

## ЗАЛЕЖНІСТЬ АДАПТАЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ МІТОХОНДРІЙ ПЕЧІНКИ ВІД СПОСОБУ ВИДІЛЕННЯ КЛІТИН

Г. Мазур, В. Мерлавський, Б.О. Манько, В.В. Манько

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

Під час проведення досліджень на ізольованих гепатоцитах важливо отримати клітини, які зберігають функціональні властивості, характерні для цілісного органа. Підвищення у процесі перфузії печінки в'язкості крові, зменшення перфузійного тиску в судинах, а відтак і гіпоксія, належать до чинників, які можуть впливати на функціональний стан ізольованих гепатоцитів. Функціональний стан клітин можна оцінити за адаптаційною здатністю мітохондрій, індукуючи максимальну швидкість споживання кисню шляхом роз'єднання дихання і окисного фосфорилування внаслідок додавання FCCP. Метою роботи було дослідити адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів з використанням перфузії печінки *in situ* та *in vitro*.

Гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена, перфузуючи печінку *in situ* чи *in vitro*. Ізольовані гепатоцити, після 15 хв інкубації у середовищах без додавання або з відповідним екзогенним субстратом окиснення – глутаміном, піруватом, сукцинатом, монометил-сукцинатом,  $\alpha$ -кетоглутаратом, диметил- $\alpha$ -кетоглутаратом (у концентрації 2 ммоль/л) або глюкозою (10 ммоль/л) – вносили у полярографічну комірку та додавали FCCP у наростаючих концентраціях.

Встановлено, що під час використання перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій FCCP) та оптимальні концентрації FCCP (за яких ці максимальні швидкості роз'єданого дихання були зареєстровані) є вищими, ніж за перфузії печінки *in vitro*. Унаслідок додавання до середовища екзогенних субстратів швидкості дихання гепатоцитів збільшувалися. За перфузії печінки *in vitro* максимальна швидкість роз'єданого дихання підвищувалась у всіх випадках, окрім використання глюкози, а у випадку перфузії *in situ* – лише коли застосовували диметил- $\alpha$ -кетоглутарат, сукцинат і монометил-сукцинат. Оптимальна концентрація FCCP за перфузії печінки *in vitro* зростала внаслідок додавання до середовища глутаміну, пірувату й монометил-сукцинату, а за перфузії *in situ* – лише за окиснення глюкози. За обох методів перфузії найвищу максимальну швидкість роз'єданого дихання спостерігали за використанням монометил-сукцинату, а оптимальну концентрацію FCCP – за окиснення пірувату.

Отже, перфузія печінки *in situ* є кращим методом отримання стабільних і метаболічно активних гепатоцитів для підтримання дихальних процесів на високому рівні, ніж перфузія *in vitro*.

*Ключові слова:* адаптаційна здатність мітохондрій, перфузія печінки *in situ*, перфузія печінки *in vitro*, гепатоцити, FCCP

Печінка бере участь у детоксикації та обміні речовин в організмі. Зважаючи на роль печінки у забезпеченні життєдіяльності цілого організму, її використовують на різних рівнях організації (від молекулярного до тканинного) у фармакологічних, токсикологічних

і метаболічних дослідженнях для вивчення функціонального стану цього органа.

Що вищий рівень організації досліджуваного об'єкта, то важчим є проведення експериментів, але більш достовірним трактування результатів. Для дослідження впливу медичних препаратів і патогенезу хвороб печінки часто використовують ізольовані гепатоцити, які зберігають функціональні властивості, характерні для цілісного органа [8, 17]. Такі дослідження здійснюють на гепатоцитах, які виділили неперфузійним методом, методом перфузії печінки *in vitro* та *in situ* або на культурі гепатоцитів.

Для проведення досліджень на клітинах і правильного трактування результатів важливо отримати непошкоджені життєздатні клітини. Оскільки під час виділення гепатоцити забирають з їхнього природного середовища, то не виключено, що за цих умов можуть виникнути певні зміни метаболізму. Наприклад, антиоксидантний статус гомогенату печінки шурів і гомогенату з гепатоцитів, отриманого одразу після ізолювання, не відрізнявся, але активність каталази у культурі гепатоцитів була значно нижчою [13]. Також у культурі гепатоцитів спостерігали зниження рівня антиоксидантних метаболітів, зниження активності циклу трикарбонових кислот і значне зменшення дихальної здатності, порівняно з гепатоцитами, виділеними *in situ* [3].

Оскільки життєздатність і функціональний стан клітин може залежати від способу їхнього виділення (у т.ч. від складу розчинів), дослідники часто модифікують ці методи виділення, емпірично підбираючи, на їхню думку, оптимальні умови [1, 5, 8]. Причому в багатьох випадках залишається незрозумілим, за рахунок якої модифікації методів виділення збільшується життєздатність клітин. Нас зацікавило, чи впливає на функціональний стан гепатоцитів спосіб перфузії печінки (*in situ* та *in vitro*).

Функціональний стан клітин можна оцінити за адаптаційною здатністю мітохондрій, яку визначають, індукуючи максимальну швидкість споживання кисню шляхом роз'єднання дихання й окисного фосфорилування внаслідок додавання FCCP. Тому метою роботи було порівняти адаптаційну здатність мітохондрій ізольованих гепатоцитів за перфузії печінки *in situ* та *in vitro*.

#### 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 були виконані на білих нелінійних щурах масою 220–300 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію на основному раціоні (перед експериментом тварини голодували впродовж 18 год з вільним доступом до води). Перед декапітацією (за використання перфузії *in vitro*) або перед проведенням розтину черевної порожнини (за використання перфузії *in situ*) тварин наркотизували з використанням хлороформу або тіопенталу натрію (40 мг/кг маси тіла внутрішньоочеревинно).

Коли перфузували печінку *in vitro*, відразу після наркозу тварину декапітували, розтинали черевну порожнину, вирізали ліву присередню частку печінки, перенесли її на предметне скельце (за кімнатної температури) і вводили перфузійну голку в кровоносні судини (судини другого порядку, на які розгалужуються печінкова артерія чи вена). У цьому випадку потреби використовувати гепарин не було.

За перфузії печінки *in situ* після наркозу розтинали черевну порожнину. Щоб запобігти зсіданню крові, вводили гепарин 5000 МО/мл (0,3 мл) у черевну нижню порожнисту вену. Перфузійні розчини надходили у печінку через катетер (18 G, 1,3 × 45 мм), який вводили у ворітну вену. Для відтоку розчину робили надріз нижньої порожнистої вени.

Далі в обох випадках – за використання перфузії печінки *in vitro* або *in situ* – гепатоцити ізолювали двостадійним методом Сеглена [15]. Спочатку, щоб відмити від крові, печінку перфузували безкальцієвим ЕГТА-вмісним розчином (37 °С) (у ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, глюкоза – 5,0, HEPES – 10,0, ЕГТА – 1; рН 7,4. Швидкість потоку розчинів, яку регулювали за допомогою перистальтичної помпи, була однаковою і становила приблизно 20 мл/хв.

Наступним етапом була рециркуляторна перфузія печінки Ca<sup>2+</sup>-вмісним розчином з колагеназою (108 од./мл) протягом 10–12 хв (37 °С). Після перфузії печінку поміщали у базовий розчин, що містив (у ммоль/л): NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 1,3, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, глюкоза – 5,0, HEPES – 10,0; рН 7,4. Далі ізолювані гепатоцити диспергували легким піпетуванням. Для вилучення клітин, з'єднаних між собою, суспензію пропускали крізь нейлоновий фільтр (розмір пор 0,1 мм × 0,1 мм). Щоб вилучити метаболіти, залишки позаклітинного матриксу та пошкоджені гепатоцити, суспензію тричі центрифугували (50 g). Підрахунок гепатоцитів здійснювали з використанням камери Горяєва. Цілісність плазматичних мембран гепатоцитів оцінювали фарбуванням клітин 0,1 %-ним розчином трипанового синього. Відсоток незафарбованих клітин за перфузії печінки *in vitro* та *in situ* був практично однаковий і становив 83,40±0,78 та 82,29±1,79 % відповідно.

Для дослідження адаптаційної здатності мітохондрій використовували базовий розчин без субстратів окиснення або розчин, який містив глютамін, піруват, сукцинат, монометил-сукцинат, α-кетоглутарат, диметил-α-кетоглутарат (по 2 ммоль/л) чи глюкозу (10 ммоль/л), і попередньо інкубували у ньому ізолювані гепатоцити впродовж 15 хв. Далі гепатоцити вносили у полярографічну комірку (приблизно 1,6 млн клітин на 1,6 мл того самого розчину, в якому здійснювали інкубацію) та додавали FCCP у наростаючих концентраціях.

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали, використовуючи t-критерій Стьюдента і дисперсійний аналіз ANOVA. За статистично достовірні приймали зміни з P≤0,05. Адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів характеризували максимальною швидкістю роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій FCCP) і оптимальною концентрацією FCCP (концентрацією, за якої ця швидкість зареєстрована).

### Результати і їхнє обговорення

Адаптаційна здатність мітохондрій, яка є різною за різних функціональних станів клітин, – це важливий чинник, що визначає життєздатність цих клітин [9]. Щоб охарактеризувати адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів, отриманих різними способами, визначали максимальну швидкість роз'єданого дихання (найвище значення швидкості дихання за протестованих концентрацій протонофора FCCP) та оптимальну концентрацію FCCP (за якої ця швидкість зареєстрована).

За окиснення ендогенних субстратів швидкість базального дихання гепатоцитів, виділених методом перфузії печінки *in vitro* (рис. 1, А), становила 0,08±0,01 нмоль O<sub>2</sub> / (с × млн клітин). Якщо печінку перфузували *in situ* (рис. 1, Б), цей показник був трохи вищим і становив 0,12±0,02 нмоль O<sub>2</sub> / (с × млн клітин). Але різниця між швидкостями базального дихання за використання двох вказаних методів статистично невірогідна (P > 0,05).

В обох випадках швидкість споживання кисню гепатоцитами внаслідок додавання до полярографічної комірки FCCP у низьких концентраціях збільшувалась, а у високих концентраціях – зменшувалась. Тим не менше, чутливість до FCCP у випадку перфузії печінки *in vitro* була підвищеною.

Як описано нами раніше [10], максимальна швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів за перфузії печінки *in situ* становила  $0,22 \pm 0,03$  нмоль  $O_2$  / (с  $\times$  млн клітин). Коли ж печінку перфузували *in vitro*, максимальна швидкість роз'єданого дихання виявилася нижчою ( $P=0,04$ ) і становила  $0,15 \pm 0,01$  нмоль  $O_2$  / (с  $\times$  млн клітин). Подальше збільшення концентрації FCCP за перфузії печінки *in vitro* спричинило суттєвіше зменшення швидкості роз'єданого дихання, ніж за перфузії *in situ* (див. рис. 1, А і Б).

Швидкість роз'єданого дихання досягала свого максимального значення за різної концентрації FCCP – 0,09 мкмоль/л у випадку перфузії печінки *in vitro* та 0,6 мкмоль/л у випадку перфузії печінки *in situ*. Отже, залежність швидкості роз'єданого дихання гепатоцитів від концентрації FCCP у випадку використання перфузії печінки *in vitro* є виражено зміщеною вліво.

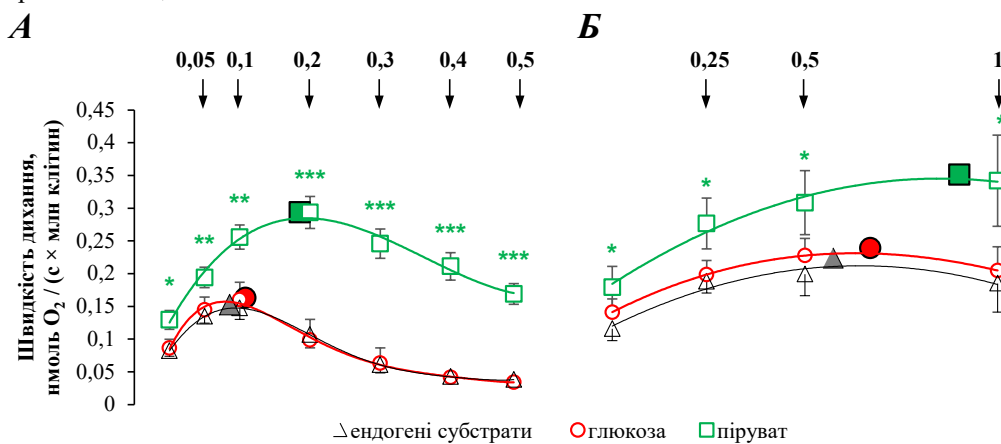


Рис. 1. FCCP-стимульоване дихання інтактних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), за окиснення ендогенних субстратів, глюкози та пірувату. Тут і далі: ●, ■ та ▲ – значення максимальної швидкості роз'єданого дихання за оптимальної концентрації FCCP; стрілками позначений час внесення у комірку FCCP; [глюкоза] = 10 мкмоль/л, концентрація всіх інших екзогенних субстратів 2 мкмоль/л; \* – статистично вірогідна різниця щодо швидкості дихання за окиснення лише ендогенних субстратів з  $P < 0,05$ ,  $n = 6$

Додавання до середовища глюкози не спричинило суттєвого збільшення швидкості базального і FCCP-стимульованого дихання гепатоцитів за перфузії печінки як *in vitro*, так і *in situ* (рис. 1, А і Б). Характер залежності швидкості від концентрації протонофора і максимальна швидкість роз'єданого дихання в обох випадках теж не змінювалися.

Продуктом окиснення глюкози у процесі гліколізу є піруват. Крім того, джерелом пірувату є лактат, який надходить у печінку зі скелетних м'язів [16]. Тому ми перевірили, як впливає наявність цього субстрату на максимальну швидкість роз'єданого дихання гепатоцитів у випадку перфузії печінки *in vitro* та *in situ*.

Встановлено, що внаслідок додавання до середовища пірувату швидкості базального та FCCP-стимульованого дихання в обох випадках суттєво збільшувалися (рис. 1). Правда, максимальна швидкість роз'єданого дихання за перфузії печінки *in vitro* збільшувалася в 1,9 рази ( $P=0,0009$ ), а за перфузії печінки *in situ* – в 1,6 рази, але ця різниця виявилася недостовірною ( $P=0,056$ ). В обох випадках оптимальна концентрація FCCP у разі окиснення екзогенного пірувату була зміщена вправо, що свідчить про вищу адаптаційну здатність мітохондрій (рис. 1).

Окрім пірувату, глутамін є ще одною молекулою, яка забезпечує включення енергетичних субстратів у цикл трикарбонових кислот через почергове перетворення на глутамат і  $\alpha$ -кетоглутарат [4]. Швидкості FCCP-стимульованого дихання, коли субстратом окиснення був глутамін або  $\alpha$ -кетоглутарат, а печінку перфузували *in vitro*, були вищими, ніж за окиснення ендогенних субстратів, і практично не відрізнялися між собою (рис. 2). У випадку перфузії *in situ*  $\alpha$ -кетоглутарат виявився ефективнішим субстратом за низьких концентрацій FCCP, а глутамін – за високих, про що свідчить значення оптимальної концентрації FCCP.

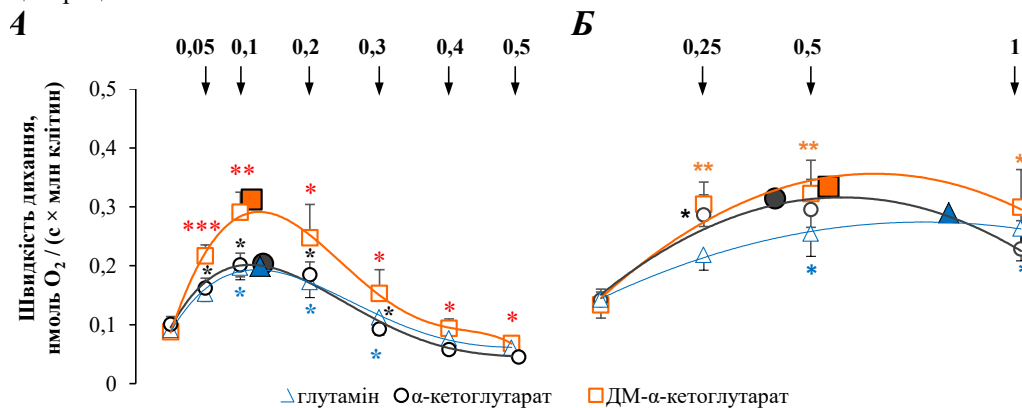


Рис. 2. Залежність дихання інтактних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), від концентрації FCCP за окиснення глутаміну,  $\alpha$ -кетоглутарату і диметил- $\alpha$ -кетоглутарату

Сам по собі сукцинат забезпечує високу адаптаційну здатність мітохондрій гепатоцитів. Він підтримує окисні процеси у мітохондріях інтактних гепатоцитів краще, ніж  $\alpha$ -кетоглутарат, що корелює із вищим потоком електронів у результаті окиснення сукцинату і вищою спорідненістю транспортерів до нього [18]. На відмінну від окиснення глутаміну й  $\alpha$ -кетоглутарату, максимальна швидкість роз'єданого дихання за окиснення сукцинату (рис. 3) в обох випадках була більша ( $P < 0,05-0,01$ ), ніж за окиснення ендогенних субстратів.

Проникність екзогенного  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату крізь плазматичну мембрану, незважаючи на наявність  $\text{Na}^+$ -дикарбоксилатних котранспортерів ( $\text{NaDC}$ ), трохи обмежена [12]. Рогстад виявив, що ліпофільні естери дво- і трикарбонових кислот краще проникають крізь плазматичну мембрану клітин [14], а оскільки тканина печінки характеризується значною естеразною активністю [2, 6, 11], ці субстрати розщеплюються у цитоплазмі гепатоцитів. Тому ми використали метильовані похідні  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату для оцінювання процесів дихання за використання двох методів перфузії.

Порівняно з окисненням  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату, використання їхніх метильованих похідних не змінює швидкості базального дихання гепатоцитів за обох способів перфузії печінки. Якщо перфузували печінку *in vitro*, то диметил- $\alpha$ -кетоглутарат і монометил-сукцинат спричинювали суттєве збільшення максимальної швидкості роз'єданого дихання, але не характер залежності швидкостей дихання від концентрації FCCP (див. рис. 2 і 3). Коли ж використовували перфузію *in situ*, використання метильованих похідних зміщувало оптимальну концентрацію FCCP вправо, що свідчить про вищу стійкість окисних процесів.

Загалом, унаслідок додавання до середовища екзогенних субстратів швидкості дихання гепатоцитів збільшувалися. Але якщо максимальна швидкість роз'єданого дихання за перфузії печінки *in vitro* зростала майже завжди (за винятком глюкози), то

у випадку перфузії *in situ* – лише тоді, коли використовували диметил- $\alpha$ -кетоглутарат, сукцинат і монометил-сукцинат. Не менш важливим показником є, очевидно, оптимальна концентрація FCCP, яка суттєвіше змінювалася у випадку перфузії *in situ*.

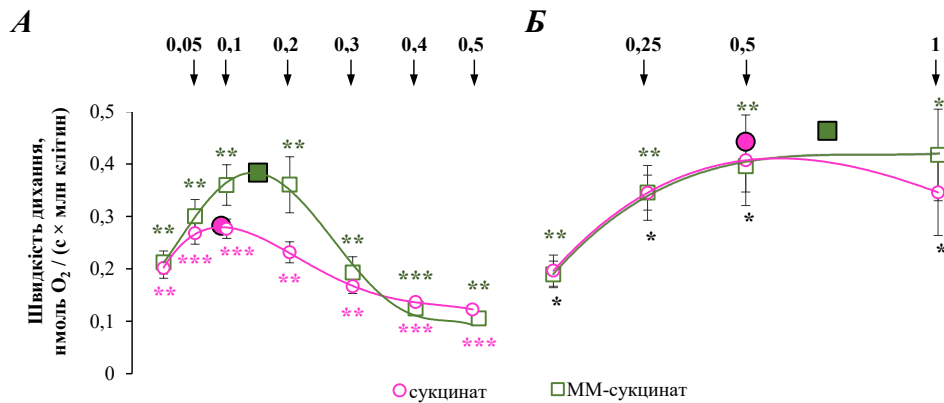


Рис. 3. Дихання інтактних гепатоцитів, виділених методом перфузії *in vitro* (А) та *in situ* (Б), залежно від концентрації FCCP за окиснення сукцинату і монометил-сукцинату

Щоби встановити ступінь впливу способу перфузії печінки та субстратів на максимальну швидкість роз'єданого дихання, провели дисперсійний аналіз. Встановлено, що на максимальну швидкість роз'єданого дихання 34 % впливу має спосіб перфузії печінки ( $P=5,8 \times 10^{-7}$ ), а 10 % впливу мають субстрати окиснення ( $P=1,6 \times 10^{-4}$ ). Взаємодії між цими двома факторами немає.

Вплив способу виділення клітин на адаптаційну здатність гепатоцитів ми зобразили залежністю максимальної швидкості роз'єданого дихання від оптимальної концентрації FCCP (рис. 4).

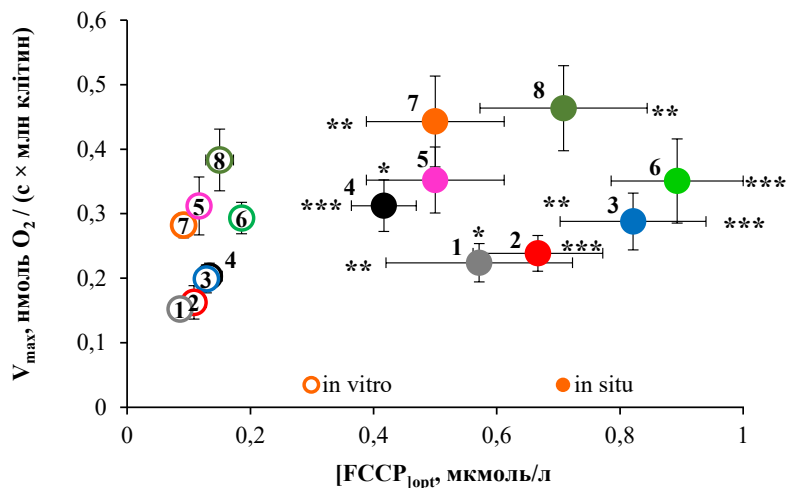


Рис. 4. Залежність максимальної швидкості роз'єданого дихання від оптимальної концентрації FCCP: 1 – ендогенні субстрати, 2 – глюкоза, 3 – глутамін, 4 –  $\alpha$ -кетоглутарат, 5 – диметил- $\alpha$ -кетоглутарат, 6 – піруват, 7 – сукцинат, 8 – монометил-сукцинат; первинні дані представлені на рис. 1 і 2; \* – статистично вірогідна різниця щодо використання перфузії *in vitro* з  $P < 0,05$ ,  $n=6$

Спектр адаптаційної відповіді дихання мітохондрій суттєво залежить від способу перфузії. У випадку перфузії печінки *in vitro* спостерігається значно щільніше скупчення множини точок у лівій частині графіка (рис. 4), що свідчить про суттєво вужчий спектр адаптаційної відповіді мітохондрій. Окрім того, після перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання є підвищеними, а оптимальні концентрації FCCP – суттєво вищими, ніж після перфузії *in vitro*.

Отже, функціональний стан ізольованих гепатоцитів, а відтак і результати експериментів, проведених на цих клітинах, залежать від використаних методів перфузії печінки під час ізолювання гепатоцитів. Під час перфузії печінки (*in vitro* чи *in situ*) можуть виникнути негативні явища – підвищення в'язкості крові, зменшення перфузійного тиску в судинах органа, гіпоксія. Ці явища, на нашу думку, і зумовлюють основний вплив на життєздатність гепатоцитів і їхню метаболічну активність [7]. Очевидно, за використання перфузії *in vitro*, а саме під час перенесення частки печінки на скельце, гепатоцити піддаються впливу гіпоксії, що в подальшому і впливає на метаболічну активність та здатність (чи нездатність) адекватно відповідати на екзогенні чинники під час експерименту.

Описані вище результати підтверджують, що перфузія печінки *in situ* дає змогу отримати метаболічно повноцінні клітини для проведення експериментів. Окрім того, що за використання перфузії печінки *in situ* максимальні швидкості роз'єданого дихання й оптимальні концентрації FCCP є вищими, найбільш показово різницю спостерігали між використанням сукцинату,  $\alpha$ -кетоглутарату і їхніх метильованих естерів. Адже метилові естери сукцинату за використання перфузії печінки *in situ* підтримують дихання гепатоцитів на тому ж рівні, що і сукцинат. За перфузії печінки *in vitro* швидкість дихання гепатоцитів за окиснення сукцинату є нижчою, ніж за використання монометил-сукцинату (рис. 3). Ймовірно, причиною цього може бути пошкодження NaDC або II комплексу дихального ланцюга в ході перфузії. Подібний вплив методу перфузії печінки на швидкість дихання гепатоцитів спостерігається і за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату.

Наведені вище дані переконливо свідчать, що для ізолювання стабільних, метаболічно активних гепатоцитів, які здатні підтримувати дихальні процеси на високому рівні, необхідно використовувати перфузію печінки *in situ*.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bellemann P., Gebhardt R., Mecke D. An improved method for the isolation of hepatocytes from liver slices. Selective removal of Trypan blue-dyeable cells // *Anal. Biochem.* 1977. Vol. 81. N 2. P. 408–415.
2. Berry M., Wollenberg L., Zhao Z. Esterase activities in the blood, liver and intestine of several preclinical species and humans // *Drug Metab. Lett.* 2009. Vol. 3. N 2. P. 70–77.
3. Cassim S., Raymond V., Lapierre P., Bilodeau M. From *in vivo* to *in vitro*: Major metabolic alterations take place in hepatocytes during and following isolation // *PLoS One.* 2017. Vol. 12. N 12. P. e0190366.
4. Egnatchik R., Leamy A., Sacco S. et al. Glutamate-oxaloacetate transaminase activity promotes palmitate lipotoxicity in rat hepatocytes by enhancing anaplerosis and citric acid cycle flux // *J. Biol. Chem.* 2019. Vol. 294. N 9. P. 3081–3090.
5. Gonçalves L., Vigário A., Penha-Gonçalves C. Improved isolation of murine hepatocytes for *in vitro* malaria liver stage studies // *Malar J.* 2007. Vol. 6. P. 169.
6. Hayase K., Tappel A. Microsomal esterase of rat liver // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 244. N 9. P. 2269–2274.

7. *Kon S., Imai M., Inaba H.* Isoflurane attenuates early neutrophil-independent hypoxia-reoxygenation injuries in the reperfused liver in fasted rats // *Anesthesiology*. 1997. Vol. 86. N 1. P. 128–136.
8. *Lee D. H., Lee K. W.* Hepatocyte isolation, culture, and its clinical applications // *Hanyang Med Rev*. 2014. Vol. 34. N 4. P. 165–172.
9. *Manko B., Bilonoha O., Manko V.* Adaptive respiratory response of rat pancreatic acinar cells to mitochondrial membrane depolarization // *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91. N 3. P. 34–45.
10. *Mazur H., Merlavsky V., Manko B., Manko V.* Dependence of the mitochondrial adaptive capacity of hepatocytes on the oxidative substrates availability // *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91. N 6. P. 5–14.
11. *Morgan E., Yan B., Greenway D.* et al. Purification and characterization of two rat liver microsomal carboxylesterases (hydrolase A and B) // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. Vol. 315. Iss. 2. P. 495–512.
12. *Moseley R., Jarose S., Permod P.* Hepatic Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransport: identification, characterization, and acinar localization // *Am. J. Physiol.* 1992. Vol. 263. N 6. P. 871–879.
13. *Richert L., Binda D., Hamilton G.* et al. Evaluation of the effect of culture configuration on morphology, survival time, antioxidant status and metabolic capacities of cultured rat hepatocytes // *Toxicol In Vitro*. 2002. Vol. 16. N 1. P. 89–99.
14. *Rognstad R.* Gluconeogenesis in rat hepatocytes from monomethyl succinate and other esters // *Arch. Biochem. Biophys.* 1984. Vol. 230. N 2. P. 605–609.
15. *Seglen P.* Preparation of isolated rat liver cells // *Methods Cell Biol.* 1976. Vol. 13. P. 29–83.
16. *Summermatter S., Santos G., Pérez-Schindler J., Handschin C.* Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor  $\alpha$ -dependent activation of LDH B and repression of LDH A // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110. N 21. P. 8738–8743.
17. *Underhill G., Khetani S.* Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies // *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2017. Vol. 5. N 3. P. 426–439.
18. *Zimmerli B., O'Neill B., Meier P. J.* Identification of sodium-dependent and sodium-independent dicarboxylate transport systems in rat liver basolateral membrane vesicles // *Pflugers Arch.* 1992. Vol. 421. N 4. P. 329–335.

*Стаття надійшла до редакції 14.07.20*

*доопрацьована 14.07.20*

*прийнята до друку 27.08.20*

## **DEPENDENCE OF THE ADAPTIVE CAPACITY OF LIVER MITOCHONDRIA ON PREPARATION METHOD**

**H. Mazur, V. Merlavsky, B.O. Manko, V.V. Manko**

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

When conducting studies on isolated hepatocytes, it is important to obtain cells that retain the functional properties that are characteristic of the whole organ. Increased blood viscosity during liver perfusion, decreased perfusion pressure in blood vessels, and hence hypoxia, are among the factors that may affect the functional state of isolated hepatocytes.



The functional state of cells can be estimated by the adaptive capacity of mitochondria, by inducing maximal respiration rate by uncoupling respiration and oxidative phosphorylation due to the addition of FCCP. The research aimed to investigate the adaptive capacity of mitochondria of isolated hepatocytes using *in situ* and *in vitro* liver perfusion.

Hepatocytes were isolated by the two-staged Seglen method by *in situ* and *in vitro* liver perfusion. Isolated hepatocytes, after 15-minute incubation in the medium without addition or with respective oxidative substrate – glutamine, pyruvate, succinate, monomethyl succinate,  $\alpha$ -ketoglutarate, dimethyl- $\alpha$ -ketoglutarate (at a concentration of 2 mM) or glucose (10 mM) – were added into the respiratory chamber and FCCP was added in increasing concentrations.

It was established that at *in situ* liver perfusion maximal rate of uncoupled respiration and the optimal concentration of FCCP was higher than at *in vitro* liver perfusion. Addition of exogenous substrates to a medium increased the respiration rate of hepatocytes. Upon *in situ* liver perfusion maximal uncoupled respiration rate increased at all causes except glucose, and at *in vitro* liver perfusion – only when dimethyl- $\alpha$ -ketoglutarate, succinate and monomethyl succinate were used. The optimal concentration of FCCP at *in vitro* liver perfusion increased due to the addition of glutamine, pyruvate and monomethyl succinate to the medium, and at *in situ* liver perfusion – only upon glucose oxidation. In both perfusion methods, the highest maximal rate of uncoupled respiration is with the use of monomethyl succinate and the optimal FCCP concentration – upon pyruvate oxidation.

Therefore, *in situ* liver perfusion is better method to obtain stable and metabolically active hepatocytes in support respiratory processes at a high level than *in vitro* perfusion.

*Keywords:* the adaptive capacity of mitochondria, *in situ* liver perfusion, *in vitro* liver perfusion, hepatocytes, FCCP