

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА**

**ГРЕНЮХ ВОЛОДИМИР ПЕТРОВИЧ**

УДК 612.014.3: 576.32/.36: 577.121.7: 616-006.441

**ОСОБЛИВОСТІ БІОЕНЕРГЕТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ У МІТОХОНДРІЯХ  
КЛІТИН ЛІМФОМИ НЕМЕТ-КЕЛНЕРА**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Львів – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фізіології людини і тварин  
Львівського національного університету імені Івана Франка

**Науковий керівник:**

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Бабський Андрій Мирославович,**  
Львівський національний університет імені Івана Франка,  
професор кафедри фізіології людини і тварин

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор  
**Янчук Петро Іванович,**  
ННЦ «Інститут біології»,  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
професор кафедри фізіології людини і тварин

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Кіт Юрій Ярославович,**  
Інститут біології клітини НАН України,  
завідувач лабораторії молекулярних механізмів міжклітинних взаємодій

Захист відбудеться " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2016 року о \_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 35.051.14 Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Грушевського, 4, біологічний факультет, ауд. № 333.

З дисертацією можна ознайомитися в науковій бібліотеці Львівського національного університету імені Івана Франка за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 17.

Автореферат розісланий " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2016 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради К 35.051.14  
кандидат біологічних наук, доцент

\_\_\_\_\_ О. В. Іккерт

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Дослідження особливостей енергетичних процесів у клітинах новоутворень та підвищення ефективності лікування неоплазій є надзвичайно актуальними для фізіології та медицини. У порівнянні із 1950 р. онкозахворюваність виросла на 50%, в тому числі, більш ніж на 100% для лімфоми. В Україні щороку 160 тис. осіб захворюють на онкологічні захворювання, з яких помирає 100 тис. На сьогодні ефективність лікування злоякісних новоутворень становить переважно не більше 50%. Значною мірою така низька ефективність обумовлена неспецифічністю дії протипухлинних препаратів, резистентністю різних пухлин до них та пошкоджуючою дією препаратів на нормальні клітини, в першу чергу на клітини печінки.

Вважається, що ефект Варбурга (Warburg, 1967), який полягає у вибіркового використанні гліколізу навіть за достатньо аеробних умов, є характерним для усіх пухлинних клітин. Однак енергетична цінність анаеробного гліколізу є у 16 разів нижчою, ніж повне окиснення глюкози. Відповідно, навіть незначна зміна інтенсивності аеробних окисно-відновних процесів у мітохондріях чи спряженості процесів дихання та окисного фосфорилування може суттєво змінити метаболізм пухлинної клітини, в якій проходять інтенсивні та енергозатратні синтетичні процеси. На сьогодні достеменно не встановлена роль мітохондрій і аеробного енергетичного метаболізму в функціонуванні клітин лімфоми.

Вивчення клітинних механізмів призвело до розуміння деяких аспектів виникнення резистентності пухлинних клітин до протипухлинних чинників (Gottesman, 2002; Chekhun et al., 2006; Wheatley, 2008; Horbay et al., 2012). Хіміотерапевтичні препарати впливають на живі клітини переважно через активацію апоптозу, що реалізується через рецепторний або мітохондрійний шляхи, останній з яких передбачає вивільнення з мітохондрій цитохрому c (Фільченков, Стойка 2006; Rodriguez-Nieto, Zhivotovsky, 2006; Kaminsky et al., 2008), який одночасно є важливим транспортером електронів у дихальному ланцюгу. Мітохондрії за цих умов відіграють роль своєрідного «перемикача» від апоптоз-стимулюючих лігандів, зв'язаних на плазматичній мембрані клітини-мішені, до каскаду ферментів каспаз (Ott et al, 2007). Можливо, пермеабілізація внутрішньої мембрани мітохондрій може бути визначальним фактором для вибору між апоптозом і некрозом (Skulachev, 2006). Інгібування аеробних процесів дихання та окисного фосфорилування у мітохондріях може бути або причиною, або наслідком пошкодження внутрішньої мембрани мітохондрій, функціональний стан яких можна досліджувати за допомогою полярографічного методу. Особливий інтерес викликають клітини пухлин, які можуть перероджуватись за дії хіміотерапевтичних препаратів (Horbay et al., 2012). На сьогодні залишається нез'ясованим вплив хіміотерапевтичних препаратів на енергетичні процеси у клітинах новоутворень. Отже, вивчення особливостей функціонування енергетичних процесів у мітохондріях пухлинних клітин у порівнянні з мітохондріями печінки є важливим для розуміння механізмів неоплазматичних трансформацій. З іншого боку, вплив різних протипухлинних препаратів на швидкості дихання та окисне фосфорилування в мітохондріях клітин лімфоми та печінки є актуальним напрямом досліджень, що має як теоретичне, так і

практичне значення для оцінки ефективності та потенційної токсичності нових хіміотерапевтичних речовин.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана на кафедрі фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка за часткової підтримки Західно-Українського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC) та проекту для молодих учених Львівського національного університету імені Івана Франка підтриманого компанією "Material Phases Data System" (Швейцарія).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи було визначити особливості біоенергетичних процесів у мітохондріях клітин лімфоми Немет-Келнера та використання цих органел як мішеней дії протипухлинних препаратів.

Для досягнення поставленої мети визначено такі завдання:

1. Проаналізувати можливості вивчення дихання ізольованих клітин та мітохондрій лімфоми Немет-Келнера (NK/Ly)
2. Виявити особливості дихання та окисного фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly в порівнянні з мітохондріями печінки миші та щура
3. Вивчити вплив доксорубіцину на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly
4. Дослідити вплив Les 3106 на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура
5. Порівняти вплив ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування у мітохондріях лімфоми NK/Ly і печінки щура
6. Вивчити окремий та сумісний вплив бафіломіцину А1 та нікотинацидаденіндинуклеотид фосфату (НААДФ) на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій і АТФазну активність лімфоми NK/Ly і печінки щура

**Об'єкт дослідження:** особливості мітохондрій пухлинних клітин.

**Предмет дослідження:** біоенергетичні параметри дихання та окисного фосфорилування в клітинах мишачої лімфоми Немет-Келнера.

**Методи дослідження:** фізіологічний (підтримання та перевивання лімфоми NK/Ly), фізико-хімічний (полярографічна реєстрація споживання кисню мітохондріями та клітинами), оптичний (електронна мікроскопія суспензій мітохондрій), біохімічний (визначення АТФазної активності та вмісту білка), статистичні (аналіз достовірності, варіабельності та дисперсії отриманих результатів).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Отримані результати досліджень розширюють сучасні уявлення про особливості енергетичного метаболізму пухлинних клітин на прикладі лімфоми Немет-Келнера. Вперше були виділені функціонально активні мітохондрії лімфоми NK/Ly зі спряженими процесами дихання та окисного фосфорилування. Виявлено, що мітохондрії лімфоми NK/Ly та мітохондрії печінки можуть бути використані як мішені для порівняння впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси у пухлинних і нормальних клітинах.

З'ясовано закономірності впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси у мітохондріях лімфоми. Встановлено, що протипухлинні препарати (доксорубіцин, ландоміцин А, Les 3506) викликають пригнічення дихання та

окисного фосфорилування у метаболічному стані 3. Зокрема, новий протипухлинний антибіотик ландоміцин А пригнічує енергетичні процеси у мітохондріях лімфоми, але ще більше у мітохондріях печінки щура. Натомість, інгібітор  $H^+$ -АТФази бафіломіцин та агоніст  $Ca^{2+}$ -каналів кислих депо клітин НААДФ призводили до селективного пригнічення енергетичних процесів у мітохондріях лімфоми без статистично достовірного впливу на мітохондрії печінки.

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати поглиблюють знання про закономірності функціонування енергетичних процесів у пухлинних клітинах. Вони є фундаментальними для з'ясування механізмів резистентності клітин новоутворень до дії протипухлинних препаратів та підвищення ефективності лікування. Отримані результати можуть бути застосовані для обґрунтування можливості використання певних протипухлинних препаратів за лікування злоякісних новоутворень. У ході виконання дисертаційної роботи була розроблена програма MitoDancer для точного аналізу полярографічних записів. Основні положення дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес і використовуються в Львівському національному університеті імені Івана Франка на загальних курсах «Фізіологія людини і тварин» та спецкурсах «Неоплазія» та «Біоенергетика». Методичні та експериментальні розробки використовуються студентами за виконання курсових та дипломних робіт, і можуть бути застосовані для підготовки спеціалістів медико-біологічного профілю у вищих навчальних закладах України.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертант самостійно провів пошук та аналіз джерел літератури за темою кандидатської дисертації, виконав експериментальну частину роботи, провів статистичне опрацювання отриманих результатів досліджень. Аналіз, інтерпретацію та узагальнення результатів роботи, а також формулювання основних положень, які виносяться на захист, і висновків по дисертаційній роботі було проведено спільно з науковим керівником. Участь співробітників кафедри фізіології людини і тварин Львівського національного університету імені Івана Франка відзначена у спільних публікаціях.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації були представлені на X та XI Міжнародних наукових конференціях студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології» (Львів, 2014, 2015), XIX-тому з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнародною участю (Львів, 2014), конференції «Актуальні питання сучасної біології» (Львів, 2014), Міжнародній конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, 2014), VI з'їзді Українського біофізичного товариства (Луцьк, 2015), а також на наукових семінарах кафедри фізіології людини і тварин біологічного факультету та щорічних звітних наукових конференціях біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 6 статей у фахових наукових журналах і 8 тез доповідей на міжнародних та вітчизняних конференціях.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з вступу, чотирьох основних розділів («Огляд літератури», «Матеріали і методи дослідження», «Результати досліджень та їх обговорення» та «Узагальнення»), висновків та списку

використаних джерел. Робота викладена на 125 сторінках, ілюстрована 19 рисунками та 17 таблицями. Список літератури включає 218 найменувань.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** Узагальнено сучасні дані про метаболізм лімфом. Проаналізовано особливості мітохондрій пухлинних клітин. Проаналізовано особливості ключових енергетичних процесів у циклі Кребса та дихальному ланцюзі мітохондрій. Детально розглянуто потенційну роль мітохондрій як мішеней за дії протипухлинних препаратів.

**Матеріали і методи досліджень.** Основна частина роботи виконана на штамі мишачої лімфоми NK/Ly. Асцит отримували способом дренажу черевної порожнини анестезованих ефіром мишей стерильним шприцом під ефірним наркозом на 7-10 день після інокуляції. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва.

Мітохондрії клітин NK/Ly виділяли методом диференційного центрифугування. Клітини лімфоми осаджували із асциту центрифугуванням впродовж 5 хв за 1000 об/хв. Усі подальші маніпуляції проводили за температури 0–2°C. Осад клітин ресуспендували так, щоб об'єм суспензії відповідав початковому об'єму асциту, і гомогенізували в скляному гомогенізаторі зі швидкістю 2000 об/хв впродовж 10 хв. Гомогенат центрифугували 10 хв за 300 g для осадження незруйнованих клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту протягом 10 хв за 8500 g. Отриманий осад мітохондрій ресуспендували з розрахунку 0,1 мл розчину на 1 мл початкового асциту. Рівень білка у такій суспензії лімфоми становив 39,3 мг/мл. Отримані мітохондрії впродовж експерименту зберігали за температури 0–2°C в закритій пробірці. Мітохондрії печінки щурів та мишей виділяли за загальноприйнятим методом (Бабский и др., 1985).

Швидкість поглинання кисню реєстрували полярографічним методом за допомогою електроду Кларка в закритій комірці об'ємом 1,4 мл за температури 25°C. За полярографічними кривими визначали швидкість поглинання кисню у трьох метаболічних станах ( $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ), які були запропоновано Чансом і Вільямсом (Chance, Williams, 1956; Nicholls, Ferguson, 2013). Також розраховували дихальний контроль (ДК,  $V_3/V_4$  – за Чансом, і  $V_3/V_2$  – за Ларді), ефективність (АДФ/О), час ( $T_f$ ) і швидкість ( $V_f$ ) окисного фосфорилування. Отримані первинні дані аналізували за допомогою авторської програми MitoDancer. Отримані параметри перераховували відповідно до кількості мітохондрійного білка, який визначали за методом Лоурі. Результати швидкостей дихання мітохондрій наведено у вигляді діаграм запропонованих проф. Кондрашовою М.М. (Kondrashova et al., 1992). АТФ-азну активність визначали в постмітохондрійній фракції модифікованим методом Фіске-Субарроу (Buchkova, Chorna, 2014).

Для електронної мікроскопії суспензію мітохондрій промивали какодилатним буфером та фіксували розчином глутарового альдегіду і  $OsO_4$ . Фіксовані уранілацетатом зразки промивали і зневоднювали етанолом. Зневоднені зразки переносили в епоксидну смолу і поміщали у капсули для полімеризації. Зрізи

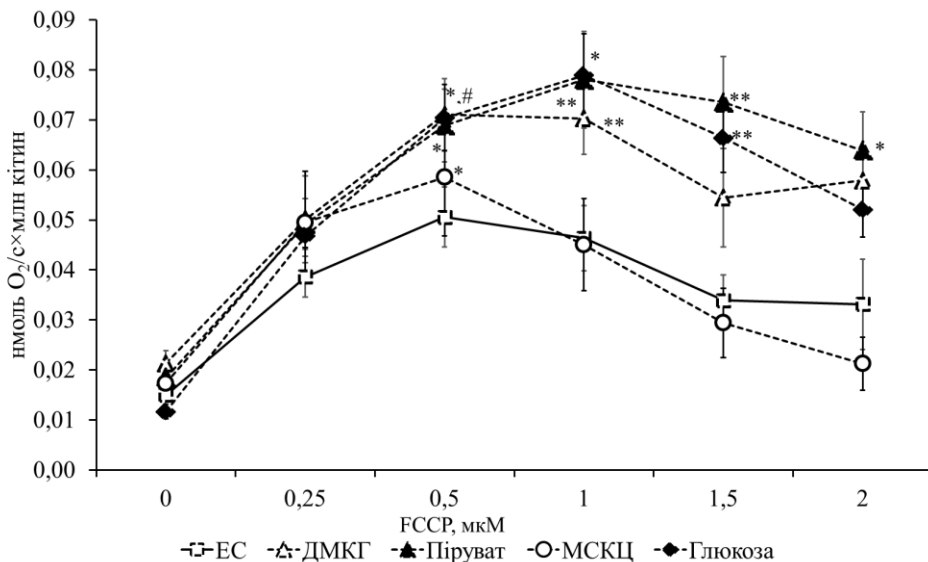
виготовляли за допомогою ультрамікротома УМТП-6М, контрастували, і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЕМ-100.

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Результати наведено як середнє арифметичне експериментів у серії  $\pm$  стандартна похибка ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). Аналіз статистичної достовірності, варіабельності та дисперсії отриманих результатів провадили за допомогою відповідно t-теста Стюдента, F-теста Фішера та програми ANOVA (Деркач та ін., 1977).

## Результати досліджень та їхнє обговорення

### Визначення максимальної окисної здатності клітин NK/Ly

На сьогодні достеменно не встановлено специфічні транспортні механізми, за допомогою яких енергетичні субстрати циклу Кребса можуть потрапляти у цитоплазму нативних (непермеабілізованих) клітин лімфоми NK/Ly. Встановлено, однак, що метилювання субстратів покращує їх проникність крізь плазматичну мембрану (MacDonald, Fahien, 1990; Rognstad, 1984). Для оцінки максимальної окисної здатності клітин їхнє дихання стимулювали послідовними додаваннями протонифікатора карбоніл цианіду-р-трифлюорометоксифенілгідрозону (FCCP) у полярографічну комірку в кінцевих концентраціях 0,25, 0,5, 1, 1,5 і 2 мкМ (рис. 1). Зростання дихання порівнювали із контрольними показниками за окиснення ендогенних субстратів (ЕС). За окиснення диметил- $\alpha$ -кетоглутарату (ДМКГ) швидкість стимульованого FCCP дихання статистично достовірно зростала у порівнянні із контролем за концентрацій протонифікатора 0,5, 1 і 2 мкМ, що свідчить про кращу проникність плазматичної мембрани для ДМКГ. Достовірної різниці між



**Рис. 1.** Зміни швидкості дихання клітин NK/Ly за окиснення ендогенних субстратів (ЕС, контроль) та додавання диметил- $\alpha$ -кетоглутарату (ДМКГ), монометилсукцината (МСКЦ), пірувату і глюкози на фоні протонифікатора FCCP. Статистично достовірні зміни: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  порівняно з контролем.

швидкістю дихання клітин контрольної групи та групи з додавання неметилюваного  $\alpha$ -кетоглутарату не було виявлено за жодної концентрації FCCP (дані на рисунку не представлені). Це підтверджує робочу гіпотезу про те, що активність специфічного транспортера  $\alpha$ -кетоглутарату є низькою у мітохондріях клітин NK/Ly.

За окиснення сукцината дихання лімфомних клітин статистично достовірно не відрізнялося від дихання з ЕС як за використання неметилюваного сукцината, так і

за проникного монометил-сукцинату (МСКЦ, рис. 1). Відсутність достовірної різниці між клітинним диханням за використання метильованої і неметильованої форм сукцинату може бути пояснена тим, що енергозалежний транспорт сукцинату через NaDC-3-транспортер конкурує за АТФ з  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазою (Wahrheit, 2015).

Наші дані підтвердили, що за використання метильованих форм естерів субстратів максимальна окисна здатність інтактних клітин лімфоми є вищою на 43% за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату порівняні з сукцинатом. Максимальна окисна здатність за окиснення ДМКГ була практично на одному рівні за окиснення глюкози чи пірувату (рис. 1), для яких виявлено специфічні переносники - МСТ для пірувату (Wallace, 2012) і GLUT для глюкози (Adekola et al., 2012). Отже,  $\alpha$ -кетоглутарат може бути ключовим енергетичним субстратом для мітохондрій лімфоми. Відомо, що теоретична ефективність окисного фосфорилування за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату (АДФ/О = 2,5) переважає ефективність ФАД-залежного сукцинату (АДФ/О = 1,5) (Hinkle, 2005). Це може свідчити про низьку порівняно з  $\alpha$ -кетоглутаратом афінність клітин лімфоми до сукцинату. Економне використання кисню є важливим для зазвичай гіпоксійних пухлинних клітин (Gogvadze et al., 2008), тому використання більш ефективних субстратів є енергетично виправданим.

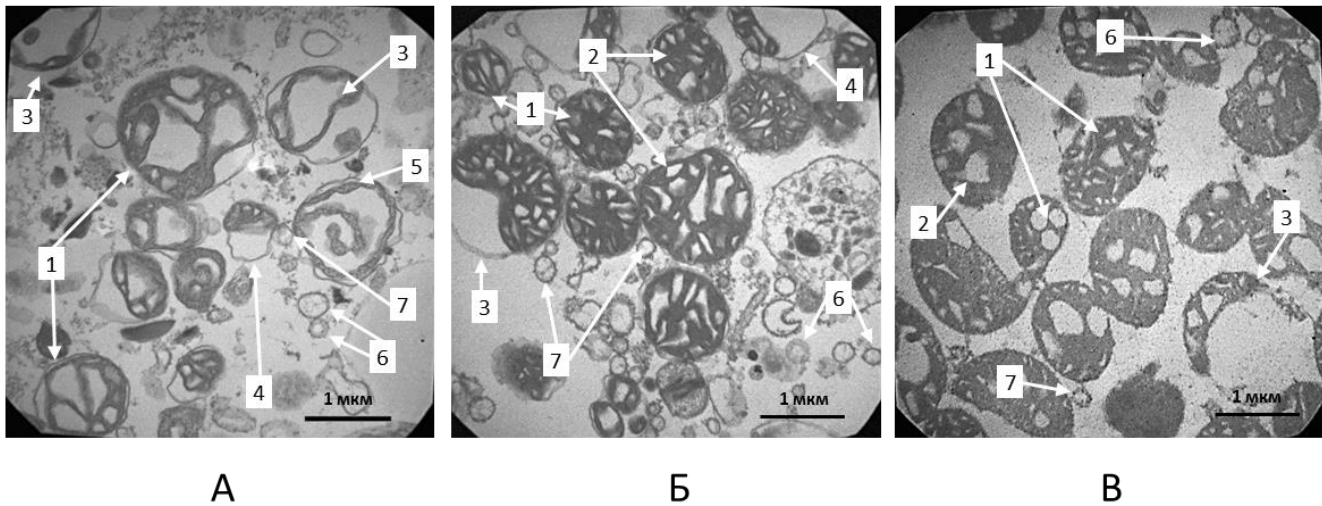
### ***Особливості виділення та морфологічний аналіз мітохондрій лімфоми***

Визначення максимальної окисної здатності за використання метильованих субстратів може бути використане для дослідження особливостей біоенергетичного метаболізму клітин. Однак цей методичний підхід дає змогу оцінити тільки один параметр – дихання мітохондрій за дії протонофора-роз'єднувача. Більш інформативним є метод ізольованих мітохондрій, який дає змогу моделювати функціональні стани, за умов спокою, активності, відновлення та окиснення різних енергетичних субстратів (Chance, Williams, 1955).

Класичним і апробованим об'єктом дослідження енергетичних процесів є мітохондрії печінки щура. Виділення мітохондрій з клітин NK/Ly було пов'язано з низкою особливостей експериментальної моделі лімфоми, малою кількістю мітохондрій та їхніми розмірами. Зокрема, для виділення "спряжених" мітохондрій, які б відповідали на додавання АДФ зворотнім прискоренням дихання ( $V_3$ ) потрібно було апробувати низку методичних прийомів (див. «Матеріали і методи досліджень»).

На рис. 2, А наведена електронна мікроскопічна фотографія непромитого осаду мітохондрій NK/Ly, який використовували в дослідженнях. Суспензія таких мітохондрій також містить інші клітинні органели. Як видно з рисунку, в полі зору мітохондрії займають 35–45 % від загальної площі. Лізосоми і пероксисоми натомість займають тільки 6–10 %. На рисунку також позначено автофагосоми (4), мікросоми (5) та мембрани асоційовані з мітохондріями (6), які формують контакти між ендоплазматичним ретикулумом і мітохондріями. Молодими, зрілими та старими мітохондріями вважають органели, що перебувають на різних стадіях розвитку (Белякович, 1990). Ізольовані мітохондрії лімфоми мають переважно кулясту форму, з вираженими, злегка набухлими кристами.





**Рис. 2.** Електронна мікроскопічна фотографія мітохондрій NK/Ly (А), печінки миші (Б) і печінки щура (В) за збільшення  $\times 10000$ : 1 – молоді мітохондрії, 2 – зрілі мітохондрії, 3 – старі мітохондрії, 4 – зовнішня мембрана мітохондрій, 5 – автофагосоми, 6 – мікросоми, 7 – мембрани асоційовані з мітохондріями (МАМ).

### *Порівняння дихання та окисного фосфорилування мітохондрій клітин лімфоми NK/Ly, печінки миші та печінки щура*

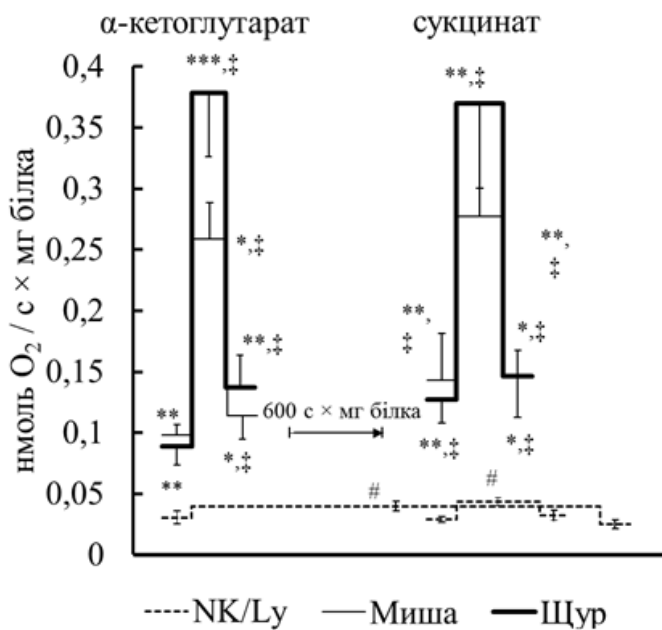
Порівнювали функціональну активність мітохондрій лімфоми з класичними об'єктами біоенергетичних досліджень - мітохондріями печінки щура і миші, за використання полярографічного методу. Виявлено, що швидкість поглинання кисню мітохондріями лімфоми в трьох метаболічних станах була у 5–8 разів нижчою, порівняно з мітохондріями печінки миші і у 6–10 разів нижчою, порівняно з мітохондріями печінки щура, як за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, так і сукцинату (рис. 3). За додавання АДФ спостерігали статистично достовірне зростання швидкості поглинання кисню в усіх зразках мітохондрій включно із органелами з NK/Ly. Також за допомогою тесту Фішера виявлена вища варіабельність швидкостей дихання мітохондрій лімфоми, порівняно з мітохондріями печінки. Це може бути зумовлено гетерогенністю мітохондрійної суспензії швидко проліферуючих пухлинних клітин або з природними процесами резистентності до злоскісної трансформації.

Таблиця 1.

Показники окисного фосфорилування в мітохондріях лімфоми NK/Ly, печінки щура та миші за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату

Показники	Субстрати	Лімфома	Печінка миші	Печінка щура
АДФ/О	$\alpha$ -кетоглутарат	$1,07 \pm 0,31$	$1,33 \pm 0,12^*$	$1,87 \pm 0,07^*$
	Сукцинат	$1,09 \pm 0,07$	$1,62 \pm 0,09^{**}$	$1,42 \pm 0,07^*$
$V_{\phi}$	$\alpha$ -кетоглутарат	$0,09 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,14^*$	$1,40 \pm 0,18^{**}$
	Сукцинат	$0,10 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,11^*$	$1,03 \pm 0,18^{**}$

Примітка. Одиниці наведених показників: АДФ/О – у нмоль АДФ / нг-ат. О, швидкість фосфорилування ( $V_{\phi}$ ) – у нмоль АДФ/с $\times$ мг білка. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$  порівняно з мітохондріями NK/Ly.



**Рис. 3.** Швидкості дихання мітохондрій лімфоми, печінки щура і печінки миші за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату. \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; ‡ –  $p < 0,05$  за тестом Фішера порівняно з мітохондріями NK/Ly

підтверджена статистично. АДФ/О у мітохондріях печінки щура було достовірно вищим і за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (зростання на 75,2%), і за сукцинату (зростання на 30,3%).

У мітохондріях NK/Ly статистично достовірно нижчою була і швидкість фосфорилування АДФ, а саме: в мітохондріях печінки щура за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату швидкість синтезу АТФ становила  $1,4 \pm 0,18$  нмоль АДФ/с×мг білка, в мітохондріях печінки миші, вона була нижчою на 50%, а у мітохондріях пухлинних клітин – на 93,6%. Подібну закономірність спостерігали і за окиснення сукцинату - мітохондрії лімфоми мали нижчу швидкість окисного фосфорилування як супроти мітохондрій печінки щура (на 90,3%), так і мітохондрій печінки миші щура (на 88,9%). Зміни часу фосфорилування ( $T_{\phi}$ ) свідчать, що за окиснення НАД-залежного  $\alpha$ -кетоглутарату час фосфорилування у мітохондріях лімфоми був майже в 10 разів більший, ніж у мітохондріях печінки.

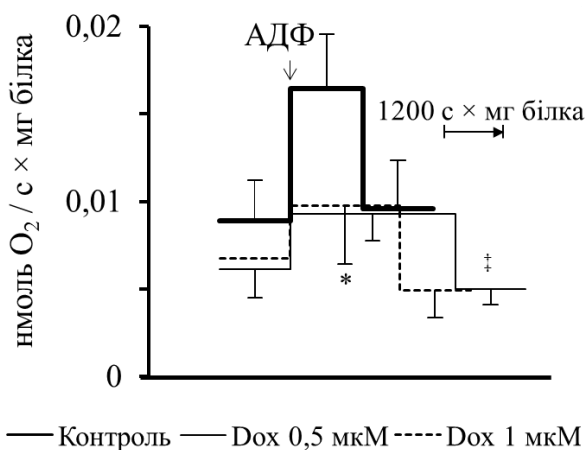
### ***Вплив доксорубіцину на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly***

Резистентність пухлинних клітин до хіміотерапії визначається енергетичним станом мітохондрій, інтенсивністю їхнього дихання та спряженням дихання і окисного фосфорилування (Debatin et al., 2002; Galluzzi et al., 2006). Антибіотик доксорубіцин, що відомий з 60-х років ХХ століття, належить до найпоширеніших протипухлинних препаратів, проте йому притаманні такі властивості, як кардіотоксичність та накопичення іонів заліза у мітохондріях (Ichikawa et al, 2014).

За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату показники дихального контролю у мітохондріях мишей достовірно не відрізнялися. Разом з тим, у мітохондріях лімфоми величини дихального контролю були статистично достовірно нижчими в порівнянні з мітохондріями печінки миші тільки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, тоді як порівняно з мітохондріями печінки щура достовірна різниця була зафіксована за окиснення обох субстратів. За окиснення сукцинату співвідношення АДФ/О у мітохондріях лімфоми було достовірно нижчим на 32,8% ( $p < 0,05$ ), ніж у мітохондріях печінки миші. Схожу відмінність спостерігали і за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, однак вона не

За додавання доксорубіцину (0,5 мкМ) до мітохондрій спостерігали зниження швидкості дихання у 3-му метаболічному стані (з  $0,016 \pm 0,003$  нмоль  $O_2$ /с×мг білка – до  $0,009 \pm 0,002$  нмоль  $O_2$ /с×мг білка), порівняно з контрольними параметрами, за окиснення НАД-залежного субстрату. Слід зазначити, що доксорубіцин статистично достовірно збільшував варіабельність  $V_4$ , про що засвідчив тест Фішера (рис. 4).

За окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату змін швидкостей дихання виявлено не було, незалежно від концентрації препарату, що свідчить про вплив доксорубіцину саме на перший комплекс дихального ланцюга.



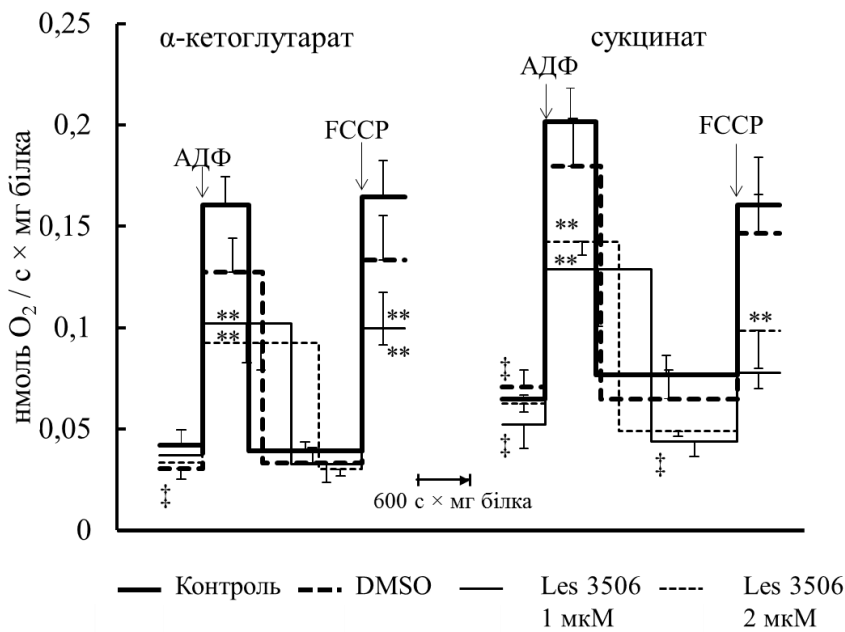
**Рис. 4.** Швидкості дихання мітохондрій лімфоми за впливу доксорубіцину (Dox) і окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

мітохондрійну мембрану клітин NK/Ly, на відміну від кардіоміоцитів, в яких після впливу препарату зафіксовані мембранні порушення (Berthiaume et al., 2005). В той же час доксорубіцин не змінював ні ефективність, ні швидкість окисного фосфорилування.

### ***Вплив Les 3506 на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура***

Негативний вплив протипухлинних препаратів на нормальні клітини є важливою проблемою хіміотерапії. Це може стосуватися й ізатинвмісного похідного 4-тіазолідинонів препарату Les 3506. Виявлено, що ця речовина статистично достовірно інгібувала швидкість стимульованого дихання мітохондрій як за додавання АДФ, так і FCCP. Отримані результати свідчать про інгібуючий вплив препарату на дихальний ланцюг мітохондрій печінки, незалежно від субстрату.

Les 3506 інгібував швидкість дихання мітохондрій – як при стимуляції за додавання АДФ (на 42,4%), так і за додавання FCCP (на 39,3%) (рис. 5). Отримані результати свідчать про інгібуючий вплив цього протипухлинного препарату на дихальний ланцюг мітохондрій печінки, незалежно від субстрату окиснення. Les3506 розчиняли за допомогою розчинника диметилсульфоксиду (DMSO), який сам статистично достовірно не впливав ні на швидкості дихання, ні на параметри окисного фосфорилування. Серед показників дихального контролю тільки за окиснення сукцинату було виявлено зниження дихального контролю за Ларді за концентрації Les 3506 3 мкМ.



**Рис. 5.** Швидкості дихання мітохондрій печінки у різних метаболічних станах за додавання Les 3506 і окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату. Статистично достовірні зміни: \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; ‡ –  $p < 0,05$  за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p < 0,05$

АДФ/О мітохондрій печінки не змінювалось за різних комбінацій концентрації препарату чи субстратів. Однак, швидкості фосфорилування АДФ статистично достовірно сповільнювались за впливу препарату і окиснення як НАД-, так і ФАД-залежного субстратів. Так, наприклад, за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату швидкість фосфорилування достовірно знижувалась на 45–50%. Відповідно, час фосфорилування теж змінився – за концентрації Les 3506 2 мкМ (за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату)

він зріс від  $535 \pm 26,0$  с x мг білка до  $1032 \pm 173$  с x мг білка (92,9%), а за концентрації Les 3506 3 мкМ (за окиснення сукцинату) – від  $590 \pm 60,0$  с x мг білка до  $864 \pm 42,7$  с x мг білка (46,4%).

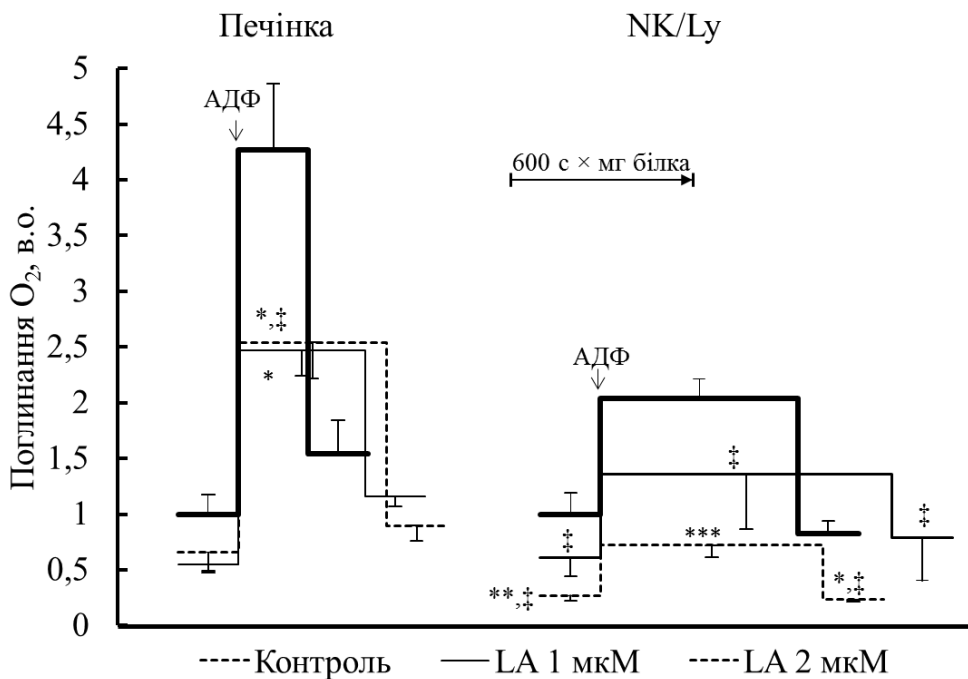
### **Порівняння впливу ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування у мітохондріях лімфоми NK/Ly і печінки щура**

Результати представлені в попередніх розділах свідчать, що активні протипухлинні препарати інгібують дихання та окисне фосфорилування як у мітохондріях лімфоми (доксорубіцин), так і у мітохондріях печінки (Les 3506). Наступним етапом досліджень було вивчення впливу нового протипухлинного препарату ландоміцину А, антибіотика родини ангуциклінів, які мають яскраво виражені проапоптичні та прооксидативні властивості (Korynevskaya et al., 2007; Panchuk et al., 2013).

За додавання в полярографічну комірку ландоміцину А в концентраціях 1 і 2 мкМ не змінював швидкості  $V_2$  і  $V_4$  мітохондрій печінки (рис. 6). Натомість цей протипухлинний препарат статистично достовірно ( $p < 0,05$ ) інгібував швидкість дихання на 40 – 42 % в активному метаболічному стані ( $V_3$ ) і цей ефект спостерігали за дії обох доз. У мітохондріях лімфоми ландоміцину А інгібував дихання в усіх трьох метаболічних станах за концентрації 2 мкМ, на 73,0%, 64,6% і 71,7% відповідно. Додавання ландоміцину А статистично достовірно збільшувало варіабельність досліджуваних показників, як у мітохондріях печінки, так і лімфоми. Дисперсійний аналіз частки впливу ландоміцину А на енергетичні процеси у мітохондріях виявив, що за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату частка впливу ландоміцину на  $V_3$  становила 48,5% (1 мкМ) і 45,0% (2 мкМ) (рис. 7). У мітохондріях NK/Ly

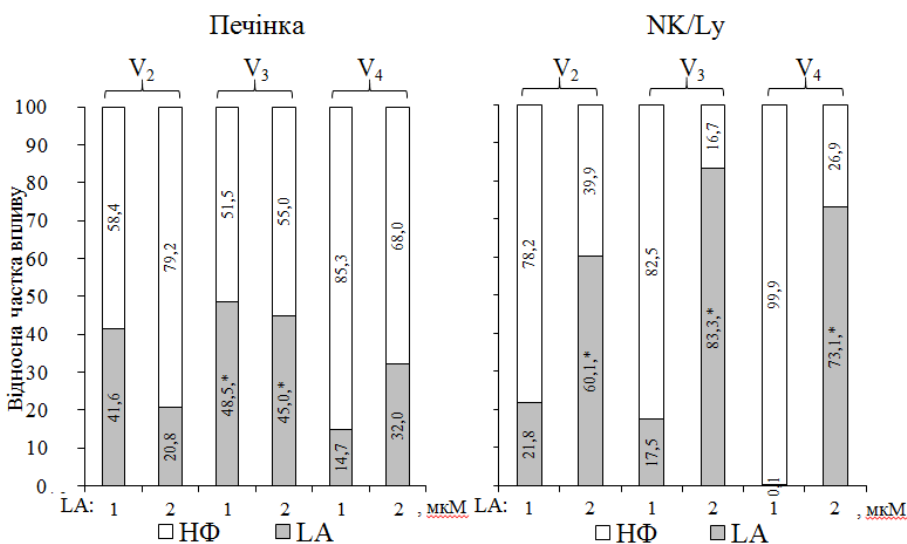
частка впливу 2 мкМ ландоміцину була статистично достовірною і більш вираженою в усіх метаболічних станах: 60,1% ( $V_2$ ), 83,3% ( $V_3$ ), 73,1% ( $V_4$ ).

За окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату єдиним показником, який мав тенденцію до зниження ( $p < 0,12$ ) була швидкість  $V_3$  мітохондрій печінки після



**Рис. 6.** Швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за додавання ландоміцину А (LA) і окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. За одиницю взято значення  $V_2$  контролю. Статистично достовірні зміни: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,001$  порівняно з контролем; † –  $p < 0,05$  за тестом Фішера порівняно з контролем.

додавання 2 мкМ препарату. Усі інші швидкості дихання за окиснення сукцинату не змінювались, що було підтверджено також і дисперсійним аналізом.



**Рис. 7.** Відносна частка впливу ландоміцину А (LA) на зміни швидкостей дихання мітохондрій за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату НФ – частка неврахованих факторів. \* –  $p < 0,05$

фосфорилування. За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату в мітохондріях печінки АДФ/О статистично достовірно знижувався порівняно з контролем на 13% ( $p < 0,02$ ) за додавання ландоміцину А в концентрації 1 мкМ, і на 17% за додавання удвічі більшої дози ( $p < 0,05$ ). За окиснення сукцинату АДФ/О в мітохондріях печінки щура навпаки зростало, проте ці зміни не сягнули рівня достовірності ( $p < 0,12$ ), що

Таким чином, можна припустити вибірково інгібуючий ефект ландоміцину А на перший комплекс дихального ланцюга у мітохондрій та вищу чутливість мітохондрій лімфоми до дії протипухлинного препарату за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату у порівнянні з сукцинатом.

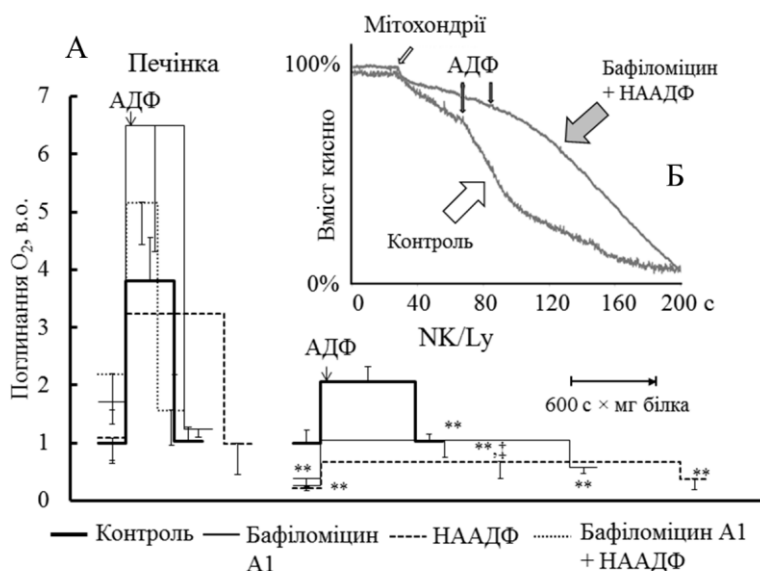
Було також обчислено значення дихальних контролів, АДФ/О, швидкості і часу

свідчить про зниження ландоміцином ефективності фосфорилування тільки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. За використання мітохондрій NK/Ly усі зміни даного параметру перебували в межах похибки, що свідчить про відсутність вираженого впливу препарату на АТФ-синтазну активність у пухлинних клітинах.

Вплив ландоміцину А на мітохондрії печінки щура був виявлений і за аналізу швидкості фосфорилування АДФ, яка відображає активність АТФ-синтази у внутрішній мембрані мітохондрій. В контрольних мітохондріях печінки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату швидкість синтезу АТФ становила (у нмоль АДФ/с $\times$ мг білка)  $1,4\pm 0,18$ , а за додавання препарату вона сповільнювалась вдвічі – до  $0,70\pm 0,08$  за 1 мкМ ландоміцину А і до  $0,63\pm 0,08$  за 2 мкМ досліджуваної речовини. За окиснення сукцинату швидкість фосфорилування АДФ у мітохондріях печінки в контролі становила  $1,42\pm 0,07$  і достовірно не змінювалась за додавання препарату. Натомість не спостерігали змін швидкості фосфорилування у мітохондріях лімфоми – як з  $\alpha$ -кетоглутаратом, так і з сукцинатом. Зміни часу фосфорилування були обернено пропорційні до змін  $V_{\phi}$ . За окиснення НАД-залежного субстрату час фосфорилування в мітохондріях печінки зростав із  $230\pm 21,5$  с $\times$ мг білка (контроль) до  $417\pm 30,2$  с $\times$ мг білка (1 мкМ ландоміцину А) і до  $490\pm 89,7$  с $\times$ мг білка (2 мкМ ландоміцину А), тоді як у мітохондріях лімфоми контрольні та дослідні значення згідно критерію Стюдента не відрізнялися. За окиснення сукцинату не спостерігали достовірних змін часу фосфорилування за дії обох концентрацій ландоміцину.

### **Окрема та сумісна дія бафіломіцину А1 та НААДФ на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly і печінки щура**

Інгібітор  $H^+$ -АТФази бафіломіцин А1 та стимулятор виходу  $Ca^{2+}$  з кислих депо НААДФ (Lee et al., 2005) не впливали на швидкості дихання мітохондрій печінки у



**Рис. 8.** Швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за додавання бафіломіцину А1 та НААДФ за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. \*\* –  $p < 0,01$  порівняно з контролем

Було проведено дисперсійний аналіз частки окремого впливу бафіломіцину та НААДФ на швидкості дихання у мітохондріях лімфоми за окиснення

різних метаболічних станах за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (рис. 8, А). Натомість на мітохондріях лімфоми було встановлено зниження як стимульованого АДФ, так і нестимульованого дихання за окремого додавання бафіломіцину чи НААДФ. За сумісного впливу досліджуваних препаратів після додавання АДФ не спостерігали метаболічні стани 3 і 4 через неконтрольоване підвищення швидкості дихання (рис. 8, Б), що свідчить про пошкодження мембрани та порушення sprzęження між процесами дихання і окисного фосфорилування.

$\alpha$ -кетоглутарату. Частка впливу бафіломіцину була високою і статистично достовірною, і становила 72,9% ( $V_2$ ), 63,2% ( $V_3$ ,  $p < 0,059$ ), і 68,8% ( $V_4$ ). Частка впливу НААДФ становила 75,7% ( $V_2$ ), 76,0% ( $V_3$ ), і 67,0% ( $V_4$ ). Дисперсійний аналіз сумісної дії бафіломіцину та НААДФ не робили, бо як вказано вище, у мітохондріях лімфоми додавання АДФ за такого сумісного впливу викликало неконтрольовану активацію дихання (рис. 8). Ефекти бафіломіцину і НААДФ на дихання мітохондрій печінки не були підтверджені t-тестом (рис. 8).

Бафіломіцин та НААДФ поокремо також впливали і на параметри окисного фосфорилування. Зафіксовано зниження АДФ/О в мітохондріях печінки за дії обох речовин за окиснення сукцинату на 24,9% ( $p < 0,05$ ). Швидкість і час фосфорилування не змінювалися порівняно з контрольними значеннями. В мітохондріях лімфоми за дії НААДФ швидкість фосфорилування знижувалася – з  $0,10 \pm 0,03$  нмоль АДФ/с $\times$ мг білка до  $0,02 \pm 0,004$  нмоль АДФ/с $\times$ мг білка ( $p < 0,01$ ), а час фосфорилування зростав – з  $682 \pm 173$  с $\times$ мг білка до  $2592 \pm 180$  с $\times$ мг білка ( $p < 0,01$ ). Дані зміни відбувалися за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, а за окиснення сукцинату змін цих параметрів не спостерігали. Отже, за сумісної дії бафіломіцину і НААДФ спостерігали статистично достовірне розпрямлення процесів дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях лімфоми за окиснення обох субстратів.

Суспензія ізольованих мітохондрій лімфоми містить також частину фракції лізосом, пероксисом, фагосом та мікросом (рис. 2), які можуть впливати на АТФ-залежні процеси у клітині. З'ясовано, що бафіломіцин не впливає на активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми. Встановлено, що НААДФ викликає зростання активності  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпи на  $54,18 \pm 7,84\%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) щодо контролю, а також підвищує активність  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани у три рази ( $p < 0,05$ ). Активність  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулу та базальної  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази не змінювалась за дії НААДФ. Після преінкубації постмітохондріальної фракції клітин лімфоми з бафіломіцином НААДФ-індуковане зростання активності  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпи було менш виражене, однак ще більше підвищувалась активність  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани. Оскільки  $\text{H}^+$ -помпа у клітинах лімфоми мишей розміщена на поверхні плазматичної мембрани, її функція не пов'язана з іншими АТФ-азами. Взаємозв'язок між  $\text{H}^+$ -АТФ-азою та помпами плазматичної мембрани ( $\text{Ca}^{2+}$ - і  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-ази) виявлено тільки за активування НААДФ-чутливого депо. Отже, кислотне депо клітин лімфоми НК/Лу, яке містить  $\text{H}^+$ -помпу і НААДФ-чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали та впливає на функціонування мітохондрій, має тісні зв'язки з плазматичною мембраною.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

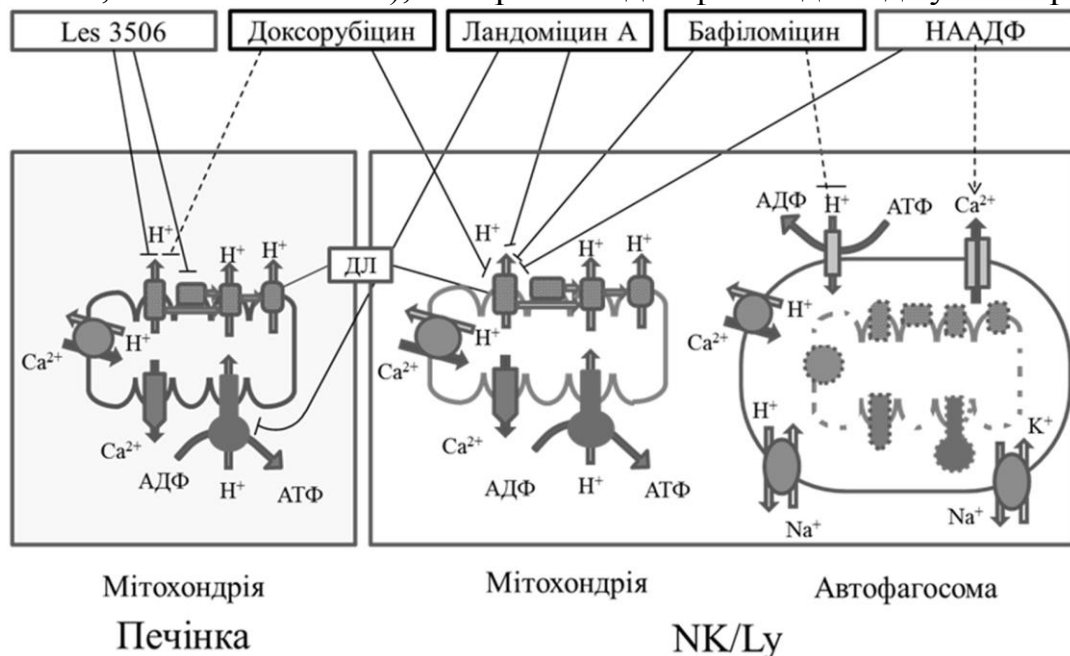
На суспензії клітин лімфоми за окиснення метильованих форм субстратів була виявлена субстратна залежність максимальної окисної здатності мітохондрій, яка була вищою за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату порівняно із сукцинатом і на одному рівні з піруватом і глюкозою. Використаний полярографічний метод вивчення ізольованих мітохондрій дав змогу отримати статистично достовірну інформацію про швидкості дихання в різних метаболічних станах, швидкість та час окисного фосфорилування та його спряження з процесами дихання за окиснення різних енергетичних субстратів. На суспензії клітин можна реєструвати тільки швидкості

дихання з огляду на методичні та функціональні обмеження пов'язані, зокрема, з труднощами транспорту субстратів через плазматичну мембрану.

Виділені вперше мітохондрії лімфони NK/Ly є функціонально активними і структурно цілісними. Порівняно з мітохондріями печінки, для них характерні повільніші швидкості дихання, нижчі показники дихального контролю та окисного фосфорилування, що пов'язано з певними особливостями пухлинної тканини, а також відомим ефектом Варбурга, який передбачає перевагу гліколізу перед окисними процесами в мітохондріях за енергетичного забезпечення ракових клітин (Warburg, 1967). Разом з тим, у мітохондріях клітин лімфони зменшення показників дихального контролю і збільшення тривалості часу фосфорилування спостерігали переважно за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату. Нижчі швидкості окисного фосфорилування, порівняно із мітохондріями печінки щура, описано і для мітохондрій клітин карциноми Ерліха (Borst, 1960; Hawtrey, Silk, 1960). За окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату спостерігали нижче співвідношення АДФ/О в порівнянні із мітохондріями печінки.

Важливим завданням роботи було вивчення впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси ізольованих мітохондрій. Використовували як добре відомі хіміопрепарати (доксорубіцин), так і нові (Les 3506, ландоміцин А, бафіломіцин).

Отримані результати узагальнені на рис. 9, де показано (зліва направо) мітохондрію печінки, мітохондрію лімфони NK/Ly та гіпотетичну автофагосому, що здійснює процес мітоптозу. На схемі в мембрані мітохондрій схематично зображено дихальний ланцюг (ДЛ), АТФ-синтазу та транспортні системи ( $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  обмінник,  $\text{Ca}^{2+}$ -канали,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -обмінник), які причетні до ефектів досліджуваних речовин.



**Рис. 9.** Схема впливу протипухлинних препаратів на дихання та синтез АТФ у мітохондріях і можливі механізми реалізації ефектів. Суцільними лініями представлено отримані дослідні дані, пунктирними – літературні дані. ДЛ – дихальний ланцюг. Інші пояснення в тексті

Відомий протипухлинний препарат доксорубіцин інгібував швидкість дихання мітохондрій лімфони у третьому метаболічному стані за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату,



що свідчить про можливий вплив речовини на перший комплекс дихального ланцюга мітохондрій. Відомо, що більшість протипухлинних препаратів *in vivo* мають побічні ефекти, в першу чергу в печінці. Можливий вплив протипухлинного препарату на нормальні клітини досліджували на мітохондріях гепатоцитів, які є, з одного боку – класичним об'єктом дослідження клітинної енергетики, а з іншого – печінка є головним детоксикуючим органом. Препарат Les 3506 проявляв інгібуючий ефект на мітохондрії печінки щура, знижуючи як швидкість дихання за окисного фосфорилування АДФ, так і максимальну окисну здатність мітохондрій за додавання FCCP.

Одночасний вплив протипухлинного препарату як на мітохондрії лімфоми, так і мітохондрії печінки досліджували за допомогою антибіотика ландоміцину А. Цей препарат за додавання до мітохондрій знижував інтенсивність енергетичних процесів та забезпеченість клітин АТФ у мітохондріях як лімфоми, так і печінки щура за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Такі ефекти треба брати до уваги за планування хіміотерапії пухлин з цим антибіотиком, оскільки він може пригнічувати енергетичні процеси у гепатоцитах.

Пошук протипухлинного препарату, який би інгібував енергетичні процеси у ракових клітинах, але не впливав на клітини печінки, привів до аналізу ефектів інгібітора  $H^+$ -АТФази V-типу бафіломіцину разом та поокремо з агоністом  $Ca^{2+}$ -каналів НААДФ у кислих депо клітин. Відомо, що в ракових пухлинах процеси фагоцитозу є активовані для ліквідації апоптозних та некрозних клітин та їхніх мітохондрій (Chaabahe et al., 2010). Пошкоджені мітохондрії можуть поглинатися та розщеплюватися фагоцитами, які в цьому випадку називають автофагосомами (Скулачев и др., 2010). Бафіломіцин та НААДФ не впливали достовірно на показники мітохондрій печінки, але статистично достовірно пригнічували та розпрямували дихання і окисне фосфорилування мітохондрій НК/Лу.

Системам активного транспорту іонів приділяють важливу увагу в пошуку засобів протипухлинної терапії, що було одним із етапів дисертаційної роботи. Бафіломіцин не впливав на активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми. НААДФ викликав зростання активності  $Na^+/K^+$ -помпи, а також підвищував активність  $Ca^{2+}$ -помпи в три рази. Активність  $Ca^{2+}$ -помпи ендоплазматичного ретикулуму і базальної  $Mg^{2+}$ -АТФ-ази не змінювалась за дії НААДФ. Після преінкубації постмітохондріальної фракції клітин лімфоми з бафіломіцином НААДФ-індуковане зростання активності  $Na^+/K^+$ -помпи було менш виражене, однак ще більше підвищувалась активність  $Ca^{2+}$ -помпи плазматичної мембрани. Взаємозв'язок між  $H^+$ -АТФ-азою та помпами плазматичної мембрани виявлено тільки за активування НААДФ-чутливого депо. Отже, кислотне депо клітин лімфоми НК/Лу, яке містить  $H^+$ -помпу і НААДФ-чутливі  $Ca^{2+}$ -канали, має тісні зв'язки з плазматичною мембраною

Інгібуючий ефект бафіломіцину А1 на активність  $H^+$ -АТФаз (Graham et al, 2014), може призводити до зниження рН у клітині. Закислення внутрішньоклітинного середовища часто використовується за протипухлинної терапії (Hernández al, 2010). Кальцієвий агоніст НААДФ може викликати вивільнення  $Ca^{2+}$  з автофагосом через двопорові канали (Lee, 2005) у кількостях, які перевищують кальцієву ємність пухлинних мітохондрій, і таким чином викликати

пригнічення енергетичних процесів аж до незворотніх деструктивних змін у мітохондріальних мембранах. Автофагосоми є реакцією клітини на дефектні мітохондрії, вихід з яких цитохрому с потенційно може викликати апоптоз (Tinari et al., 2010). Внаслідок мітоптозу пошкоджені мітохондрії поглинаються автофагосомами. Таким чином, метаболічні регулятори, які можуть закислювати внутрішньоклітинне (позамітохондрійне) середовище та викликати істотне зростання клітинного  $\text{Ca}^{2+}$ , можуть бути запропоновані для подальших досліджень як потенційні протипухлинні препарати.

## ВИСНОВКИ

Отримані результати розширюють уявлення про особливості енергетичного метаболізму пухлинних клітин на прикладі лімфоми Немет-Келнера. З'ясовано закономірності впливу протипухлинних хіміотерапевтичних препаратів на енергетичні процеси в мітохондріях лімфоми.

На основі аналізу отриманих результатів зроблено такі висновки:

1. За використання метильованих форм естерів енергетичних субстратів встановлено, що окисна здатність інтактних клітин лімфоми за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату є вищою на 43% у порівнянні із ФАД-залежним субстратом сукцинатом.

2. Вперше виділені функціонально активні мітохондрії лімфоми НК/Лу зі спряженим диханням та окисним фосфорилуванням, які можуть бути зручними об'єктами для дослідження енергетичних процесів у пухлинних клітинах та впливу на ці процеси протипухлинних препаратів *in vitro*.

3. Швидкість дихання ізольованих мітохондрій лімфоми є в 4–6 разів повільнішою, ніж у мітохондріях печінки, незалежно від метаболічного стану чи субстрату окиснення. Інтенсивність та спряженість процесів окисного фосфорилування в мітохондріях лімфоми є суттєво нижчими, ніж у мітохондріях печінки.

4. Відомий апоптозний препарат доксорубіцин сповільнює швидкості дихання у мітохондріях лімфоми миші на 43,8%, але не впливає на процеси спряження дихання та окисного фосфорилування. Такий ефект може бути пов'язаний із порушеннями процесу транспорту електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій, наприклад, через вивільнення цитохрому с із міжмембранного простору органел.

5. Експериментальний протипухлинний препарат Les 3506 проявляє субстрат-незалежну інгібуючу дію на функціонування дихального ланцюга мітохондрій печінки (зниження швидкості дихання на 36,1% у третьому метаболічному стані за Чансом) і швидкість синтезу АТФ (зниження швидкості фосфорилування на 40,7%), що ставить під сумнів можливість його фармакологічного застосування, у зв'язку з можливою гепатотоксичністю даної речовини.

6. Новий протипухлинний антибіотик ландоміцин А статистично достовірно знижує швидкість дихання в третьому метаболічному стані (на 41,3% у мітохондріях печінки і на 49,0% у мітохондріях лімфоми) та швидкість окисного фосфорилування (на 52% у мітохондріях печінки) за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату.

За окиснення сукцинату ландоміцин А викликає тенденцію до змін, що є реципрокними до змін за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (найбільш виражено для АДФ/О). Отже, ландоміцин А пригнічує енергетичні процеси у мітохондріях лімфоми, але ще більше у мітохондріях печінки щура.

7. Інгібітор  $H^+$ -АТФази бафіломіцин та агоніст  $Ca^{2+}$ -каналів кислих депо клітин НААДФ призводять до селективного пригнічення енергетичних процесів у мітохондріях лімфоми (зниження швидкості у третьому метаболічному стані на 49,1% (бафіломіцин) та на 67,1% (НААДФ)) без достовірного впливу на мітохондрії печінки.

8. Бафіломіцин разом з НААДФ призводять до повного розпряження мітохондрій лімфоми протягом чи після синтезу АТФ як за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, так і сукцинату. Такий виражений вплив бафіломіцину А1 та НААДФ може бути пов'язаний з присутністю в мітохондрійних суспензіях автофагосом.

9. Мітохондрії лімфоми НК/Ly та мітохондрії печінки можуть бути використані як чутливі мішені для вивчення впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси в пухлинних і нормальних клітинах.

### **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Гренюх В. П. Порівняльна характеристика параметрів дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях лімфоми НК/Ly та печінки миші / В. П. Гренюх, М. Д. Луцик, Р. А. Стойка, А. М. Бабський. // *Studia Biologica*. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 39–50 (Здобувач самостійно виконав усю експериментальну частину досліджень, статистично опрацював отримані дані, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)

2. Гренюх В. Вплив ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій / В. Гренюх, Л. Легка, О. Єлісеєва, Р. Панчук, Р. Стойка, А. Бабський // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. – 2015. – Т.69. – С. 49–56 (Здобувач самостійно виконав усю експериментальну частину досліджень, статистично опрацював отримані дані, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)

3. Бичкова С. АТФазна активність мікросомальної фракції лімфоми НК/Ly за дії бафіломіцину та НААДФ / С. Бичкова, В. Гренюх // *Studia Biologica*. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 31–38. (Здобувач самостійно виконав значну частину експериментальних досліджень, статистично опрацював отримані дані, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)

4. Гренюх В. П. Максимальна окисна здатність мітохондрій клітин лімфоми НК/Ly за використання метилових естерів енергетичних субстратів / В. П. Гренюх, Б. О. Манько, О. О. Сідорова, Й. В. Царик, М. І. Голубев, А. М. Бабський // *Біологія тварин*. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 42–48 (Здобувач самостійно виконав значну частину експериментальних досліджень, статистично опрацював отримані дані, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)

5. Hreniukh V. Maximal oxidative capacity of NK/Ly lymphoma cells upon glucose, pyruvate and glutamine oxidation / V. Hreniukh, B. Manko, O. Sidorova, A. Babsky // *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. – 2016. – Vol. 71, №1. – P. 65–71 (Здобувач самостійно виконав основну частину експериментальних досліджень,

статистично опрацював отримані дані, взяв активну участь в аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)

6. Babsky A. M. Contribution of perfusion in diffusion-weighted  $^1\text{H-MRI}$  of intrahepatic and subcutaneous hepatocellular carcinoma in rat / A. M. Babsky, B. George, V. P. Greniukh, N. Bansal // *Studia Biologica*. – 2013. – Vol. 7, № 2. – P. 5–14 (Здобувач брав участь у статистичному опрацюванні отриманих даних, аналізі результатів досліджень, написанні та оформленні статті)

7. Гренюх В. Вплив ландоміцину А на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура / В. Гренюх, М. Солиган, Р. Панчук, А. Бабський // X Міжнародна конференція «Молодь і поступ у біології», Львів, 5–8 квітня 2014 р. : тези доп. – Львів, 2014. – С. 49.

8. Гренюх В. П. Аналіз параметрів дихання та окисного фосфорилування мітохондрій за використання програми MATLAB / В. П. Гренюх, А. М. Бабський // XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П. Г. Костюка з міжнародною участю, Львів, 26-29 травня 2014 року. – Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, № 3. – С. 103.

9. Гренюх В.. Вплив Les 3106 на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура / В. Гренюх, В. Чумак, А. Бабський // Актуальні питання сучасної біології, Львів, 2–3 жовтня, 2014 р. : тези доп. – Львів, 2014. – С. 195.

10. Гренюх В. Порівняння параметрів дихання і окисного фосфорилування мітохондрій NK/Ly та мітохондрій печінки миші / В. Гренюх, В. Чумак, А. Бабський. // Міжнародна конференція «Механізми функціонування фізіологічних систем», Львів, 15–17 жовтня, 2014 р. : тези доп. – Львів, 2014. – С. 67.

11. Бойків М. Вплив бафіломіцину А1 та НААДФ на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазну активність мікросомальної фракції лімфони NK/Ly / М. Бойків, В. Гренюх, С. Бичкова // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, 20–23 квітня 2015 р. : тези доп. – Львів, 2015. – С. 438.

12. Гренюх В. Вплив бафіломіцину та НААДФ на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура / В. Гренюх, Т. Луців, О. Руда, С. Бичкова, А. Бабський // XI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології», Львів, 20–23 квітня 2015 р. : тези доп. – Львів, 2015. – С. 450.

13. Бабський А. Поглинання кисню та фосфорилування АДФ у мітохондріях лімфом NK/Ly за впливу ландоміцину А *in vitro* / А. Бабський, В. Гренюх, Я. Шалай // VI З'їзд українського біофізичного товариства, Луцьк, 28–30 травня 2015 р. : тези доп. – Луцьк, 2015. – С. 65-66

14. Бичкова С. Порівняння впливу бафіломіцину та НААДФ на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помп субклітинної фракції лімфом та печінки / С. Бичкова, В. Гренюх // VI З'їзд українського біофізичного товариства, Луцьк, 28–30 травня 2015 р. : тези доп. – Луцьк, 2015. – С. 39-40

## АНОТАЦІЯ

**Гренюх В.П. Особливості біоенергетичних процесів у мітохондріях клітин лімфони Немет-Келнера. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, 2016.

Дисертація присвячена особливостям біоенергетичних процесів у мітохондріях клітин лімфоми Немет-Келнера та використанню цих органел як мішеней дії протипухлинних препаратів. Вперше виділені функціонально активні мітохондрії лімфоми НК/Лу зі спряженим диханням та окисним фосфорилуванням, швидкість дихання, інтенсивність та спряженість процесів окисного фосфорилування яких є суттєво нижчими, ніж у мітохондріях печінки. Доксорубіцин сповільнює швидкості дихання у мітохондріях лімфоми миші на 43,8%, але не впливає на процеси спряження дихання та окисного фосфорилування. Les 3506 знижує швидкість поглинання кисню на 36,1% у третьому метаболічному стані за Чансом і швидкість фосфорилування на 40,7%. Ландоміцин А знижує швидкість дихання у метаболічному стані 3 у мітохондріях печінки і лімфоми та швидкість окисного фосфорилування в мітохондріях печінки за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату. Бафіломіцин та НААДФ призводять до зниження швидкості у третьому метаболічному стані на 49,1% (бафіломіцин) та 67,1% (НААДФ) у мітохондріях лімфоми без впливу на мітохондрії печінки. Бафіломіцин разом з НААДФ призводить до повного розпряження мітохондрій лімфоми протягом чи після синтезу АТФ як за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, так і сукцинату. Мітохондрії лімфоми НК/Лу і мітохондрії печінки можуть бути використані як чутливі мішені для вивчення впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси у пухлинних і нормальних клітинах.

Ключові слова: мітохондрії, дихання, окисне фосфорилування, НК/Лу, доксорубіцин, ландоміцин, бафіломіцин, НААДФ

## АННОТАЦІЯ

**Гренюх В.П. Особенности биоэнергетических процессов в митохондриях клеток лимфомы Немет-Келнера. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Львов, 2016.

Диссертация посвящена особенностям биоэнергетических процессов в митохондриях клеток лимфомы Немет-Келнера и использованию этих органелл как мишеней действия противоопухолевых препаратов. Впервые выделены функционально активные митохондрии лимфомы НК/Лу с сопряженным дыханием и окислительным фосфорилированием, скорость дыхания, интенсивность и сопряженность процессов окислительного фосфорилирования которых существенно ниже, чем в митохондриях печени. Доксорубицин замедляет скорость дыхания в митохондриях лимфомы мыши на 43,8%, но не влияет на процессы сопряжения дыхания и окислительного фосфорилирования. Les 3506 снижает скорость поглощения кислорода на 36,1% в третьем метаболическом состоянии за Чансом и скорость фосфорилирования на 40,7%. Ландомицин А снижает скорость дыхания в метаболическом состоянии 3 в митохондриях печени и лимфомы и скорость окислительного фосфорилирования в митохондриях печени за окисления НАД-

зависимого субстрата  $\alpha$ -кетоглутарата. Бафиломицин и НААДФ приводят к снижению скорости в третьем метаболическом состоянии на 49,1% (бафиломицин) и 67,1% (НААДФ) в митохондриях лимфомы без существенного влияния на митохондрии печени. Бафиломицин вместе с НААДФ приводит к полному разобщению митохондрий лимфомы во время или после синтеза АТФ как за окисления  $\alpha$ -кетоглутарата, так и сукцината. Митохондрии лимфомы NK/Ly и митохондрии печени могут быть использованы в качестве чувствительных мишени для изучения влияния противоопухолевых препаратов на энергетические процессы в опухолевых и нормальных клетках.

Ключевые слова: митохондрии, дыхание, окислительное фосфорилирование, NK/Ly, доxorубицин, ландомицин, бафиломицин, НААДФ

## SUMMARY

**Hreniukh V.P. Peculiarities of bioenergetic processes in mitochondria of Nemeth-Kelner lymphoma cells. - Manuscript.**

Thesis for PhD degree in Biology, specialty 03.00.13 – Human and Animal Physiology. – Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, 2016.

The peculiarities of bioenergetic processes in mitochondria of Nemeth-Kelner lymphoma cells (NK/Ly) have been investigated using polarographic method. For the first time the functionally active mitochondria of NK/Ly with coupled respiration and ATP synthesis were isolated. Oxygen uptake and rate of ADP oxidative phosphorylation in lymphoma mitochondria are clearly lower compared to equal parameters in both mouse and rat liver mitochondria.

Mitochondrial suspension isolated from lymphoma and hepatic cells have been proposed to use as a target of anticancer drugs in tumor and normal cells. The well-known anti-tumor drug doxorubicin decreases the rate of respiration in the mitochondria of mouse lymphoma by 43.8%, but does not affect the coupling processes of respiration and oxidative phosphorylation. Newly developed drug Les 3506 show reducing effect on normal liver mitochondria decreasing both the rate of oxygen uptake by 36.1% in the State 3 (according to B. Chance) and rate of phosphorylation by 40.7%.

To compare effects of anti-tumor drug on both lymphoma and liver mitochondria an antibiotic landomycine A has been used. This treatment reduces metabolic rate of respiration in State 3 in liver and lymphoma mitochondria and rate of oxidative phosphorylation in liver mitochondria when NAD-dependent substrate  $\alpha$ -ketoglutarate is used.

Bafilomicyne and NAADP lead to a decrease in metabolic rate in State 3 by 49.1% (bafilomicyne) and by 67.1% (NAADP) in lymphoma mitochondria without significant affect on liver mitochondria. Bafilomicyne with NAADP leads to complete uncoupling lymphoma mitochondria after (during) the synthesis of ATP in oxidation of  $\alpha$ -ketoglutarate and succinate. Using the experimental lymphoma NK/Ly model it has been shown that polarography of isolated mitochondria can be used as a effective tool for study both peculiarities of tumor cellular metabolism and sensitivity of tumor energetic processes to the anticancer drugs.

Key words: mitochondria, respiration, oxidative phosphorylation, NK/Ly, doxorubicin, landomycin, bafilomicyne, NAADP.