кишечник під час недоїдання [2]. Було показано також, що вживання глутаміну може бути корисним для пацієнтів із гострим панкреатитом, оскільки глутамін знижує смертність і полегшує перебіг хвороби [13]. Крім того, встановлено, що глутамін може запобігати некрозові клітин і мітохондріальній деполаризації внаслідок дії етанолу та холецистокініну [8], а комбінація глюкози, пірувату і глутаміну може забезпечувати оптимальну адаптивну дихальну реакцію на деполаризацію мембрани, спричинену протонофором [9]. Однак є і суперечливі дані стосовно ефекту глутаміну, оскільки за довготривалої інкубації *in vitro* застосування глутаміну з високою концентрацією (20 ммоль/л) давало токсичний ефект на ацинарні клітини підшлункової залози, спричиняючи в них блебінг і суттєвий набряк [16].

Відомо, що ацинарні клітини здатні активно перетворювати глутамін у глутамат, який далі секретується у складі підшлункового соку [2]. До того ж з'ясовано, що концентрація глутамату в підшлунковому соці щурів набагато перевищувала концентрації всіх інших амінокислот і була втричі вищою за концентрацію глутамату в плазмі [3]. Окрім цього, на відміну від глутаміну, глутамат у високій концентрації не спричиняв морфологічних змін ацинарних клітин за довготривалої інкубації та загалом здійснював на них менш токсичний ефект [16].

Піруват є ще однією сполукою, яку активно досліджують у контексті її дії на панкреатичні ацинарні клітини. Наприклад, за дії алкогольних метаболітів або аспарагінази піруват забезпечував суттєвий захист від втрати АТФ і некрозу [14]. Піруват підвищував швидкість дихання ацинарних клітин за стимуляції холецистокініном, а також захищав їх від некрозу, викликаного холецистокініном і етанолом [8]. Крім того, його похідна форма, етилпіруват, покращувала виживаність ацинарних клітин під час експериментальної моделі гострого некротизуючого панкреатиту, викликаного ін'єкцією жовчних солей у білопанкреатичну протоку щурів, порівняно з контролем [6].

На сьогодні мало відомо про вплив аланіну на ацинарні клітини підшлункової залози. Однак експериментально показано, що аланін є безпечним і ефективним джерелом енергії для мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози [16], а раннє лікування дипептидом аланіл-глутаміном давало кращі клінічні результати у пацієнтів із гострим панкреатитом [11].

Максимальна швидкість роз'єданого дихання є одним із важливих критеріїв оцінки адаптаційної здатності мітохондрій. Для оцінки максимальної швидкості роз'єданого дихання зазвичай використовують роз'єднувачі процесів дихання й окисного фосфорилування, такі як CCCP та FCCP [10]. Ці сполуки є протонофорами, тобто вони здатні переносити йони H^+ крізь внутрішню мітохондріальну мембрану, внаслідок чого порушується мембранний потенціал мітохондрій та інтенсифікується клітинне дихання, оскільки четвертий комплекс дихального ланцюга починає максимально споживати кисень. У зв'язку з цим під час дослідження клітинного дихання протонофори зазвичай додають поетапно малими концентраціями для того, щоб досягти його максимального ефекту на швидкість поглинання кисню [7].

Враховуючи вищесказане, мета нашого дослідження – з'ясувати, чи буде використання різних комбінацій субстратів, а саме аланіну, глутамату і пірувату в середовищі інкубації, покращувати показники максимальної швидкості роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози сильніше, ніж вплив кожного субстрату окремо.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Рада Європи № 123, Страсбург 1985) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (стаття 26, розділ III). Протоколи експериментів затверджено Комітетом з догляду та використання тварин Львівського національного університету імені Івана Франка. В експериментах використовували щурів-самців лінії Wistar масою 250–300 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної кімнатної температури, з 12-годинним циклом освітлення і з вільним доступом до води та стандартного корму (D-Мікс, Україна). Безпосередньо перед експериментом тварини голодували 12–18 год, маючи вільний доступ до води. Перед декапітацією щурів наркотизували хлороформом, а після неї відразу ізолювали панкреатичні ацинуси. Усі реактиви були отримані від Sigma-Aldrich (Merck).

Суспензію ізольованих панкреатичних ацинусів отримували згідно з модифікованим методом Вільямса та співавторів [15], з використанням ферменту колагенази (тип 4, 0,2 мг/мл), який додавали до зовнішньоклітинного розчину. Виділені ацинуси підшлункової залози інкубували у базовому позаклітинному середовищі, що містило: NaCl – 140,0 ммоль/л; KCl – 4,7 ммоль/л; CaCl₂ – 1,3 ммоль/л; MgCl₂ – 1,0 ммоль/л; HEPES – 10,0 ммоль/л; глутамін – 2,0 ммоль/л; натрій піруват – 2,0 ммоль/л; глюкозу – 10,0 ммоль/л; BSA (бичачий сироватковий альбумін) – 2,5 мг/мл; соєвий інгібітор трипсину – 0,1 мг/мл; рН доводили до 7,4. Підрахунок кількості живих і мертвих клітин здійснювали за допомогою камери Горяєва (гемоцитометр). Для розрізнення клітин із пошкодженими і цілісними мембранами їх фарбували розчином трипанового синього (0,1 %). Кількість живих клітин становила не менше 95 %.

Визначення швидкості споживання кисню ізольованими ацинусами підшлункової залози здійснювали за допомогою полярографа RC650 6-cell respirometer (Strathkelvin Instruments, Велика Британія). Як вимірювальний електрод застосовували електрод Кларка. Перед проведенням вимірювання суспензію виділених ацинусів інкубували 15 хв за 37 °C у розчині глюкози з окремими субстратами окиснення та їхніми комбінаціями. За допомогою шприца Гамільтона кожні 1–2 хв в полярографічні комірки додавали протонатор карбонілціанід-*p*-трифторметоксифенілгідразон (FCCP) у концентраціях 0,5; 1; 1,5 та 2 мкмоль/л для досягнення максимальної швидкості споживання кисню.

Кожну серію досліджень здійснювали як мінімум у п'яти повторях на препаратах ацинарних клітин підшлункової залози, отриманих із різних тварин. Аналіз кривих записів споживання дихання проводили автоматично за допомогою авторського алгоритму, написаного на мові програмування Python. Результати представлені як середнє ± стандартна похибка середнього арифметичного. Статистичний аналіз здійснено за допомогою програмного забезпечення Origin Pro 2018.

Статистичну різницю між групами визначено за допомогою двофакторного аналізу ANOVA з повторюваними вимірюваннями з подальшими post-hoc t-тестами з корекцією Голм-Бонферроні, у разі значної взаємодії між факторами; t-тест Стьюдента використовували у разі порівняння тільки двох груп даних.

Результати і їхнє обговорення

Відповідно до мети нашої роботи ми оцінювали функціональну здатність мітохондрій ацинарних клітин підшлункової залози щурів за двома параметрами – оптимальною концентрацією FCCP і максимальною швидкістю роз'єданого дихання. Зважаючи на те, що аланін, піруват і глутамат мають потенційний вплив на процеси

мітохондріального дихання і показана їхня ефективність [8, 16], на першому етапі наших досліджень ми оцінили швидкості поглинання кисню ізольованими ацинарними клітинами за дії протонофору FCCP у різних концентраціях за окиснення кожного субстрату окремо. Глюкоза є стандартним субстратом окиснення, оскільки клітини застосовують її як основне джерело енергії для підтримання життєдіяльності, тому ми використали показники базального і стимульованого дихання клітин, які інкубували у глюкозному розчині, як контроль. Крім того, ми порівнювали базальну та FCCP-стимульовану швидкості споживання кисню за окиснення кожного субстрату.

У результаті показано, що за окиснення аланіну в концентрації 2 ммоль/л у середовищі інкубації та FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози збільшилася майже на 94 % ($0,35 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,001$), порівняно зі швидкістю базального дихання ($0,18 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с). Після додавання роз'єднувача у концентраціях 1 та 1,5 мкмоль/л швидкість дихання клітин зросла на 176 % ($0,5 \pm 0,04$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,001$) та на 184 % ($0,52 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,001$) відповідно, а після додавання FCCP у концентрації 2 мкмоль/л – лише на 110 % ($0,38 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=5$, $P \leq 0,01$). Отже, максимальну швидкість дихання за наявності аланіну спостерігали за дії FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л (рис. 1).

Якщо порівнювати показники швидкостей дихання контрольних клітин, які інкубували лише в розчині глюкози (10 ммоль/л), та клітин, субстратом окиснення яких був аланін, то за наявності аланіну швидкість дихання зростала на 21 % тільки за дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л ($n=5$, $P \leq 0,05$). За дії FCCP у нижчих концентраціях спостерігали тенденцію до зменшення швидкості дихання, порівняно з контролем, тоді як базальна швидкість дихання за наявності аланіну незначно зростала (рис. 1).

Максимальне середнє значення швидкості дихання за окиснення аланіну ($0,55 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) не відрізнялося від контролю ($0,57 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с). Середнє значення коефіцієнта стабільності, який визначали за формулою $(V_{1,5} + V_{2,0}) / (V_{0,5} + V_{1,0})$, де $V_{0,5}$, $V_{1,0}$, $V_{1,5}$, $V_{2,0}$ – швидкості дихання за дії FCCP у концентраціях 0,5; 1; 1,5 і 2 мкмоль/л [17], за окиснення аланіну дорівнювало 0,95 ($n=7$), а це означає, що високі концентрації протонофора інгібували процес клітинного дихання.

За наявності пірувату в концентрації 2 ммоль/л як додаткового субстрату окиснення додавання FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л збільшувало швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози на 98 % ($0,4 \pm 0,05$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=5$, $P \leq 0,01$), порівняно з базальним диханням ($0,2 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с). Додавання FCCP у концентрації 1 мкмоль/л збільшило цей показник вже на 180 % ($0,57 \pm 0,07$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=5$, $P \leq 0,01$), а в концентрації 1,5 мкмоль/л – на 160 % ($0,53 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=5$, $P \leq 0,001$). FCCP у концентрації 2 мкмоль/л збільшував швидкість дихання лише на 69 % ($0,34 \pm 0,04$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с). Отже, максимальну швидкість дихання за наявності пірувату спостерігали за дії FCCP у концентрації 1 мкмоль/л (рис. 1).

Порівняно з контрольними клітинами, субстратом окиснення яких була глюкоза (10 ммоль/л), за наявності пірувату спостерігали тенденцію до незначного збільшення швидкості дихання ацинарних клітин за дії FCCP у концентраціях 0,5; 1 та 2 мкмоль/л. Базальна швидкість дихання за окиснення пірувату також зростала. Тільки за дії FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л швидкість дихання за наявності пірувату трохи зменшувалась (рис. 1).

Максимальне середнє значення швидкості дихання за окиснення пірувату ($0,59 \pm 0,06$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)) перебувало в межах контролю ($0,57 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)). Середнє значення коефіцієнта стабільності за окиснення пірувату становило $0,89$ ($n=5$), а це означає, що високі концентрації протонофора інгібували процес клітинного дихання.

За наявності глутамату в концентрації 2 мкмоль/л у середовищі інкубації та FCCP у концентрації $0,5$ мкмоль/л швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози збільшилася на 105% ($0,35 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)) ($n=7$, $P \leq 0,001$), порівняно з базальною швидкістю дихання ($0,17 \pm 0,01$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)). За дії FCCP у концентраціях 1 та $1,5$ мкмоль/л швидкість дихання зросла вже на 220% ($0,56 \pm 0,04$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)) ($n=7$, $P \leq 0,001$) та 227% ($0,57 \pm 0,02$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)) ($n=7$, $P \leq 0,001$) відповідно. Остання концентрація роз'єднувача, 2 мкмоль/л, збільшувала швидкість дихання ацинарних клітин лише на 104% ($0,35 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)) ($n=7$, $P \leq 0,01$). Отже, максимальну швидкість дихання за наявності глутамату спостерігали за дії FCCP у концентрації $1,5$ мкмоль/л (рис. 1).

Порівняно з показниками дихання контрольних клітин, субстратом окиснення яких була тільки глюкоза (10 мкмоль/л), швидкість дихання клітин за наявності глутамату незначно зростала за дії FCCP у концентраціях 1 ; $1,5$ та 2 мкмоль/л, тоді як за дії FCCP у концентрації $0,5$ мкмоль/л швидкість дихання клітин майже не змінювалась. Базальне дихання за окиснення глутамату трохи зменшувалося порівняно з базальним диханням контрольних клітин (рис. 1).

Максимальне середнє значення швидкості дихання за окиснення глутамату ($0,6 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)) також не відрізнялося від контролю ($0,57 \pm 0,03$ нмоль O_2 / (млн. клітин \times с)). Середнє значення коефіцієнта стабільності за окиснення глутамату дорівнювало $1,04$ ($n=7$), тобто показники швидкості дихання залишалися стабільними протягом усієї тривалості запису.

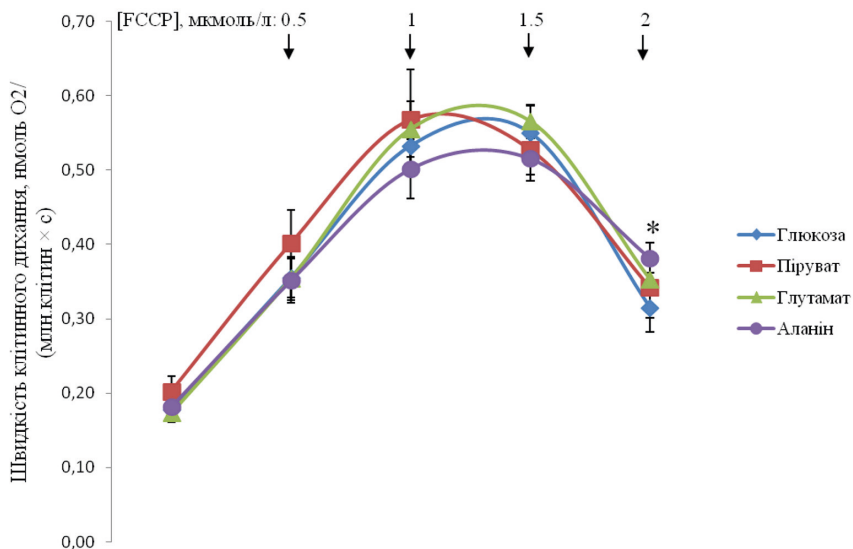


Рис. 1. Швидкості базального та роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення глюкози, пірувату, глутамату й аланіну. $P \leq 0,05$; * – встановлено статистично вірогідну різницю щодо контролю, тобто дихання за окиснення глюкози

На наступному етапі досліджень ми оцінювали ті самі параметри (оптимальну концентрацію FCCP і максимальну швидкість роз'єданого дихання) за комбінації двох субстратів, зокрема, аланіну з піруватом, аланіну з глутаматом і глутамату з піруватом.

За наявності комбінації аланіну (2 ммоль/л) з піруватом (2 ммоль/л) у середовищі інкубації швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози за дії FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л зросла на 95 % ($0,36 \pm 0,03$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,001$), порівняно з базальною швидкістю дихання ($0,18 \pm 0,02$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с)). Після додавання FCCP у концентрації 1 мкмоль/л швидкість дихання зростала вже на 198 % ($0,55 \pm 0,04$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,001$), а після концентрації 1,5 мкмоль/л – вже на 217 % ($0,58 \pm 0,04$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,001$). За дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л швидкість дихання зростала на 153 % ($0,46 \pm 0,03$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,001$). Отже, максимальну швидкість дихання за використання комбінації аланіну з піруватом спостерігали за дії FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л (рис. 2).

Порівняно з показниками швидкостей дихання контрольних клітин, наявність аланіну і пірувату за дії FCCP у концентраціях 0,5; 1 та 1,5 мкмоль/л зумовлювала тенденцію до незначного зростання швидкості дихання. Але за дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л швидкість дихання ацинарних клітин у середовищі з аланіном і піруватом зростала вже суттєво, порівняно з контрольними клітинами. Також спостерігали незначне збільшення базальної швидкості дихання за наявності цих субстратів (рис. 2).

Максимальне середнє значення швидкості дихання за окиснення комбінації аланіну з піруватом ($0,6 \pm 0,09$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) не відрізнялося від контролю ($0,57 \pm 0,03$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с)). Середнє значення коефіцієнта стабільності за окиснення аланіну з піруватом становило 1,12 ($n=7$). Тобто за цих умов показники швидкості дихання продовжували зростати після додавання високих концентрацій FCCP. Можна зробити висновок, що аланін і піруват не давали синергійного ефекту на ацинарні клітини підшлункової залози.

За наявності комбінації аланіну (2 ммоль/л) з глутаматом (2 ммоль/л) у середовищі інкубації швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози за дії FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л зростала на 97 % ($0,37 \pm 0,03$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,001$), порівняно з базальною швидкістю дихання ($0,19 \pm 0,02$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с)). Додавання FCCP у концентраціях 1 та 1,5 мкмоль/л спричиняло збільшення швидкості дихання на 174 % ($0,52 \pm 0,03$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,001$) та 173,6 % ($0,52 \pm 0,04$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,001$) відповідно, а у концентрації 2 мкмоль/л – на 123 % ($0,42 \pm 0,04$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) ($n=7$, $P \leq 0,01$). Отже, за окиснення аланіну і глутамату максимальнє значення швидкості дихання спостерігали за дії FCCP у концентрації 1 мкмоль/л (рис. 2).

Порівняно з контрольними клітинами, за окиснення аланіну й глутамату і за дії FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л швидкість дихання клітин незначно зростала, а за дії FCCP у концентраціях 1 та 1,5 мкмоль/л спостерігали тенденцію, навпаки, до зниження швидкості дихання. Тільки за дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л швидкість дихання суттєво зростала, порівняно з контролем. Базальна швидкість дихання за наявності цієї комбінації субстратів зросла незначно, порівняно зі швидкістю дихання контрольних клітин (рис. 2).

Максимальнє середнє значення швидкості дихання за окиснення комбінації аланіну з глутаматом ($0,56 \pm 0,04$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с) не відрізнялося від контрольного ($0,57 \pm 0,03$ нмоль O₂/ (млн. клітин × с)). Середнє значення коефіцієнта стабільності

за окиснення аланіну з глутаматом становило 1,02 ($n=7$), тобто за цих умов показники швидкості дихання залишалися стабільними протягом усього запису споживання кисню клітинами.

За наявності комбінації глутамату (2 ммоль/л) з піруватом (2 ммоль/л) та роз'єднувача FCCP у концентрації 0,5 мкмоль/л, швидкість дихання ацинарних клітин підшлункової залози збільшилася на 92 % ($0,38 \pm 0,02$ ммоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,001$), порівняно з базальною швидкістю дихання ($0,2 \pm 0,01$ ммоль O_2 / (млн. клітин \times с). Додавання FCCP у концентрації 1 мкмоль/л спричинило збільшення швидкості дихання на 192 % ($0,58 \pm 0,02$ ммоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,001$), а у концентрації 1,5 мкмоль/л – вже на 225 % ($0,64 \pm 0,04$ ммоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,001$). За дії FCCP у концентрації 2 мкмоль/л швидкість дихання зросла на 119 % ($0,43 \pm 0,01$ ммоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,001$). Отже, максимальну швидкість дихання за наявності комбінації глутамату з піруватом спостерігали за дії FCCP у концентрації 1,5 мкмоль/л (рис. 2).

Порівняно з контрольними клітинами, наявність комбінації глутамату з піруватом за дії FCCP у концентраціях 0,5 та 1 мкмоль/л зумовлювала незначне зростання швидкості клітинного дихання. За дії наступних двох концентрацій FCCP, 1,5 та 2 мкмоль/л, швидкість дихання за окиснення глутамату і пірувату зростала на 16 ($n=7$, $P \leq 0,05$) та 37 % ($n=7$, $P \leq 0,05$), відповідно, порівняно з контролем. Швидкість базального дихання за наявності цієї комбінації також зростала на 11 %, порівняно зі швидкістю базального дихання контрольних клітин ($n=7$, $P \leq 0,05$) (рис. 2).

Максимальне середнє значення швидкості дихання за окиснення комбінації глутамату з піруватом ($0,65 \pm 0,03$ ммоль O_2 / (млн. клітин \times с) було на 14,8 % вищим за контрольне ($0,57 \pm 0,03$ ммоль O_2 / (млн. клітин \times с) ($n=7$, $P \leq 0,01$). Середнє значення коефіцієнта стабільності за окиснення глутамату з піруватом становило 1,13. Це означає, що за цих умов показники швидкості дихання продовжували зростати після додавання високих концентрацій FCCP. Тому можна зробити висновок, що комбінація глутамату з піруватом статистично достовірно здатна ефективніше посилювати мітохондріальні процеси, ніж ці субстрати окремо.

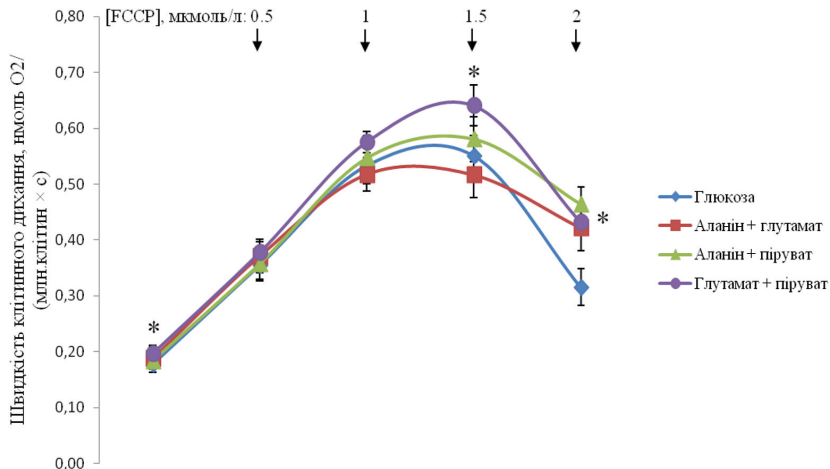


Рис. 2. Швидкості базального та роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози за окиснення глюкози, комбінації аланіну та пірувату, аланіну і глутамату, глутамату й пірувату. $P \leq 0,05$; * – встановлено статистично вірогідну різницю щодо контролю, тобто дихання за окиснення глюкози

Ми встановили, що серед досліджуваних комбінацій субстратів окиснення саме комбінація глутамату з піруватом мала статистично достовірний суттєвий позитивний вплив на дихання ацинарних клітин підшлункової залози, порівняно з контролем та окремою дією цих субстратів. Ймовірно, прояв синергійного ефекту саме глутамату з піруватом пов'язаний із тим, що ці два субстрати найшвидше вступають у цикл Кребса на різних його етапах (піруват – через окиснення до ацетил-КоА, а глутамат – через перетворення до α -кетоглутарату), на відміну від аланіну, який має ще перетворитися на піруват. Комбінація аланіну і глутамату не впливала на швидкості дихання ацинарних клітин, порівняно з контролем, тоді як комбінація аланіну з піруватом зумовлювала лише слабкий позитивний ефект.

На відміну від попередніх даних [16], аланін у цій серії експериментів не покращував енергетичні процеси ацинарних клітин підшлункової залози. Це можна пояснити використанням меншої концентрації аланіну (2 ммоль/л), ніж та, яку застосовували раніше (20 ммоль/л). Згідно з отриманими даними, ефект глутамату був нижчим, ніж у попередніх експериментах, де навіть за використання глутамату в концентрації 1 ммоль/л спостерігали значне зростання швидкості дихання [16]. Крім того, в наших експериментах клітини краще споживали кисень за окиснення глюкози, ніж у попередніх дослідях. Можливо, це було пов'язано з вищою життєздатністю отриманих препаратів клітин, оскільки середня кількість живих клітин за оцінюванням з використанням барвника трипанового синього сягала $96 \pm 0,4$ % (значення варіювалися від 95 до 98 %), тоді як у попередніх експериментах вона перебувала в межах 93–97 %, і авторами було показано, що препарати з кількістю живих клітин менше 95 % мали значно нижчу швидкість роз'єданого дихання за дії високої (2 мкмоль/л) концентрації FCCP [17]. У зв'язку з цим вищі концентрації FCCP не завжди інгібували проходження дихання (особливо за наявності комбінацій аланіну і пірувату та глутамату і пірувату, за яких коефіцієнт стабільності дихання був значно вищим за одиницю), а отже, не досягалася максимальна швидкість дихання. Тому є потреба у проведенні подальших досліджень з використанням вищих концентрацій роз'єднувача.

Результати наших досліджень показали, що тільки комбінація глутамату з піруватом ефективніше покращувала показники максимальної швидкості роз'єданого дихання ацинарних клітин підшлункової залози, порівняно з впливом цих субстратів окремо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Antonucci L., Fagman J. B., Todoric J. et al. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2015. Vol.112. P. 6166–6174. doi: 10.1073/pnas.1519384112.
2. Araya S., Kuster E., Gluch D. et al. Exocrine pancreas glutamate secretion help to sustain enterocyte nutritional needs under protein restriction // *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol*. 2018. Vol. 314. P. 517–536. doi: 10.1152/ajpgi.00135.2017.
3. Fukushima D., Doi H., Fukushima K. et al. Glutamate exocrine dynamics augmented by plasma glutamine and the distribution of amino acid transporters of the rat pancreas // *J. Physiol. Pharmacol*. 2010. Vol. 61 (3). P. 265–271.
4. Gyorgy Biczó, Eszter T. Vegh, Shalbuева N. et al. Mitochondrial dysfunction, through impaired autophagy, leads to endoplasmic reticulum stress, deregulated lipid metabolism, and pancreatitis in animal models // *Gastroenterol*. 2017. Vol. 154 (3). P. 689–703. doi: 10.1053/j.gastro.2017.10.012.

5. Habtezion A., Gukovskaya A. S., Pandol S. J. Acute pancreatitis: a multifaceted set of organelle and cellular interactions // *Gastroenterol.* 2019. Vol. 156 (7). P. 1941–1950. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.082.
6. Jacques Matone, Ana Iochabel Soares Moretti et al. Ethyl-pyruvate reduces lung injury matrix metalloproteinases and cytokines and improves survival in experimental model of severe acute pancreatitis // *Acta. Cir. Bras.* 2013. Vol. 28 (8). P. 559–567. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502013000800002>.
7. Kosowski H., Schild L., Kunz D., Halangk W. Energy metabolism in rat pancreatic acinar cells during anoxia and reoxygenation // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1367. P. 118–126. doi: 10.1016/s0005-2728(98)00143-1.
8. Manko B. O., Bilonoha O. O., Voloshyn D. et al. Pyruvate and glutamine define the effects of cholecystikinin and ethanol on mitochondrial oxidation, necrosis and morphology of rat pancreatic acini // *Pancreas.* 2021. Vol. 50. P. 972–981. doi: 10.1097/MPA.0000000000001864.
9. Manko B. O., Bilonoha O. O., Manko V. V. Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization // *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91. P. 34–45. doi: <https://doi.org/10.15407/ubj91.03.034>.
10. Mariame Selma Kane, Aurelien Paris, Codron P. et al. Current mechanistic insights into the CCCP-induced cell survival response // *Biochem. Pharmacol.* 2018. Vol. 148. P. 100–110. doi: 10.1016/j.bcp.2017.12.018.
11. Ping Xue, Li-Hui Deng, Zhao-Da Zhang et al. Impact of alanyl-glutamine dipeptide on severe acute pancreatitis in early stage // *World J. Gastroenterol.* 2008. Vol. 14 (3). P. 474–478. doi: 10.3748/wjg.14.474.
12. Rooman I., Lutz C., Pinho A. V. et al. Amino acid transporters expression in acinar cells is changed during acute pancreatitis // *Pancreatol.* 2013. Vol. 13 (5). P. 475–485. doi: 10.1016/j.pan.2013.06.006.
13. Shi Dong, Zhenjie Zhao, Xin Li et al. Efficacy of glutamine in treating severe acute pancreatitis: A systemic review and meta-analysis // *Front. Nutr.* 2022. Vol. 9. doi: 10.3389/fnut.2022.865102.
14. Shuang Peng, 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. doi: 10.1172/JCI94714.
15. 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 (5). P. 517–524. doi: 10.1152/ajpendo.1978.235.5.E517.
16. Zub A. M., Manko B. O., Manko V. V. Screening of amino acids as a safe energy source for isolated rat pancreatic acini // *Pancreas.* 2024. Vol. 53 (8). P. 662–669. doi: 10.1097/MPA.0000000000002350.
17. Zub A. M., Manko B. V., Manko B. O. et al. Uncoupled respiration stability of isolated pancreatic acini as a novel functional test for cell vitality // *Studia Biologica.* 2023. Vol. 17 (3). P. 243–252. <http://dx.doi.org/10.30970/sbi.1703.735>.

Стаття надійшла до редакції 03.11.25

доопрацьована 10.12.25

прийнята до друку 11.12.25

**SEARCH FOR OPTIMAL COMBINATIONS OF ALANINE, PYRUVATE,
AND GLUTAMATE TO ACHIEVE THE MAXIMAL UNCOUPLED
RESPIRATION RATE OF PANCREATIC ACINAR CELLS**

A. Abramovych, B. V. Manko, B. O. Manko, O. Ikkert

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: Anastasiia.Abramovych@lnu.edu.ua*

It is known that oxidation substrates such as alanine, pyruvate, and glutamate can have a positive effect on pancreatic acinar cells by enhancing their mitochondrial functions. Therefore, the aim of our study was to investigate whether the presence of various combinations of these substrates would increase the respiration rate of pancreatic acinar cells compared to their singular effects.

The study was conducted on male rats weighing 250–300 g. Pancreatic acini were isolated using a modified method by Williams et al. The rate of cellular oxygen consumption was determined using a polarograph RC650 6-cell respirometer (Strathkelvin). Pancreatic acinar cells were incubated for 15 minutes in a glucose solution containing different oxidative substrates (alanine, glutamate, or pyruvate), each at a concentration of 2 mM or their combinations. After placing the acinar cells into the polarographic chambers and recording basal respiration, the protonophore FCCP was added every one to two minutes at concentrations of 0.5, 1, 1.5, and 2 μM .

The maximum respiration rate during pyruvate oxidation was achieved with FCCP at a concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$, while during glutamate oxidation it was reached at 1.5 $\mu\text{mol/L}$ FCCP. Alanine increased the respiration rate compared to the control only in the presence of the uncoupler at a concentration of 2 μM .

During oxidation of the alanine and pyruvate combination, the maximum respiration rate of acinar cells was achieved with FCCP at 1.5 μM . Compared to the control, the combination of alanine and glutamate most strongly increased oxygen consumption under FCCP at 2 μM . Only the combination of glutamate and pyruvate caused a significant and statistically reliable increase in the rate of cellular respiration compared with the control.

Keywords: amino acids, cellular respiration, pancreatic acinar cells