

## ВПЛИВ ЕТАНОЛУ ТА ЦИКЛОСПОРИНУ А НА ДИХАННЯ ІЗОЛЮВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ

Г. Мазур, Б. О. Манько, В. В. Манько

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

Відомо, що етанол впливає на окисні процеси у мітохондріях печінки, а це може бути одним із механізмів розвитку алкогольної хвороби печінки. Відомий імуносупресант циклоспорин А також є інгібітором мітохондріальної пори перехідної провідності. Однак фармакологічна взаємодія етанолу та циклоспорину А недостатньо вивчена. Мета цього дослідження – дослідити вплив етанолу та циклоспорину А на швидкість дихання ізолюваних гепатоцитів щурів.

Дослідження проведено на 5 щурах-самцях лінії Вістар. Гепатоцити ізолювали шляхом перфузії з колагеназою. Цілісність плазматичної мембрани оцінювали за фарбуванням клітин трипановим синім (0,1 %). Кількість інтактних клітин становила  $85,7 \pm 0,92\%$ . Швидкість споживання кисню вимірювали за допомогою полярографічної установки на базі електрода Кларка за 37 °С. Для дослідження роз'єданого дихання використовували протонофор FCCP. Клітинне дихання вивчали за наявності у середовищі глюкози, пірувату або монометилсукцинату. Статистичний аналіз проводили за допомогою програми Origin Pro 2018. Вірогідність різниці між групами визначали за двофакторним дисперсійним аналізом.

Після інкубації упродовж 1 год з етанолом (50 ммоль/л) швидкість базального дихання гепатоцитів за окиснення глюкози зростала на 8 %. Аналогічний результат отримано за наявності у середовищі пірувату. Однак монометилсукцинат усував стимулюючий вплив етанолу на дихання. Етанол ніяк не впливав на роз'єдане дихання гепатоцитів за окиснення глюкози, пірувату чи монометилсукцинату. У жодному з експериментів інкубація з циклоспорином А не впливала на споживання кисню клітинами. Циклоспорин А також не змінював ефектів етанолу на базальне дихання гепатоцитів. Отже, не виявлено фармакологічної взаємодії між етанолом і циклоспорином А, яка проявилася б у зміні мітохондріального дихання ізолюваних гепатоцитів.

*Ключові слова:* гепатоцити, мітохондрії, етанол, циклоспорин А

Одним із механізмів токсичного впливу етанолу на печінку може бути його вплив на функції мітохондрій [6]. Відомо, що швидкість споживання кисню за прижиттєвої перфузії печінки щурів розчином етанолу суттєво зростає [4]. У дослідженнях на ізолюваних гепатоцитах щурів етанол (10 ммоль/л) стимулював швидкість базального дихання лише за наявності пірувату, але не лактату, чи за відсутності субстратів окиснення [3]. Інші дослідження доводять зростання швидкості метаболізму етанолу за наявності пірувату [1]. Після гострого введення етанолу щурам виявлено зростання швидкості базального дихання ізолюваних гепатоцитів, що не супроводжувалося підвищенням метаболізму етанолу [3]. Отже, не цілком зрозуміло, чи інтенсифікація дихання є необхідним механізмом прискорення метаболізму етанолу за наявності пірувату як основного енергетичного субстрату мітохондрій. Згідно з альтернативною гіпотезою, піруват прискорює метаболізм етанолу завдяки утилізації надлишкових відновлених еквівалентів (у формі НАДН), що

утворюються внаслідок окиснення етанолу. Зростання ж швидкості дихання за таких умов може бути наслідком деполяризації мембран мітохондрій за дії етанолу чи його токсичного метаболіту ацетальдегіду [7]. Нез'ясованим залишається механізм деполяризації мембран мітохондрій гепатоцитів за дії етанолу [6].

Попередньо показано, що циклоспорин А (CsA), інгібітор мітохондріальної пори перехідної провідності, не усуває мітохондріальної деполяризації за дії етанолу [7]. Поряд із цим, цей препарат також є відомим імуносупресантом, який пригнічує кальциневрин. Оскільки використання його у клініці досить поширене, вивчення потенційної взаємодії CsA з етанолом є важливим питанням фармакології. На сьогодні досліджено лише вплив вживання червоного вина на метаболізм циклоспорину в печінці [5]. Невідомо, чи комбінована дія цих речовин змінює функції мітохондрій печінки. Тому мета цього дослідження – дослідити вплив етанолу та циклоспорину А на швидкість дихання ізольованих гепатоцитів щурів.

### Матеріали та методи

Усі маніпуляції з тваринами було проведено згідно з етичними вимогами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин і законами України. Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Вістар, що важили 220–250 г. Тварин утримували у віварії за стабільної температури та стандартної дієти. Перед експериментом тварини голодували упродовж 18 год із вільним доступом до води.

Гепатоцити ізолювали шляхом перфузії з колагеназою (тип IV), як описано раніше [2]. Після виділення гепатоцити зберігали за кімнатної температури у базовому позаклітинному середовищі, що містило (у ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 1,3, MgCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 5, HEPES – 10; рН 7.4. Гепатоцити підраховували у камері Горяєва. Цілісність плазматичної мембрани оцінювали за фарбуванням клітин трипановим синім (0,1 %). Кількість інтактних клітин становила 85,7±0,92 %.

Швидкість споживання кисню вимірювали за допомогою полярографічної установки SI929 (Strathkelvin) на базі електрода Кларка. Гепатоцити інкубували впродовж 60 хв з етанолом (50 ммоль/л) або/і циклоспорином А (0,5 мкмоль/л) у базовому середовищі або з додаванням пірувату чи монометилсукцинату (по 2 ммоль/л). Після цього суспензію гепатоцитів вносили у полярографічну комірку та реєстрували (за 37 °С) базальне і роз'єднане дихання шляхом титрування протонофором FCCP у концентраціях 0,25, 0,5 та 1 мкмоль/л.

Для підвищення точності всі експерименти проводили у двох технічних повторах, результати яких усереднювали. Кількість окремих препаратів клітин, отриманих із різних тварин, становила 5. Швидкість дихання підраховували, застосовуючи авторську програму, створену за допомогою мови програмування Python. Статистичний аналіз проводили з використанням програми Origin Pro 2018. Вірогідність різниці між групами визначали за двофакторним дисперсійним аналізом.

### Результати і їхнє обговорення

Спочатку ми дослідили вплив етанолу та CsA на дихання ізольованих гепатоцитів щурів у базовому позаклітинному середовищі, яке містило лише глюкозу як джерело енергії. Для цього ізольовані гепатоцити (2 млн/мл) інкубували упродовж 1 год з етанолом, CsA та у комбінації етанолу і CsA. У контролі швидкість базального дихання гепатоцитів становила  $0,167 \pm 0,009$  нмоль O<sub>2</sub>/с/млн клітин (рис. 1). Згідно з результатами двофакторного дисперсійного аналізу, CsA не впливав на базальне дихання гепатоцитів, а етанол статистично вірогідно підвищував базальне дихання (незалежно від наявності

CsA) – в середньому лише на 8 %. На нашу думку, такий низький ефект вдалося зареєструвати завдяки наявності паралельних вимірювань і автоматичного обчислення швидкості дихання.

Додавання протонифора FCCP зумовлювало стимулювання дихання. На рис. 1 (справа) представлено дані максимальної швидкості роз'єданого дихання, якої досягали за додавання аліквот FCCP (у діапазоні концентрацій 0,25–1 мкмоль/л). Ні етанол, ні CsA не впливали на максимальну швидкість споживання кисню гепатоцитів.

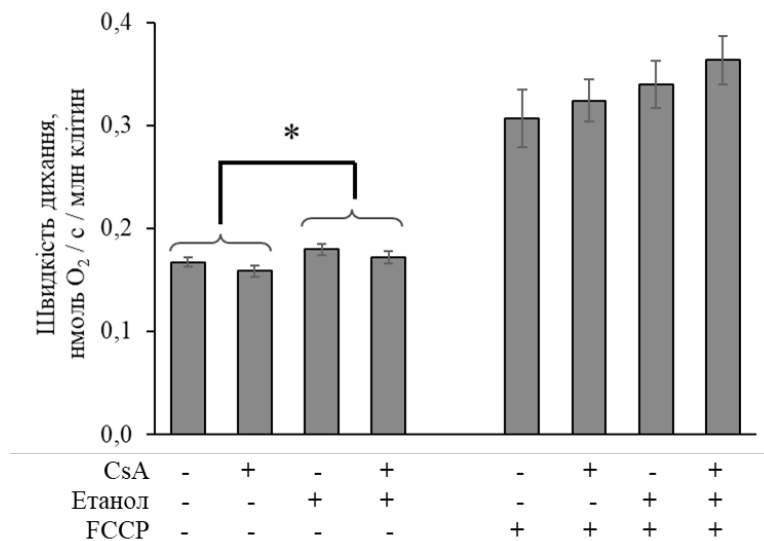


Рис. 1. Вплив етанолу та CsA на базальне і роз'єдане (FCCP +) дихання ізольованих гепатоцитів щурів за окиснення глюкози: [етанол] = 50 ммоль/л; [CsA] = 0,5 мкмоль/л; [глюкоза] = 5 ммоль/л, FCCP = 0,25–1 мкмоль/л; \* – статистично вірогідна різниця за впливу етанолу згідно із двофакторним дисперсійним аналізом;  $P < 0,05$ ,  $n = 5$

Оскільки з даних літератури відомо, що саме наявність пірувату забезпечує стимуляцію етанолом дихання ізольованих гепатоцитів [3], то ми припустили, що за наявності глюкози у нашому експерименті також утворювалася достатня кількість пірувату для прояву ефекту етанолу. У додаткових експериментах ми перевірили цю гіпотезу, додавши до середовища піруват або метиловий естер сукцинату – монометилсукцинат. Априорі, наявність монометилсукцинату не мала би впливати на окиснення етанолу, оскільки сукцинат, на відміну від пірувату, швидко окиснюється мітохондріями і продукує відновлювальні еквіваленти у формі ФАДН<sub>2</sub>. Піруват, натомість, не лише окиснюється, а й може перетворюватись на лактат, генеруючи додаткову кількість акцептора протонів НАД<sup>+</sup> для реакцій окиснення етанолу.

За наявності у середовищі пірувату отримано подібні результати, як і в попередньому експерименті. Зокрема, інкубація з етанолом зумовлювала статистично вірогідне зростання швидкості базального дихання гепатоцитів (рис. 2), але не роз'єданого дихання. CsA не впливав на ці показники. Також дисперсійний аналіз не виявив взаємодії цих двох факторів. Але за наявності монометилсукцинату ні етанол, ні CsA не впливали на дихання гепатоцитів (рис. 3).

Результати цих експериментів підтвердили нашу гіпотезу, що саме піруват, а не інші енергетичні субстрати, необхідний для інтенсифікації базального дихання за дії етанолу.

Відсутність впливу етанолу на максимальне роз'єднане дихання вказує на те, що етанол не спричиняє активації ферментів циклу трикарбонових кислот або дихального ланцюга, а його вплив на базальне дихання, скоріше за все, пов'язаний із деполяризацією мембран мітохондрій [7].

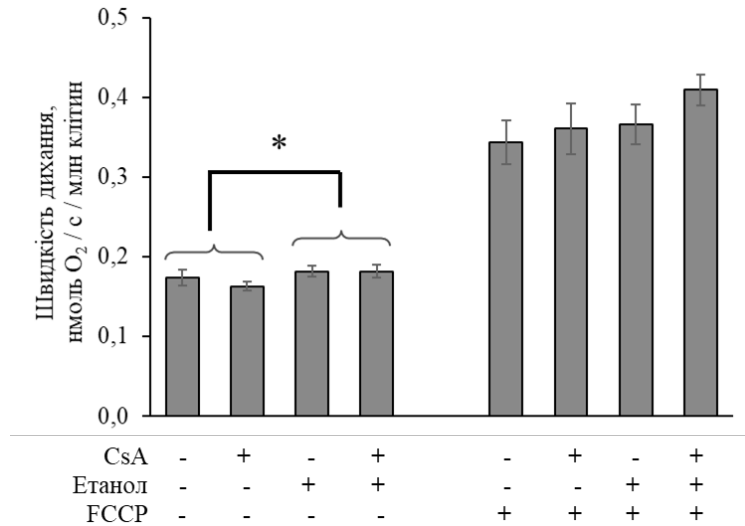


Рис. 2. Вплив етанолу та CsA на базальне та роз'єднане (FCCP +) дихання ізольованих гепатоцитів щурів за окиснення глюкози і пірувату: [етанол] = 50 ммоль/л; [CsA] = 0,5 мкмоль/л; [глюкоза] = 5 ммоль/л; [піруват] = 2 ммоль/л; FCCP = 0,25–1 мкмоль/л; \* – статистично вірогідна різниця за впливу етанолу згідно із двофакторним дисперсійним аналізом; P<0,05, n=5

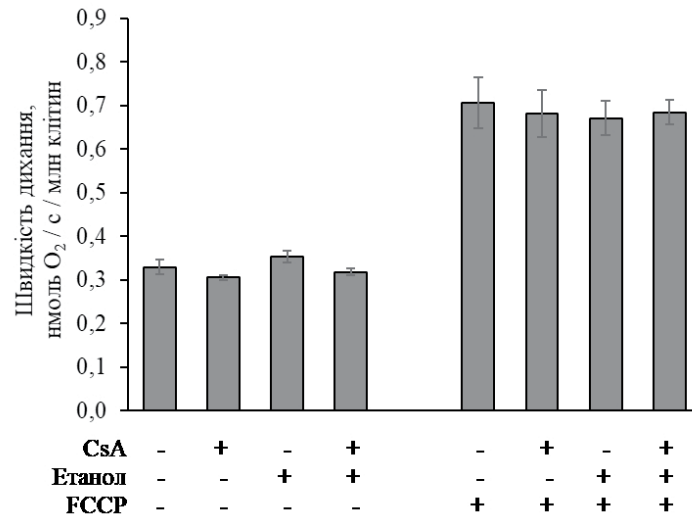


Рис. 3. Вплив етанолу та CsA на базальне і роз'єднане (FCCP +) дихання ізольованих гепатоцитів щурів за окиснення глюкози та монометилсукцинату: [етанол] = 50 ммоль/л; [CsA] = 0,5 мкмоль/л; [глюкоза] = 5 ммоль/л; [монометилсукцинат] = 2 ммоль/л; FCCP = 0,25–1 мкмоль/л; n=5

Ми не виявили доказів взаємодії етанолу з CsA у впливі на дихання мітохондрій ізольованих гепатоцитів. Очевидно, за умов цього короткочасного експерименту інгібування мітохондріальної пори перехідної провідності не чинить впливу на дихання мітохондрій навіть за наявності досить високої концентрації етанолу. Однак щоб перевірити відсутність фармакологічної взаємодії CsA з алкоголем, особливо у пацієнтів із захворюваннями печінки, необхідно провести більш детальні експерименти *in vivo*.

У підсумку, етанол *in vitro* здатний стимулювати базальне дихання завдяки метаболізму пірувату, але не сукцинату, а циклоспорин А не впливає на цей процес.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Grunnet N., Quistorff B., Thieden H. I. D. Rate-Limiting Factors in Ethanol Oxidation by Isolated Rat-Liver Parenchymal Cells. Effect of Ethanol Concentration, Fructose, Pyruvate and Pyrazole // Eur. J. Biochem. 1973. Vol. 40. P. 275–282.
2. Mazur H. M., Merlavsky V. M., Manko B. O., Manko V. 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.
3. Stowell K. M., Crow K. E. The effect of acute ethanol treatment on rates of oxygen uptake, ethanol oxidation and gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes // Biochem. J. 1985. Vol. 230. N 3. P. 595–602.
4. Sugano T., Handler J. A., Yoshihara H. et al. Acute and Chronic Ethanol Treatment in Vivo Increases Malate-Aspartate Shuttle Capacity in Perfused Rat Liver // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. N 35. P. 21549–21553.
5. Tsunoda S. M., Harris R. Z., Christians U. et al. Red wine decreases cyclosporine bioavailability // Clin. Pharmacol. Ther. 2001. Vol. 70. N 5. P. 462–467.
6. Zhong Z., Lemasters J. J. A unifying hypothesis linking hepatic adaptations for ethanol metabolism to the proinflammatory and profibrotic events of alcoholic liver disease // Alcohol Clin Exp Res. 2018. Vol. 42. N 11. P. 2072–2089.
7. Zhong Z., Ramshesh V. K., Rehman H. et al. Acute Ethanol causes hepatic mitochondrial depolarization in mice: role of ethanol metabolism // PLOS One. 2014. Vol. 9. N 3. P. e91308.

Стаття надійшла до редакції 29.03.24

доопрацьована 09.05.24

прийнята до друку 10.05.24

#### EFFECT OF ETHANOL AND CYCLOSPORINE A ON RESPIRATION OF ISOLATED RAT HEPATOCYTES

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

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

It is known that ethanol affects the oxidative processes in liver mitochondria, which can be one of the mechanisms of the development of the alcoholic liver disease. A well-known immunosuppressant cyclosporine A is also an inhibitor of mitochondrial permeability transition pore. However, the pharmacological interaction of ethanol and cyclosporin A

is not sufficiently studied. The aim of the study was to investigate the effect of ethanol and cyclosporine A on the respiration rate of isolated rat hepatocytes.

Five male Wistar rats were used in the study. Hepatocytes were isolated by perfusion with collagenase. Cell plasma membrane integrity was assessed with trypan blue staining (0.1 %). Intact cell number was  $85.7 \pm 0.92$  %. The rate of oxygen consumption was measured using a polarographic device based on a Clark electrode. Protonophore FCCP was used to study the uncoupled respiration. Cell respiration was studied in the presence of glucose, pyruvate or monomethylsuccinate in solution. Statistical analysis was performed with Origin Pro 2018 software. Significance of difference between groups was evaluated with analysis of variance test.

After one hour incubation with ethanol (50 mM), the rate of basal respiration of hepatocytes oxidizing glucose increased by a meager 8 %. Similar result was obtained upon the presence of pyruvate in solution. Monomethylsuccinate, however, abolished the effect of ethanol on basal respiration. he but not uncoupled respiration of hepatocytes upon glucose or pyruvate oxidation. Ethanol did not affect the uncoupled respiration of hepatocytes in presence of glucose, pyruvate of monomethylsuccinate. Incubation with cyclosporin A did not cause any changes in cell oxygen consumption in all experiments. Cyclosporin A also did not modify the effects of ethanol on basal respiration of hepatocytes. Therefore, no pharmacological no interaction between ethanol and cyclosporin A was detected, which could be evidenced by the change of mitochondrial respiration of isolated hepatocytes.

*Keywords:* hepatocytes, mitochondria, ethanol, cyclosporine A