

Міністерство освіти і науки України  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені ІВАНА ФРАНКА

на правах рукопису

**Гренюх Володимир Петрович**

УДК 612:57.053:577.121.4:576.311.347

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

03.00.13 – Фізіологія людини і тварин

Дисертація

на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Науковий керівник:

докт. біол. наук, ст. наук. сп.

Бабський А. М.

Львів – 2016

ЗМІСТ .....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	10
1.1. Лімфоми, їхні класифікації та метаболізм.....	10
1.2. Особливості мітохондрій у пухлинних клітинах.....	11
1.3. Цикл Кребса.....	20
1.4. Дихальний ланцюг мітохондрій.....	22
1.5. Мітохондрії як мішені для дії протипухлинних препаратів.....	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	30
2.1. Прививання та підтримування експериментальної лімфоми NK/Ly у мишей.....	30
2.2. Виділення мітохондрій з печінки щурів і мишей.....	31
2.3. Виділення мітохондрій з лімфоми NK/Ly.....	32
2.4. Полярографічні дослідження дихання і окисного фосфорилування мітохондрій.....	33
2.5. Визначення максимальної окисної здатності клітин NK/Ly.....	36
2.6. Трансмісійна електронна мікроскопія.....	37
2.7. Визначення АТФ-азної активності.....	38
2.8. Обробка первинних полярографічних даних.....	39
2.9. Статистичний аналіз результатів.....	41
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	42
3.1. Визначення максимальної окисної здатності клітин NK/Ly.....	43
3.2. Особливості виділення та морфологічний аналіз мітохондрій лімфоми.....	52
3.3. Порівняння особливостей дихання та окисного фосфорилування мітохондрій та клітин лімфоми NK/Ly, мітохондрій печінки миші і печінки щура..	56
3.4. Вплив доксорубіцину на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly.....	65

3.5. Ефект Les 3506 на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура.....	70
3.6. Вплив ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly і печінки щура.....	75
3.7. Дія бафіломіцину А1 та НААДФ на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly і печінки щура та АТФазну активність у постмітохондріальній фракції.....	84
4. УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	98
ВИСНОВКИ.....	103
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	105

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Dox – доксорубіцин

HIF-1 – фактор, індукований гіпоксією

LA – ландоміцин А

MPT – проникна пора мітохондрії

NK/Ly – мишача лімфома Немет-Келнера

АФО – активні форми Оксигену

АЦЛ – АТФ-цитратліаза

ДЛ – дихальний ланцюг

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

КГ –  $\alpha$ -кетоглутарат

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

НААДФ - нікотинацидаденіндинуклеотид фосфат

НФ – частка неврахованих факторів за дисперсійного аналізу даних

ПДГ – піруватдегідрогеназа

ПДК1 – кіназа піруватдегідрогенази 1

СКЦ – сукцинат

ФНП – фактор некрозу пухлин

ЦХО - цитохромоксидаза

## ВСТУП

### 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 [204], 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 [93]. 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 [22, 106, 170], 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 [149]. Можливо, пермеабілізація внутрішньої мембрани

мітохондрій може бути визначальним фактором для вибору між апоптозом і некрозом [187]. 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 [93]. 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 окремих 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.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Лімфоми, їхні класифікації та метаболізм

Лімфома – це словесне позначення пухлинних новоутворень, які розвиваються із лімфатичних клітин [195, 197]. Існуючі десятки підтипів лімфом [33] групують у дві категорії - лімфома Ходжкіна і неходжкінська лімфома [103]. Близько 90% лімфом є неходжкінськими. За даними National Cancer Institute в США для всіх підтипів лімфоми Ходжкіна 5-річний термін виживання становить 85% в той час як для неходжкінської лімфоми - 70%. Станом на 2012 рік, лімфому виявлено у 566000 чоловік, з яких померло 305000. Лімфоми становлять 3-4% всіх випадків раку, що робить їх сьомою за поширеністю формою, та третьою за поширеністю формою у дітей [26, 144, 145].

**Неходжкінські лімфоми.** Лімфома Немет-Келнера, яку досліджували у нашій роботі, належить до підтипу неходжкінських лімфом. Патофізіологія неходжкінської лімфоми включає гетерогенну групу пухлин, 85-90% яких виникає через лімфоцити; решта виникають з Т-лімфоцитів або НК-лімфоцитів. Це різноманітна група злоякісних пухлин, як правило, розвивається в лімфатичних вузлах, та може організуватися практично в будь-якій тканині, варіюючи від неактивної фолікулярної лімфоми, до більш агресивних злоякісних форм В-клітинної лімфоми і лімфоми Беркітта. Під час нормального розвитку В-клітини виникають у центральних лімфоїдних тканинах (кістковий мозок і тимус). Під час їхнього дозрівання відбувається рекомбінація генів, яка призводить до утворення важкого та легкого ланцюгів імуноглобуліну і можливих розривів у дволанцюговій ДНК [29, 105, 128]. Такі зміни, як правило, призводять до активації протоонкогену. Після того, як В-лімфоцити дозріли, вони мігрують в інші тканини (кров, селезінка, лімфатичні вузли і пов'язані з ними слизові оболонки). Нормальна активація В-клітин відбувається в гермінальному центрі лімфатичних вузлів, коли антиген у поєднанні з сигналами від Т-лімфоцитів активує зрілі В-клітини. Гермінальний центр вважається джерелом багатьох типів лімфоми, у тому числі дифузної великоклітинної В-клітинної лімфоми, фолікулярної лімфоми і лімфоми Беркітта [29, 128, 210].

Під час дозрівання клітин у гермінальному зародковому центрі ДНК клітини піддаються різним модифікаціям. У випадку рекомбінації імуноглобулін важкого ланцюга може змінювати свій тип від IgM до IgG, IgA або IgE. У випадку соматичної гіпермутації мутує легкий ланцюг IgV, змінюючи таким чином, спорідненість популяції В-клітин до конкретного антигену [128]. Ці нормальні генетичні модифікації є механізмом, за якого пошкодження ДНК може призвести до розвитку лімфоми, а також зумовлює виникнення підтипів неходжкінських лімфом з і без мутацій IgV.

Неходжкінські лімфоми без мутацій походять з прегермінальних центрів та інших пухлин, що виникають з В-клітин без соматичних гіпермутацій. Неходжкінські лімфоми з мутаціями IgV, що виникають із зародкових центрів або постгермінальних центрів В-клітин, включають лімфому Беркітта, фолікулярну лімфому, лімфомаплазматичну лімфому, мукозо-асоційовану лімфому, і велику В-клітинну лімфому [122]. Біологія розвитку периферичної Т-клітинної лімфоми менш зрозуміла, і більшість її підтипів не є пов'язані з певними генетичними чи біологічними змінами. На відміну від В-клітинних лімфом, повторювані транслокації, які активують специфічні онкогени, є непоширеними в Т-клітинних лімфомах.

Штам мишачої лімфоми було отримано в Будапештському національному інституті онкології в 1960 р. Л. Неметом і Б. Келнером способом перевивки від лінії мишей C<sub>3</sub>H зі спонтанним лімфолейкозом [147]. На сьогодні лімфома NK/Ly вважається підштамом пухлини Ерліха та є зручною експериментальною моделлю злоякісної пухлини для дослідження особливостей метаболізму ракових клітинах ссавців, з огляду на швидкий ріст і виникненням інтоксикації лише на термінальній стадії розвитку пухлини.

## **1.2. Особливості функціонування мітохондрій у пухлинних клітинах**

У 1926 році Отто Варбург повідомив, що ракові клітини виробляють більшу частину свого АТФ за допомогою гліколізу навіть в аеробних умовах [207]. Цей висновок суперечив ефекту Пастера, названому в честь Луї Пастера, який виявив, що в більшості клітин ссавців швидкість гліколізу значно знижується у присутності кисню. Встановлено, що ефект Варбурга характерний для більшості ракових клітин. Також

виявлено, що багато ліній ракових клітин використовують гліколіз для виробництва АТФ, і, як правило, гліколітичні пухлини є і найбільш агресивними. О. Варбург спочатку передбачав, що аеробний гліколіз є універсальною властивістю злоякісних клітин через дефекти мітохондріального метаболізму [206]. Дійсно, в деяких форм раку виявлено порушення активності каталітичної субодиниці мітохондріальної АТФ-синтази ( $\beta$ -F1-АТФази) [102]. Рівень експресії білка  $\beta$ -F1-АТФази корелює зі швидкістю аеробного гліколізу. Зв'язок між мітохондріальною дисфункцією і посиленням активності гліколізу також продемонстрований на моделі *in vitro*, коли інгібування окисного фосфорилування олігоміцином в клітинах карциноми легенів викликало швидке зростання аеробного гліколізу. Це спостереження свідчить, що клітини можуть стати гліколітичними в результаті супресії мітохондрійного виробництва енергії [130]. Однак інші дослідження показали, що мітохондрії пухлин інтенсивно поглинають кисень і використовують енергію окисно-відновних реакцій для ресинтезу АТФ, виявляючи високі значення АДФ/О і дихального контролю, та фізіологічно нормальну здатність окиснення субстратів [24, 64]. Енергетична цінність анаеробного гліколізу є в 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 ракової клітини, у якій проходять інтенсивні та енергозатратні синтетичні процеси. Педерсен та ін. встановили, що в деяких пухлинах споживання кисню навіть вище, ніж в нормальній тканині. Відповідно до цього, комплексне дослідження мітохондріальної функції повільно ростучої гепатоми не показало майже жодних відмінностей дихальних параметрів у порівнянні з мітохондріями здорової печінки [158]. Таким чином, мітохондрійна дисфункція дійсно спостерігається в пухлинах, особливо в більш агресивних і швидкорослих формах. Проте виникає питання, чи гіпоксичні умови викликають руйнівні процеси в мітохондріях, чи вони залишаються функціонально активними після нормалізації кисневого рівня [218].

На даний час, ефект Варбурга, як правило, пояснюється змінами сигнальних шляхів, які регулюють засвоєння та використання глюкози, і беруть участь в регуляції

активності мітохондрій, однак окремі агресивні пухлини характеризуються виродженням мітохондрій. Тим не менш, незалежно від пошкодження мітохондрій, більшість клітинних новоутворень демонструють високі темпи аеробного чи анаеробного метаболізму. Мітохондрійні функції у метаболізмі клітин не обмежується генерацією АТФ для потреб клітин - вони також генерують активні форми Оксигену (АФО), які зазвичай беруть участь у регуляції багатьох фізіологічних процесів, але можуть бути шкідливими при надмірному утворенні. Наприклад, АФО беруть участь у регуляції шляхів клітинної загибелі через апоптоз чи некроз. Передача сигналів клітинної смерті стала другою найважливішою функцією мітохондрій, і стійкість пухлинних клітин до апоптозу часто пов'язана саме з дефектами мітохондрій. Таким чином, характеристика мітохондрійних змін в новоутвореннях є важливою для розвитку більш ефективної хіміотерапії.

**Індукований гіпоксією фактор (HIF) і активність функціонування мітохондрій.** Швидка проліферація є одною з основних характеристик ракових клітин. Це призводить до гіпоксії в пухлинах через нездатність судинної системи забезпечити достатнє насичення киснем. Таким чином, пухлинні клітини повинні пристосовуватися до цих несприятливих умов доти, доки не утворяться нові кровоносні судини, і не нормалізується напруженість кисню  $pO_2$ . Ішемічні стани, як правило, смертельні для доброякісних клітин через опосередковану гіпоксією p53-залежну загибель клітин. Тим не менш, клітини можуть виживати в умовах гіпоксії через мутації p53, або його низьку експресію [143]. Через нездатність мітохондрій забезпечити достатню кількість АТФ для виживання клітин в умовах гіпоксії, клітини активують гліколітичний шлях. Це відбувається за допомогою гетеродимеру HIF-1 [143], що складається з HIF-1a і HIF-1b субодиниць. Після гідроксилування, білок HIF-1a зв'язується з білком-супресором раку Гіппеля-Ліндау - компонентом розпізнавання E3 убіквітин-білкових лігаз, і потім швидко руйнується протеасомою. В умовах низької напруженості кисню (гіпоксії, ішемії), гідроксилування пригнічується, що викликає стабілізацію HIF-1a і його накопичення в ядрі, де він утворює комплекс з експресованим HIF-1b [96, 180, 182, 183]. HIF-1 індукує гени, які контролюють найважливіші риси біології раку, в тому числі ангиогенез, метаболізм глюкози, клітинну проліферацію та інвазію. Зокрема,

HIF-1 стимулює такі важливі етапи гліколізу як перенесення глюкози і гексокінази у клітину, що каталізує першу реакцію гліколізу - фосфорилування глюкози. В деяких пухлинах високий рівень HIF-1 спостерігається в насиченому киснем середовищі, вказуючи, що є й інші чинники, крім гіпоксії, що можуть призвести до стабілізації HIF-1 [82].

HIF-1 може також функціонувати як перемикач між гліколізом і окисним фосфорилуванням. Є кілька можливих механізмів для такого регулювання. Режим клітинного споживання АТФ залежить від кількості кінцевого продукту гліколізу - пірувату. Він, у свою чергу, залежить від відносної активності двох ферментів, піруватдегідрогенази (ПДГ) і лактатдегідрогенази (ЛДГ). Активність ПДГ знаходиться під контролем кінази піруватдегідрогенази 1 (ПДК1), ензиму, який фосфорилує та інактивує ПДГ. HIF-1 індукує ПДК1 і тим самим інактивує ПДГ, в результаті інгібуючи цикл Кребса і дихання мітохондрій [111, 156]. За цих умов піруват перетворюється в лактат, використовуючи цитозольний НАДН і полегшуючи подальший перебіг гліколізу. На додаток до інгібування окиснення пірувату в мітохондріях, виявлено, що HIF-1 стимулює експресію гена ЛДГ-А [180]. ЛДГ є тетрамерним ферментом з п'ятьма ізозимами, що утворюються з двох субодиниць, ЛДГ-А і ЛДГ-Б. Субодиниця ЛДГ-А перетворює піруват в лактат за анаеробних умов в клітинах. Інший ізозим, ЛДГ-Б, кінетично сприяє перетворенню лактату в піруват і має високий рівень експресування в аеробних тканинах, таких як серце. Разом ці фактори пригнічують постачання ацетил-КоА в цикл Кребса і мітохондріальне дихання в пухлинах. Пригнічення окиснення пірувату за участі HIF-1, своєю чергою, служить механізмом, який захищає клітини від виробництва токсичного АФО. В HIF-1-дефектних мишачих ембріональних фібробластах рівень АФО різко збільшувався, що призводило до загибелі клітин. [181]. Тобто стимуляція мітохондрійного шляху виробництва енергії може бути ефективним протипухлинним прийомом. Інший можливий спосіб, за допомогою якого HIF-1 може модулювати функціонування мітохондрій в пухлинах, і зокрема, діяльність дихальної ланцюга мітохондрій, є його участь у регуляції цитохромоксидази (ЦХО). ЦХО розташована у внутрішній мембрані мітохондрій. Клітини ссавців переважно експресують ізоформу ЦХО 4-1.

Альтернативна ізоформа ЦХО 4-2 також експресується, але тільки в деяких тканинах. У тканинах людини і щура було виявлено високий рівень експресії ЦХО 4-2 у легенях дорослих, і нижчу експресію у всіх інших досліджуваних тканин, у тому числі легенях плоду [99]. В умовах гіпоксії, рівень експресії субодиниці ЦХО 4-2 збільшується, оптимізуючи активність ензиму, в той час як субодиниця ЦХО 4-1, яка відповідає за активність ЦХО в аеробних умовах, пригнічується [71]. Деградація ЦХО4-1 відбувається через активацію мітохондріальної протеази. Можливо, перемикання між субодиницями забезпечує механізм для підтримки ефективності дихання в умовах зниженого кисню і може бути залучене в адаптивну відповідь на гіпоксію. Сигнал для стимуляції гліколізу через індукцію HIF-1 може передатись також від мітохондрій. Таким чином, коли мітохондрійна активність пухлинних клітин пригнічується через гіпоксію або дефект комплексів дихального ланцюга, накопичення субстратів циклу Кребса, таких як фумарат і сукцинат, може слугувати сигналом для підсилення гліколізу [2].

**Наслідки гліколітичного «перемикання» в пухлинах.** Основною причиною гліколітичного зсуву в ракових клітинах вважається гіпоксія [74, 76, 129]. Проте більшість пухлинних клітин надають перевагу гліколізу і після відновлення подачі кисню. Кількість глюкози, що поглинається раковими клітинами, перевищує їхні біоенергетичні потреби. Було запропоновано, що надмірний гліколіз в пухлинах є потрібний для підтримки постійного росту клітин [200]. Таким чином, кінцевий продукт гліколізу, піруват, спрямовується на синтез мембранних ліпідів. Ключовим ферментом, що зв'язує метаболізм глюкози та синтез ліпідів, є АТФ-цитратліаза (АЦЛ), яка каталізує перетворення цитрату в ацетил-КоА в цитозолі. Інгібування АЦЛ може пригнічувати виживання пухлинних клітин і проліферацію *in vitro*, а також може зменшити зростання пухлини *in vivo* та індукувати диференціювання клітин [87]. Крім того, перехід до гліколізу і виробництва лактату створює кисле середовище, яка дає пухлинним клітинам конкурентну перевагу для вторгнення в оточуючу їх тканину [73]. Ще одним важливим наслідком гліколітичного зсуву в пухлинних клітинах є їхня надбана стійкість до апоптозу. Апоптоз є еволюційно консервативним і генетично регульованим процесом, що має вирішальне значення для ембріонального розвитку і

підтримки тканинного гомеостазу в дорослому організмі. Апоптоз може бути залучений до спонтанної регресії, однієї з унікальних особливостей пухлин, у той час як дефекти апоптозу можуть сприяти прогресії пухлини. Під час апоптозу цитохром c вивільняється з міжклітинного простору мітохондрій, зупиняючи роботу дихального ланцюга і залишаючи пори у мембрані. Таким чином, пермеабілізація зовнішньої мітохондрійної мембрани вважається ключовою для процесу апоптозу [48, 77].

**Стимуляція загибелі клітин раку за допомогою втручання в шляхи генерації АТФ. Пригнічення гліколізу.** Підвищена залежність ракових клітин від гліколізу може бути причиною для розроблення таких терапевтичних стратегій, за яких вибірково знищуються ракові клітини способом інгібування гліколізу. Ця стратегія може бути найбільш корисною в клітинах з дефектами мітохондрій, або в умовах гіпоксії, коли гліколіз є переважаючим джерелом АТФ. За таких обставин можна очікувати, що інгібування гліколізу серйозно зменшить рівень клітинного АТФ [159,160]. Дійсно, в різних ракових клітинах було виявлено, що інгібування гліколізу призводить до помітного виснаження рівня АТФ, особливо в клонів з дефектами мітохондрійного дихання [216]. Додавання 2-дезоксиглюкози (аналога глюкози, що не метаболізується), до гістіоцитарних клітин лімфоми людини мало ефект, аналогічний зменшенню позаклітинної концентрації глюкози. Комбіноване лікування з фактором некрозу пухлин (ФНП-альфа) і 2-дезоксиглюкозою призвели до апоптозу. Аналіз швидкостей проліферації та життєздатності показав, що 2-дезоксиглюкоза помітно посилила цитотоксичність цитокіну ФНП-альфа [84]. Позбавлення глюкози також сприяло рецептор-опосередкованому апоптозу в пухлинних клітинах людини. Зниження внутрішньоклітинного рівня АТФ 2-дезоксиглюкозою чи в поєднанні її з безглюкозним середовищем, потенціює Fas-індукований вплив фосфатидилсерину. Аналог лактату, 3-бромопіруват (3-BrPA) селективно знищує гепатоклітинну карциному *in vitro*, залишаючи нормальні гепатоцити неушкодженими. Крім того, постійне надходження 3-BrPA пригнічує функціонування метастазованої пухлини легень без видимих пошкоджень інших органів. [75]. Аналіз клітинних мішеней за дії 3-BrPA виявив, що ця сполука істотно (на 80%) пригнічує гліколітичний потенціал, блокуючи активність гексокінази і пригнічує дихання ізольованих мітохондрій [113].



Тобто, загибель клітин пов'язана з різким зниженням рівня АТФ. На додаток до виснаження АТФ в ракових клітинах, 3-BrPA стимулює вироблення АФО і викликає порушення мітохондріальної регуляції, що сприяє загибелі клітин [110]. Інгібування гліколізу може помітно збільшити чутливість пухлини до загальних протиракових агентів. Інгібування переносників глюкози теж може бути використане в протипухлинній терапії. Флоретин, інгібітор транспорту глюкози, помітно покращував протиракову дію даунорубіцину [46]. Поєднання інгібіторів гліколізу і звичайних хіміотерапевтичних препаратів може забезпечити корисну терапевтичну стратегію для подолання резистентності гіпоксичних пухлинних клітин. Можна припустити, що коли пригнічується гліколітичний шлях, життєздатність пухлинної клітини буде значним чином залежати від того, наскільки мітохондрійне окисне фосфорилування забезпечить рівень АТФ.

**Зсув метаболізму від гліколізу до окиснення глюкози.** Можливий зсув генерації АТФ від гліколізу до окисного фосфорилування може зробити пухлинні клітини чутливими до протипухлинних препаратів і сприяти загибелі клітин. Одним із таких способів є перенаправлення пірувату до його подальшого перетворення в мітохондріях. Інгібування ПДК1, а відтак активація ПДГ дихлорацетатом призводить до зміщення метаболізму від гліколізу до повного окиснення глюкози. Лікування з дихлорацетатом збільшує мітохондрійне виробництво АФО, у всіх ракових клітинах, але не в нормальних клітинах [140]. Крім того, в клітинних лініях з апоптичною відповіддю, дихлорацетат стимулює експресію PUMA, що свідчить про причетність до p53-PUMA-опосередкованого механізму [214]. Дихлорацетат ефективно сенсibiliзує клітини раку простати до радіації, модулюючи експресію ключових членів родини Bcl-2 [46]. Аналогічний ефект був досягнутий методом інгібування ЛДГ і перенаправлення пірувату в мітохондрії. Коли формування лактату з пірувату в злоякісних клітинах була пригнічена порушенням функції ЛДГ-А, здатність цих пухлинних клітин до проліферації в умовах гіпоксії була помітно знижена. Пригнічення активності ЛДГ-А призвело до стимуляції мітохондріального дихання та ресинтезу АТФ. Здатність до проліферації була відновлена методом комплементации з білком людини ЛДГ-А. Інгібування сукцинатдегідрогенази, або стимуляції ПДГ через придушення ПДК1,

може мати інгібуючий ефект в пухлинах із змінами мітохондрійної біоенергетики. Тим не менш, в ракових клітинах з функціонально активними мітохондріями цього може бути недостатньо, оскільки мітохондрії компенсували б інгібування гліколізу. За таких обставин може бути необхідне додаткове пригнічення активності мітохондрій, щоб знищити ракові клітини. Наприклад, нетоксичні дози апоптолідину, інгібітора мітохондріальної АТФ-синтази, індукували загибель клітин в злоякісних клітинних лініях при застосуванні разом з оксаматом, інгібітором ЛДГ [173]. Аналогічні результати були отримані, коли замість оксамату використовували 2-дезоксиглюкозу для інгібування гліколізу. Тобто, для підвищення ефективності ліквідації злоякісних клітин можуть знадобитися комбіновані стратегії, за участю модуляції гліколітичних і мітохондріальних шляхів.

**Зміна функцій мітохондрій.** Як вказувалося вище, опірність ракових клітин до лікування часто пов'язана з дисфункцією апоптозу. Успішна елімінація пухлинних клітин значним чином залежить від можливості протиракових препаратів активувати «сплячі» шляху апоптозу. Мітохондрії є перспективними кандидатами для такого підходу, і ця гіпотеза була підтримана численними дослідженнями. Модуляція функції мітохондрій агентами, які пригнічують дихання мітохондрій, або розпрямлюють окисне фосфорилування, викликає загибель клітин. Таким чином, інгібітори мітохондрійного дихального ланцюга (ротенон чи антимицин А) та інгібітор мітохондріальної АТФ-синтази (олігоміцин) індукують апоптоз в культивованих людських лімфобластоїдних клітинах та інших клітинах ссавців [188]. Зниження активності мітохондрійного дихального ланцюга також підвищує чутливість клітини до загальних апоптичних стимулів. Наприклад, в HeLa клітинах, оброблених інгібіторами дихального ланцюга, апоптоз спричиняли такі концентрації Fas, які не індукували апоптоз в контрольних клітинах [30]. Важливість мітохондрій в якості мішеней для протиракового лікування також описані в експериментах з транс-ретиноєвою кислотою (АТРА, або ретиноїн) природнім похідним вітаміну А, яка успішно використовується в лікуванні гострого промієлоцитарного лейкозу [178]. Ретиноїн змінює мітохондріальні функції у мієлоїдній лінії клітин P39 задовго до того, як були виявлені ознаки апоптозу. АТРА також сповільнює дихання мітохондрій, знижує мембранний потенціал і викликає

відкриття проникної пори мітохондрії (МТР). Ретиноїн-індукована мітохондріальна дисфункція і активація каспаз були інгібовані ніфедипіном, блокатором кальцієвих каналів. Загибель клітин, що індукується інгібіторами мітохондрійного дихального ланцюга, часто є опосередкована АФО. Наприклад, бензил ізотіоціанат впливає на дихальний ланцюг, і викликає АФО-залежний апоптоз в ракових клітинах молочної залози людини [215]. Продукція АФО і апоптоз гальмувалися надекспресією каталази і Cu,Zn-супероксиддисмутази, а також інгібуванням дихального ланцюга. Аналогічно, клітини, позбавлені мітохондрійної ДНК, були стійкі до бензил ізотіоціанат-опосередкованої продукції АФО і апоптозу. У 1982 році Прасад і Едвардс-Прасад повідомили, що  $\alpha$ -токоферол сукцинат ( $\alpha$ -ТОС), аналог вітаміну Е, індукував морфологічні зміни та інгібування росту в клітинах меланоми миші в культурі [163].  $\alpha$ -ТОС дозозалежно інгібував проліферацію пташиних ретикулоендотеліоз лімфобластоїдних клітин, трансформованих вірусом, блокував клітини в G2/M фазах клітинного циклу та індукував апоптоз [166]. Також  $\alpha$ -ТОС дестабілізував мітохондрії, стимулюючи вироблення АФО і вбивав злякисні клітини за концентрацій, нетоксичних для нормальних клітин і тканин [150]; він також взаємодіяв з сайтом зв'язування CoQ в комплексі II в дихальному ланцюзі мітохондрій, викликаючи витік електронів й утворення супероксидного радикалу [36, 37, 41, 63, 86]. Це полегшувало транслокацію Вах з цитоплазми в мітохондрії з подальшим виходом цитохрому с у цитоплазму [217]. Описані результати роблять  $\alpha$ -ТОС цікавим кандидатом для протиракової терапії.

Потужним інструментом для створення мітохондріальної дестабілізації є оксидативний стрес. Модуляція клітинного окисно-відного балансу фармакологічною стимуляцією продукції АФО та/або виснаження захисних метаболітів (таких як, наприклад, глутатіон і НАДФН) може призвести до оксидативного стресу та індукції апоптозу [66]. За таких обставин, зсув балансу в бік формування АФО може дестабілізувати мітохондрії і полегшити пермеабілізацію зовнішньої мітохондрійної мембрани з виходом цитохрому с та інших протеїнів, що беруть участь в апоптичній загибелі клітин. Протипухлинний ефект низки звичайних процедур (іонізуюче випромінювання, етопозиди, арсенати) базується на їхній

здатності стимулювати утворення АФО. Наприклад, протипухлинна дію одного з таких потужних хіміотерапевтичних агентів як триоксиду арсенію (миш'яку) включає модифікацію тіольних груп у АНТ транспортері аденілових нуклеотидів і в результаті цього, індукції МРТ і вивільнення цитохрому с. Прямий вплив різних сполук миш'яку на пори МРТ теж може індукувати апоптоз [124, 148]. В деяких експериментальних системах, стимулювання активності мітохондрій може бути використане як інструмент проти росту пухлини. Відповідно, надлишкова експресія фратаксину, пов'язаного з атаксією Фрідрейха, стимулювала окисний метаболізм, підвищення потенціалу мітохондрійної мембрани і вміст АТФ в клітинах декількох ліній раку товстої кишки [179]. Це захворювання є спадковим нейродегенеративним синдромом, викликаним зниженням експресії фратаксину, що призводить до порушення синтезу АТФ і смерті через серцеву недостатність [47, 142, 175]. Фратаксин сприяє мітохондрійному окисному метаболізму, найімовірніше методом стимуляції синтезу Fe/S кластерів в мітохондріях. Додатково до стимуляції активності мітохондрій, фратаксин інгібує утворення колоній і значною мірою сповільнює формування пухлини. Отже, залежно від умов, і інгібування, і стимулювання метаболізму мітохондрій може пригнічувати ріст клітин пухлин.

### **1.3. Цикл Кребса**

Цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса, цитратний цикл) – це циклічний біохімічний аеробний процес, під час якого відбувається перетворення низькомолекулярних органічних сполук до  $\text{CO}_2$  та іонів  $\text{H}^+$ . Протони передаються у дихальний ланцюг мітохондрій, де відновлюють кисень до води в процесі синтезу АТФ [21]. Карбонові субстрати циклу переважно є амфіболітами. Вони залучені як до катаболічних (енергетичних), так і до анаболічних (синтетичних) процесів [118, 143]. В еукаріот цикл функціонує в матриксі мітохондрій. Там майже всі ензими циклу знаходяться у вільному стані (крім сукцинатдегідрогенази, яка локалізована на внутрішній мембрані) [117].

За повного оберту циклу Кребса двокарбонова ацетильна група, увійшовши у цикл, поєднується з оксалоацетатом. Карбонові атоми вивільняються з циклу у

молекулі  $\text{CO}_2$  за окислення ізоцитрату та  $\alpha$ -кетоглутарату. Енергія, вивільнена у циклі запасється у відновленій формі трьох молекул НАДН, однієї ФАДН<sub>2</sub> і утворенні однієї молекули молекули АТФ чи ГТФ. Наприкінці циклу відбувається регенерація молекули оксалоацетату [16, 17, 21].

Незважаючи на те, що у циклі лимонної кислоти безпосередньо генерується лише одна молекула АТФ за один оборот циклу (при перетворенні сукциніл-КоА до сукцинату), чотири етапи окислення забезпечують потужний потік електронів у дихальний ланцюг через НАДН і ФАДН<sub>2</sub>, що врешті призводить до утворення великої кількості молекул АТФ у процесі окисного фосфорилування у мітохондріях. Загальна схема циклу Кребса наведена на рис. 2.1.

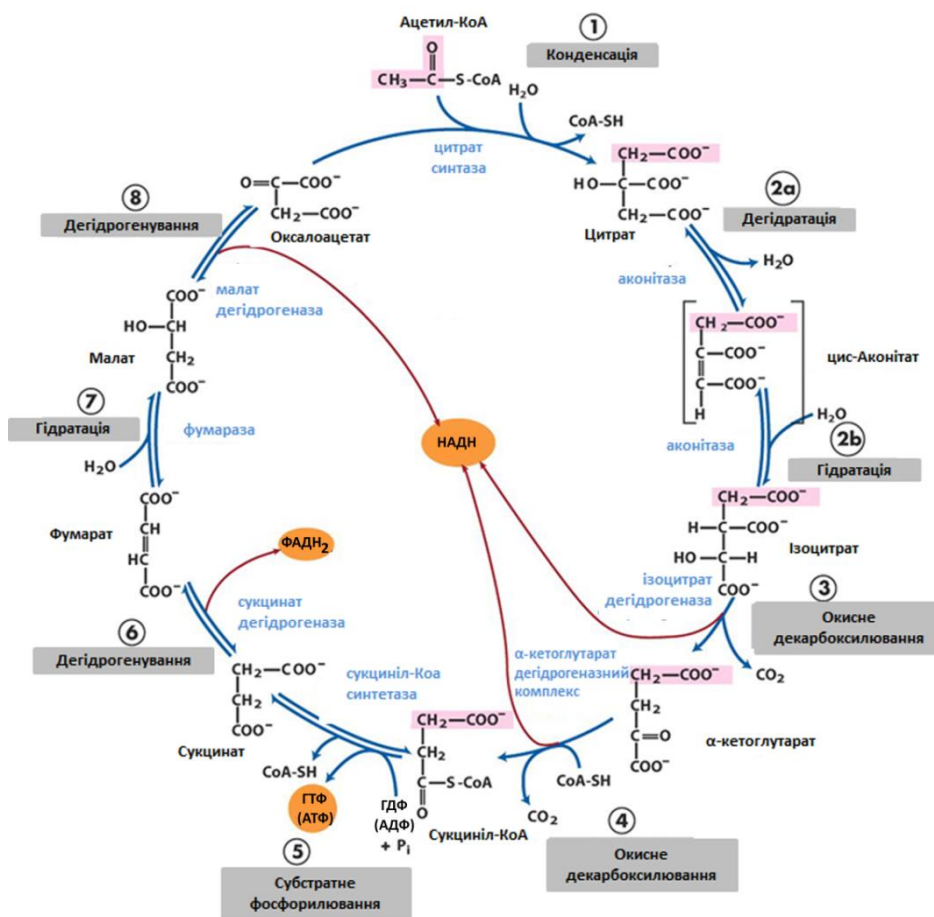


Рис. 2.1. Цикл Кребса [146].

Коли обидві молекули пірувату окислюються до шести молекул  $\text{CO}_2$  за допомогою піруватдегідрогеназного комплексу і циклу лимонної кислоти, а електрони переносяться на  $\text{O}_2$ , що супроводжується окисним фосфорилуванням, то не менш як 32 молекули АТФ утворюються при окисненні молекули глюкози. Збереження енергії

у циклі складає  $32 \times 30,5 \text{ кДж/моль} = 976 \text{ кДж/моль}$ , чи 34% від теоретичного максимуму повного окислення молекули глюкози, який складає близько 2840 кДж/Моль. Для цих обчислень використовується значення зміни стандартної вільної енергії, коли ж вноситься поправка для дійсного значення вільної енергії, необхідної для утворення АТФ у клітині, обчислювана величина ефективності процесу є близькою до 65%.

Роль циклу Кребса не обмежується лише окисненням ацетату. Цей шлях є колектором (центром сходження) для всього проміжного метаболізму. Чотири- і п'яти-карбогенні кінцеві продукти багатьох катаболічних процесів підживлюють цикл і виконують функцію "пального". Наприклад, оксалоацетат і  $\alpha$ -кетоглутарат утворюються за розщеплення білків з аспартату і глутамату, відповідно. За певних метаболічних умов, інтермедіати вивільняються з циклу і слугують речовинами-попередниками для різноманітних біосинтетичних шляхів.

У нашій роботі було використано різні інтермедіати циклу Кребса як енергетичні субстрати для мітохондрій: НАД-залежний субстрат  $\alpha$ -кетоглутарат і ФАД-залежний субстрат сукцинат, а для клітин лімфоми ще й піруват, глюкозу та амінокислоту глутамін.

#### **1.4. Дихальний ланцюг мітохондрій**

Дихальний ланцюг (ДЛ) – система структурно і функціонально зв'язаних трансмембранних білків і транспортерів електронів (рис. 2.3). ДЛ перетворює енергію, що виділяється при окисленні НАДН та  $\text{ФАДН}_2$  молекулярним киснем (при аеробному диханні), чи іншими окисниками (при анаеробному) в енергію трансмембранного протонного потенціалу. Перенесення електронів по ланцюгу, спряжене з виносом протонів на зовнішній бік внутрішньої мембрани мітохондрій. В еукаріот компоненти ДЛ локалізовані переважно у внутрішній мембрані мітохондрій (за винятком цитохрому c). Переносники розташовані у порядку підвищення редокс-потенціалу. Енергія, що виражається цим потенціалом перетворюється АТФ-синтазою в енергію АТФ. Сумісна робота ДЛ і АТФ-синтази отримала назву окисного фосфорилування [4, 13].

ДЛ складається з чотирьох комплексів, а саме:

1. Комплекс I (НАДН-дегідрогеназа) - окислює НАДН, забираючи два електрони і переносячи їх на розчинний у ліпідах убіхінон, що всередині мембрани дифундує до III комплексу. Одночасно комплекс I перекачує чотири протони з матриксу в міжмембранний простір мітохондрії. Комплекс містить ротенончутливу НАДН-убіхінон-оксидоредуктазу, флавін і більше 20 атомів Феруму. До НАД-залежних субстратів, які передають свої електрони на комплекс I належать піруват, цитрат,  $\alpha$ -кетоглутарат, малат, глутамат та ін.

2. Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа) не бере участі в перенесенні протонів, але забезпечує вхід у ланцюг додаткових електронів від ФАД-залежних субстратів (наприклад, сукцинату). Цей комплекс інгібується малонатом і оксалоацетатом, а активується АТФ, АДФ і НАДН.

3. Комплекс III (цитохром  $bc_1$ ) переносить два електрони з убіхінону на два водорозчинних цитохроми с. До складу комплексу входять цитохроми  $b_{560}$  і  $b_{566}$ , цитохром  $c_1$ , білок Ріске та атоми  $Fe^{2+}$ , які слугують переносниками електронів). Цей комплекс чутливий до антимицину А [194].

4. Комплекс IV (цитохром-с-оксидаза) каталізує перенесення чотирьох електронів з чотирьох молекул цитохрому с на  $O_2$  і переносить при цьому чотири протони в міжмембранний простір. Комплекс складається з цитохромів  $a$  і  $a_3$ , які крім гема, містять атоми  $Cu^+$  та Оксиген, що надходить в мітохондрії з крові. Оксиген зв'язується з атомом  $Fe^{2+}$  в гемі цитохрому  $a_3$  у формі молекули  $O_2$ . Кожний із атомів Оксигену приєднує по два електрони і два протони, внаслідок чого перетворюється в молекулу води. Комплекс IV блокується ціанідом і азидом [12, 21, 68]

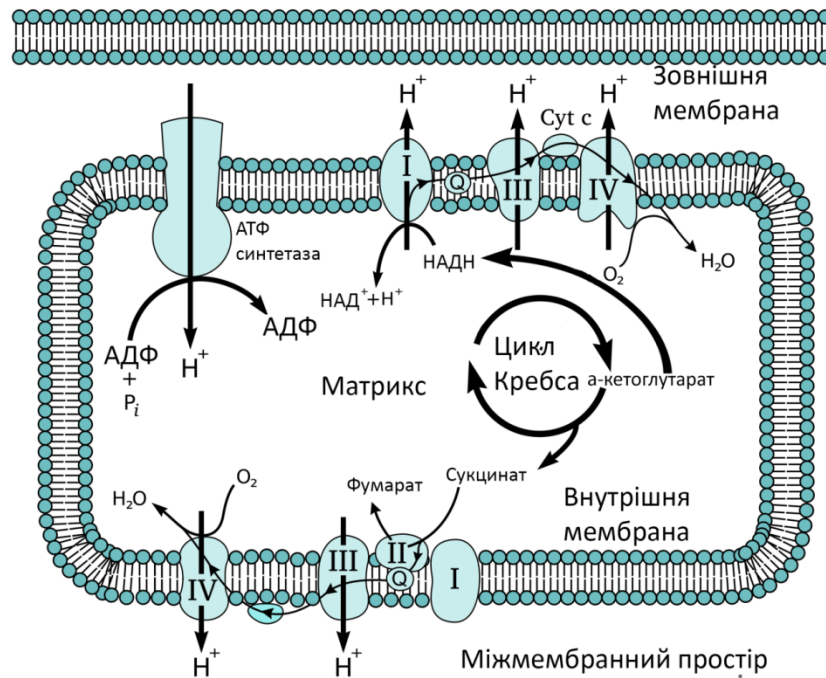


Рис. 2.3. Схеми дихального (електрон-транспортного) ланцюга мітохондрій за окиснення НАД- (угорі) і ФАД-залежних (внизу) субстратів. Інші пояснення в тексті.

Сумарна реакція у дихальному ланцюзі полягає в окисненні НАДН або ФАДН<sub>2</sub> киснем, що призводить до утворення Н<sub>2</sub>О. При цьому вивільняється енергія, достатня для синтезу теоретично трьох молекул АТФ на кожен пар електронів, перенесених від НАДН до кисню.

У 1961 році П. Мітчелл запропонував гіпотезу хеміосмотичного енергетичного sprzęження в дихальному ланцюгу мітохондрій. [12, 18, 19]. Згідно цієї гіпотези I, III і IV комплекси ДЛ працюють так, що перенесення електронів по його компонентах супроводжується перенесенням протонів крізь мембрану. Енергія у формі трансмембранного електрохімічного потенціалу іонів водню ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ) використовується для фосфорилування АДФ. Транспорт електронів у дихальному ланцюгу і синтез АТФ є взаємозалежні. Співвідношення процесів окиснення і фосфорилування найбільш точно характеризується коефіцієнтом АДФ/О, який визначає кількість молекул фосфорильованого АДФ на 1/2 молекули кисню і залежить від місця входження відновних еквівалентів в ланцюг транспорту електронів: через комплекс I чи II. Експериментальні вимірювання значень співвідношення АДФ/О виявили, що воно для НАД-залежних субстратів становить біля 2,5, а для сукцинату – 1,5 [12, 18, 19]



АТФ-синтаза — ензим (КФ 3.6.3.14), що здійснює реакцію синтезу АТФ з АДФ і аніону фосфату завдяки енергії  $\Delta\mu\text{H}^+$ , який формується завдяки градієнту протонів і електричної напруги, яка при цьому виникає. АТФ-синтаза розташована в безпосередній близькості до дихального ланцюга і складається з двох білкових комплексів, що позначаються як  $F_0$  і  $F_1$ . Гідрофобний комплекс  $F_0$  занурений в мембрану. Він служить основою, яка фіксує АТФ-синтазу в мембрані. Комплекс  $F_0$  складається з декількох субодиниць, що утворюють канал, по якому протони переносяться в матрикс.

Комплекс  $F_1$  виступає в мітохондріальний матрикс. Він складається з дев'яти субодиниць ( $3\alpha, 3\beta, \gamma, \epsilon, \delta$ ). Субодиниці  $\alpha$  і  $\beta$  укладені попарно, утворюючи "голівку". На  $\alpha$ - і  $\beta$ -субодиницях розташовуються три активні центри, в яких відбувається власне синтез АТФ. ;  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -,  $\delta$ - субодиниці зв'язують комплекс  $F_1$  з  $F_0$ . Підвищення концентрації протонів в міжмембранному просторі активує АТФ-синтазу. Електрохімічний потенціал  $\Delta\mu\text{H}^+$  примушує протони рухатися по каналу АТФ-синтази в матрикс. Паралельно під дією  $\Delta\mu\text{H}^+$  проходять конформаційні зміни в парах  $\alpha$ ,  $\beta$ -субодиниць білка  $F_1$ , внаслідок чого з АДФ і неорганічного фосфату утворюється АТФ [19]

### **1.5. Мітохондрії як «мішені» для дії протипухлинних препаратів**

Вважається, що перетворення, які можуть призвести до злоякісної трансформації, є досить поширені в клітинах ссавців. Однак такі клітини, як правило, ефективно усуваються способом апоптозу, з допомогою механізмів, закодованих в геномі. Існують два взаємозалежні шляхи апоптозу [21, 90, 107]. Один з них ініціюється через так звані «рецептори смерті» у плазматичній мембрані [60, 83, 119, 120], а інший через вивільнення цитохрому с з мітохондрій [137]. Цитохром с викликає в цитозолі каскад реакцій, що призводить до активації внутрішньоклітинних протеаз [64]. Вирішальну роль у цьому процесі відіграє мітохондрійна пора (МТР) і проапоптичний білок Вах [39, 97]. Ця пора занадто мала для виходу цитохрому с (13 кДа), але її зв'язок з Вах утворює канал для цитохрому с і апоптоз-індукуючого фактора. Асоціації Вах з МТР і його пороутворюючою діяльністю запобігає антиапоптозний білок Bcl-2. Таким чином, баланс між цими двома (та іншими) проапоптозними і антиапоптозними

протеїнами та їхня взаємодія з МТР має вирішальне значення для виживання або апоптозу клітини [136, 161].

З огляду на ключову роль мітохондрій в ініціюванні апоптозу, вони є вразливою мішенню для експериментального та/або фармакологічного втручання. Одним з основних фізіологічних факторів, які регулюють вірогідність відкриття МТР, є іони кальцію. Численні спостереження показали, зростання  $[Ca^{2+}]$  у цитозолі під час апоптозу [139]. Маніпуляція концентрацією іона в інтактних клітинах може бути здійснена за допомогою тапсигаргіна, який є потужним інгібітором  $Ca^{2+}$ -АТФази ендоплазматичного ретикулу (ЕПР) [196], що запобігає накопиченню кальцію в ЕПР [42, 208] Чжу та ін. [218] виявили, що виснаження мітохондрійного  $Ca^{2+}$  стимулює апоптоз, в той час як перевантаження  $Ca^{2+}$  призводить до некрозу кардіоміоцитів і клітин нейробластоми. Іншим апоптозіндукуючим фактором є АФО [51]. АФО відкривають пору мітохондрій і запускають апоптоз. Апоптозна активність, індукована ультрафіолетовим випромінюванням, може бути сповільнена або повністю нівельована глутатіоном [200], який утилізує вільні радикали кисню. Це спостереження вказує на те, що ультрафіолетове випромінювання ініціює апоптоз, діючи безпосередньо на мітохондрії, а не на геномну систему. Іонізуюче випромінювання, яке часто використовують за лікування неоплазій, також стимулює апоптоз [172]. Отже, хімічні і фізичні агенти, які «розряджають» мітохондрійний мембранний потенціал, можна розглядати як про-апоптогенні, а відкриття МТР може бути і результатом, і збудником колапсу клітини.

Встановлено, що велика кількість протипухлинних препаратів індукують апоптоз у злоякісних клітинах [57, 165], в основному завдяки активації шляхів цитохрому с / каспаза-9 [107]. Таким чином впливають етопозид, доксорубіцин, 1- $\alpha$ -D-арабінофуранозилцитозин, лонідамін, бетулінова кислота, арсеній, CD437, і кілька катіонних амфифільних  $\alpha$ -спіральних пептидів [53, 59]. Проапоптотичній дії деяких сполук, наприклад, лонідаміну [168], протидіє циклоспорин А і запобігає надмірній експресії антиапоптотичного білка Bcl-2.

Адріаміцин (доксорубіцин), який досліджували у нашій роботі, є потужним протипухлинним препаратом антрациклінової групи, проапоптотична дія якого добре

досліджена [121]. Його застосування в хіміотерапії, проте, сильно обмежене через серцево-, нефро- і нейротоксичність препарату [186]. Ці токсичні ефекти можуть бути пом'якшені антиоксидантами [55], підтверджуючи тим самим думку [201], що адріаміцин та інші хіноїдні антрацикліни є генераторами вільних радикалів. Подібним чином діє також і ландоміцин А [153].

Біологічна значимість АФО привертає інтерес у зв'язку з їхньою важливою роллю в численних життєвих процесах. Мітохондрії є головним джерелом супероксид радикалів та інших видів реактивного кисню [49, 85]. Основним механізмом, відповідальним за виробництво АФО, є дихальний ланцюг, зокрема, I і III комплекси [45, 167] на внутрішній мембрані, і моноаміноксидаза в зовнішній мембрані мітохондрій. Зазвичай, АФО і їхні продукти розкладаються природними системами захисту, в основному мітохондрійними і цитозольними супероксиддисмутазами, глутатіонпероксидазами і фосфоліпід гідропероксид глутатіонпероксидазами [31, 199]. Тим не менш, в умовах підвищеної генерації АФО, наприклад, при реперфузійній ішемії, дія деяких ксенобіотиків, вплив запалення, старіння, ультрафіолетового або іонізуючого опромінення, чи при порушеній системі антиоксидантного захисту, АФО можуть накопичуватися, шкідливо діючи на клітини і весь організм [45, 167]. Шкідлива дія АФО в основному складається з перекисного окислення ліпідів, зокрема фосфоліпідів біологічних мембран і окисного пошкодження білків і ДНК [45, 126]. Зокрема, старіння людини і тварин пов'язано зі збільшенням мітохондрійного виробництва АФО [127, 141, 167, 174]. Мітохондрії, будучи головним місцем генерації АФО в клітині, можуть призводити до ушкодження свого дихального ланцюга і, як наслідок, подальшого збільшення вироблення АФО. Таке замкнене коло може бути збудником низки вікових дисфункцій мітохондрій, а також одним з механізмів, що спонукають до запрограмованої смерті клітини [127]. Для захисту мітохондрій і клітин проти таких руйнівних наслідків існує низка механізмів, зокрема, одним з них є збільшення вмісту внутрішньоклітинного глутатіону. Це може бути реалізовано способом використання попередників синтезу глутатіону, наприклад, N-ацетилцистеїну, який сам по собі має антиоксидантні властивості [38]. Збільшення у клітинах вмісту КоА методом додавання його попередника пантотенової кислоти,

також підвищує рівень глутатіону [199]. Вміст глутатіону також може бути збільшений способом інкубування клітин з куркуміном, жовтим пігментом індійської суміші спецій каррі [104], або з анальгетиком флюпіртином [161]. Проте механізми цих процесів ще невідомі. Такі способи захисту мітохондрій проти шкідливого впливу АФО, хоча і є дуже ефективними, не є безпосередньо орієнтовані на мітохондрії, оскільки збільшується вміст глутатіону цілої клітини, а не тільки в мітохондріях. Іншими сполуками, що діють як загальні внутрішньоклітинні антиоксиданти є аскорбінова кислота (вітамін С),  $\alpha$ -токоферол (вітамін Е),  $\beta$ -каротин [184], і ліпоєва кислота [151]. Всі ці сполуки є природним чином присутні в клітині, але їхню кількість можна додатково збільшити.

Останнім часом у терапії пухлин значну увагу приділяють таким клітинним “мішеням”, як системи активного транспорту іонів [52, 67, 100, 137, 216]. Зокрема, встановлено, що пригнічення  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -помпи виявляє антиміграційну дію щодо пухлинних клітин молочної залози [135]. У той же час суттєве пригнічення  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ЕПР тапсигаргіном активує проапоптотичні шляхи у ЕПР і мітохондріях. Крім того, було доведено, що бафіломіцин як селективний інгібітор  $\text{H}^+$ -АТФази V-типу суттєво збільшує загибель пухлинних клітин молочної залози. Блокування бафіломіцином  $\text{H}^+$ -помпи здатне зменшувати міграцію та інвазійність пухлинних клітин *in vitro*, що дає підстави припустити пряму роль цієї помпи в розвитку метастазів [81, 193]. Отже, не викликає сумніву, що системи активного транспорту іонів відіграють важливу роль у пошуку протипухлинних засобів. Як відомо, бафіломіцин-чутлива  $\text{H}^+$ -помпа функціонує в мембранах ендо-лізосомальної системи клітин, створюючи трансмембранний протонний градієнт. Він є рушійною силою для роботи транспортування йонів, зокрема кальцію. Тому ендолізосомальна система є одночасно кальцій-вмісними органοїдами клітин, які вивільнюють кальцій за дії нікотинацидаденіндинуклеотид фосфату (НААДФ). Однак, роль НААДФ-чутливого  $\text{Ca}^{2+}$  депо у пухлинних клітинах залишається нез'ясованою. Також невивченими є взаємозв'язки між цим депо та різними системами активного транспортування іонів, зокрема за умов блокування  $\text{H}^+$ -помпи бафіломіцином.

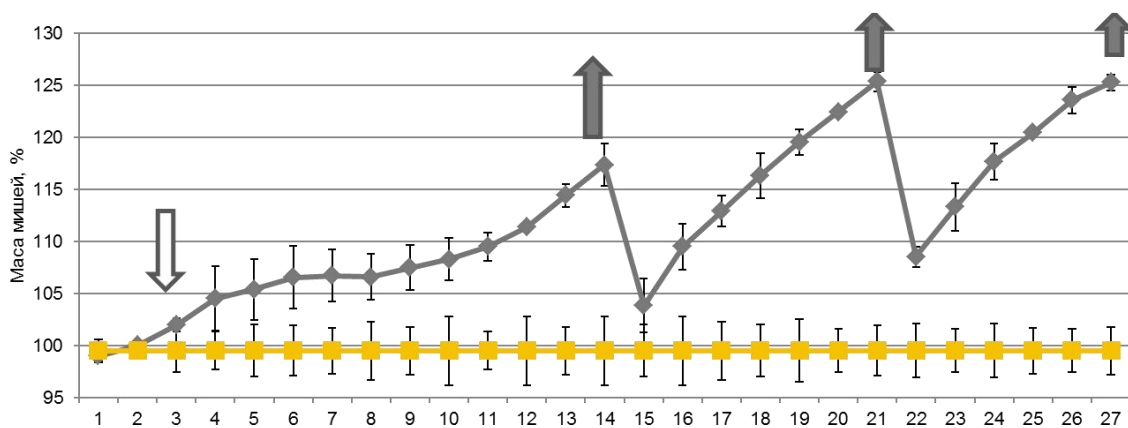
## Підсумок

1. Лімфоми є особливим типом новоутворень через їхню поширеність та особливості функціонування. Мишача лімфома NK/Ly є зручним експериментальним об'єктом з огляду на швидкий розвиток та особливості термінальної стадії росту пухлини.
2. Для новоутворень характерним є ефект Варбурга, коли енергетичі потреби покриваються переважно завдяки гліколізу. Однак, окисні процеси у мітохондріях ракових клітин також відіграють дуже важливу роль через їхню вищу ефективність та залученість у такі важливі процеси як апоптоз, регуляція гіпоксійних станів та продукцію АФО.
3. Мітохондрії можуть використовуватись як «мішені» для дії протипухлинних препаратів, оскільки порушення процесів дихання та синтезу АТФ здатне призвести до апоптозу і/чи некрозу ракових клітин.

## 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1 Прививання і підтримування експериментальної лімфоми NK/Ly у мишей.

Робота проводилася на штамі мишачої лімфоми NK/Ly [147]. Пухлинні клітини нарощували у мишах C57 black і білих нелінійних мишах методом перевивання. Штам лімфоми NK/Ly одержаний із колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України, Київ. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин (1998), що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2014).



Контроль (30 г)



На 7-ий день після інокуляції NK/Ly (36 г)

**Рис. 2.1.** Зміни маси мишей і дренажу клітин лімфоми NK/Ly. Білою стрілкою відзначено інокуляцію клітин, темними – дренажі. За 100% прийнято масу контрольних тварин ( $M \pm m$ ,  $n=3$ ).

Мишам внутрішньочеревно вводили 0,2 мл асцитної рідини, яка містила  $10-15 \times 10^6$  пухлинних клітин. Приріст асциту контролювали методом зважування мишей щодоби, починаючи після інокуляції пухлинних клітин. Час приросту асциту з клітинами становив 8-14 днів залежно від швидкості наростання пухлини і ваги тварин. Мишей із приростом ваги тіла на 40-60% дренивали. Асцит отримували способом дрениванням черевної порожнини мишей стерильним шприцом під ефірним наркозом на 8-14 день після інокуляції. Кількість клітин рахували у камері Горяєва з попереднім розведенням суспензії. Для оцінки цілісності плазматичної мембрани клітини фарбували 0,1%-ним розчином трипанового синього. Зазвичай < 99% клітин (~150 млн/мл) були трипан-негативні, що свідчило про цілісність їхніх мембран. В подальшому популяцію клітин прививали інтактним мишам для підтримки штаму клітин. Для перевивання використовували тільки клітини першого дренажу.

Підрахунок кількості клітин проводили за наступною формулою:

$$n = \frac{n_{\text{ККЛ}}}{n_{\text{КВК}}} \times 250000$$

де  $n_{\text{ККЛ}}$  - загальна кількість клітин,  $n_{\text{КВК}}$  - кількість великих квадратів камери Горяєва, або:

$$C = \left( \frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_5}{5} \right) \times 5000$$

де  $C$  – кількість клітин в 1 мл суспензії,  $n$  – кількість клітин в одному великому квадраті камери Горяєва.

## 2.2. Виділення мітохондрій з печінки щурів і мишей

Мітохондрії печінки та щурів мишей ізолювали методом диференційного центрифугування. Для екстирпації печінки тварин декапітували під ефірним наркозом, після чого орган швидко вирізали [11]. Печінку після видалення зважували та відмивали від крові охолодженим розчином А такого складу (у ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, MgCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 5, HEPES – 10; pH 7,4. Печінку продавлювали через металевий прес, додавали середовище Б (див.

нижче) у співвідношенні 8 мл середовища на 1 г тканини і руйнували клітини у гомогенізаторі Поттера-Евельгейма за 800 об/хв та трьох вертикальних ходах поршня. Склад середовища Б (для гомогенізації) (у ммоль/л): сахароза – 250, ЕГТА – 1, НЕРЕС – 10; рН 7,2. Гомогенат центрифугували 3 хв за 150 g та 5 хв за 300 g без зупинки центрифуги РС-6 для осадження фрагментів тканини і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту протягом 15 хв за 4500 g при температурі 0–2°C. Отриманий осад мітохондрій ресуспензували у середовищі Б з розрахунку 0,1 мл розчину на 1 г вихідної тканини печінки. Рівень білка у такій суспензії становив ~26,8 мг/мл. Отримані мітохондрії протягом експерименту утримували при температурі 0–2°C в закритій пробірці.

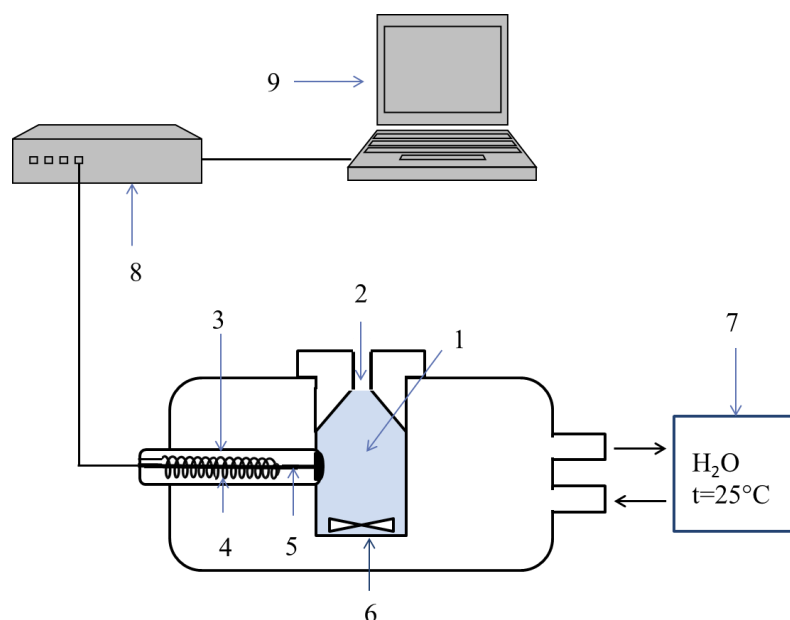
### **2.3 Виділення мітохондрій з лімфоми NK/Ly**

Мітохондрії клітин NK/Ly виділяли методом диференційного центрифугування. Клітини лімфоми осаджували із свіжоотриманого асцити центрифугуванням впродовж 5 хв за 1000 об/хв у центрифuzі ОПн-3УХЛ4.2. Клітини промивали середовищем Б і повторно центрифугували впродовж 5 хв за 1000 об/хв. Усі подальші маніпуляції проводили при температурі 0–2°C. Осад клітин суспендували у середовищі Б, так щоб об'єм суспензії відповідав початковому об'єму асцити, і гомогенізували в скляному гомогенізаторі (зазор між поршнем і циліндром гомогенізатора 0,075 мм) зі швидкістю 2000 об/хв впродовж 10 хв при охолодженні у льодяній бані. Гомогенат центрифугували 10 хв за 300 g у центрифuzі Jouan MR 1812 для осадження незруйнованих клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту в тій же центрифuzі протягом 10 хв за 8500 g та температурі 0–2°C. Отриманий осад мітохондрій суспендували у середовищі Б з розрахунку 0,1 мл розчину на 1 мл початкового асцити. Рівень білка у такій суспензії лімфоми становив ~39,3 мг/мл. Отримані мітохондрії протягом полярографічного експерименту зберігали за температури 0–2°C в закритій пробірці.



## 2.4. Полярграфічні дослідження дихання і окисного фосфорилування мітохондрій

Швидкість поглинання кисню реєстрували полярграфічним методом, що базується на реєстрації електрохімічного відновлення розчиненого кисню на катоді при накладанні потенціалу 0,65 В. Величину дифузного струму реєстрували за допомогою полярграфічної установки, зібраної на базі електрода Кларка, пристрою Record-4 (ІТЕБ РАН, Пушино), магнітної мішалки для розмішування суспензії та плексигласової закритої комірки об'ємом 1,4 мл, термостатованої за температури 25°C.

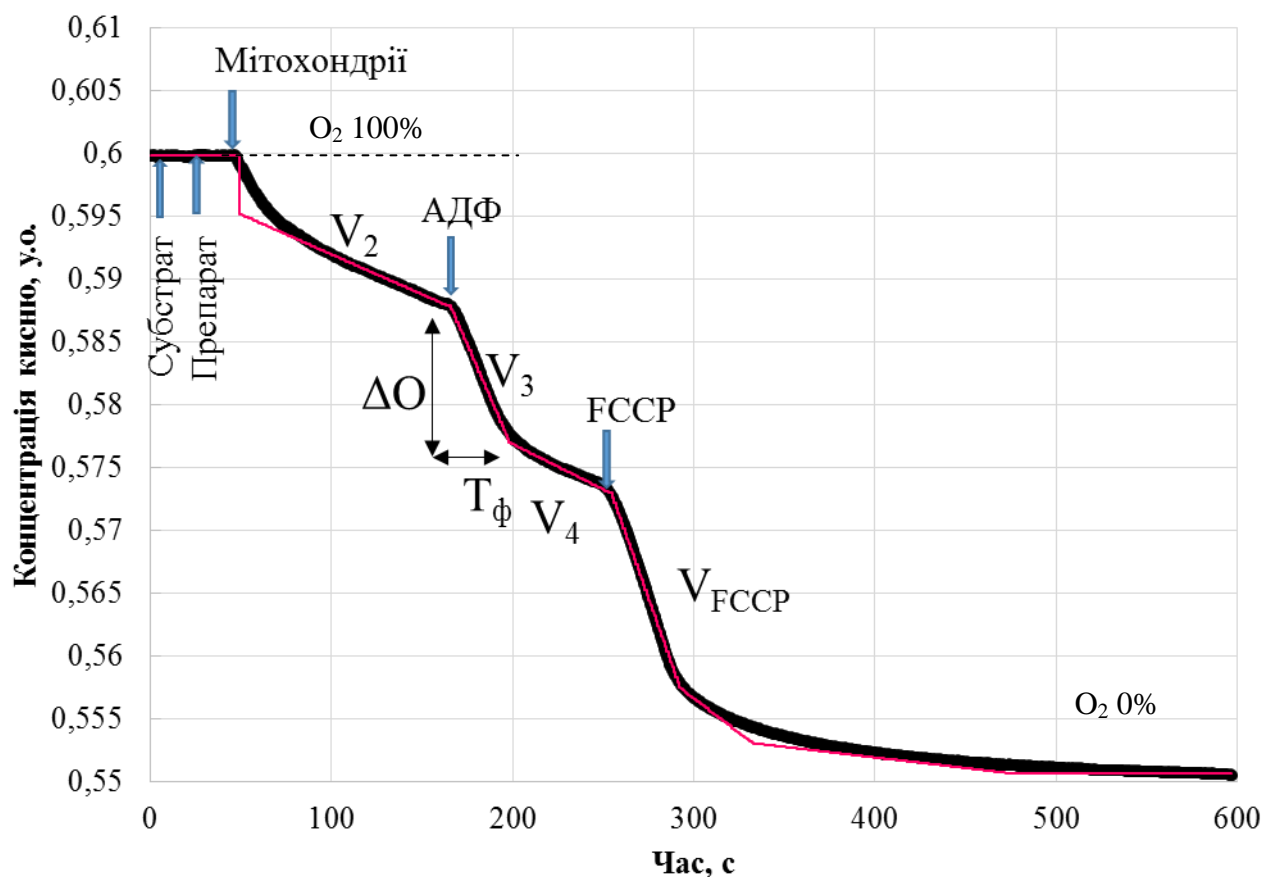


**Рис. 2.2.** Схема полярграфічної установки. 1 - полярграфічна комірка, 2 - отвір для добавок, 3 - електрод Кларка, 4 - хлорсрібний електрод порівняння, 5 - платиновий електрод, 6 - магнітна мішалка, 7 – термостат, 8 - полярграф (Record-4), 9 – комп'ютер.

У полярграфічну комірку послідовно вносили середовище інкубації, субстрат окиснення, досліджуваний препарат і суспензію мітохондрій (140 мкл суспензії). Склад середовища інкубації (у ммоль/л): сахароза – 250,  $K_2HPO_4$  – 2, EGTA – 0,1,  $MgCl_2$  – 1, HEPES – 10; рН 7,2. Концентрація мітохондріального білка у комірці становила ~3,75 мг/мл (печінка) і ~5,5 мг/мл (лімфома). Як

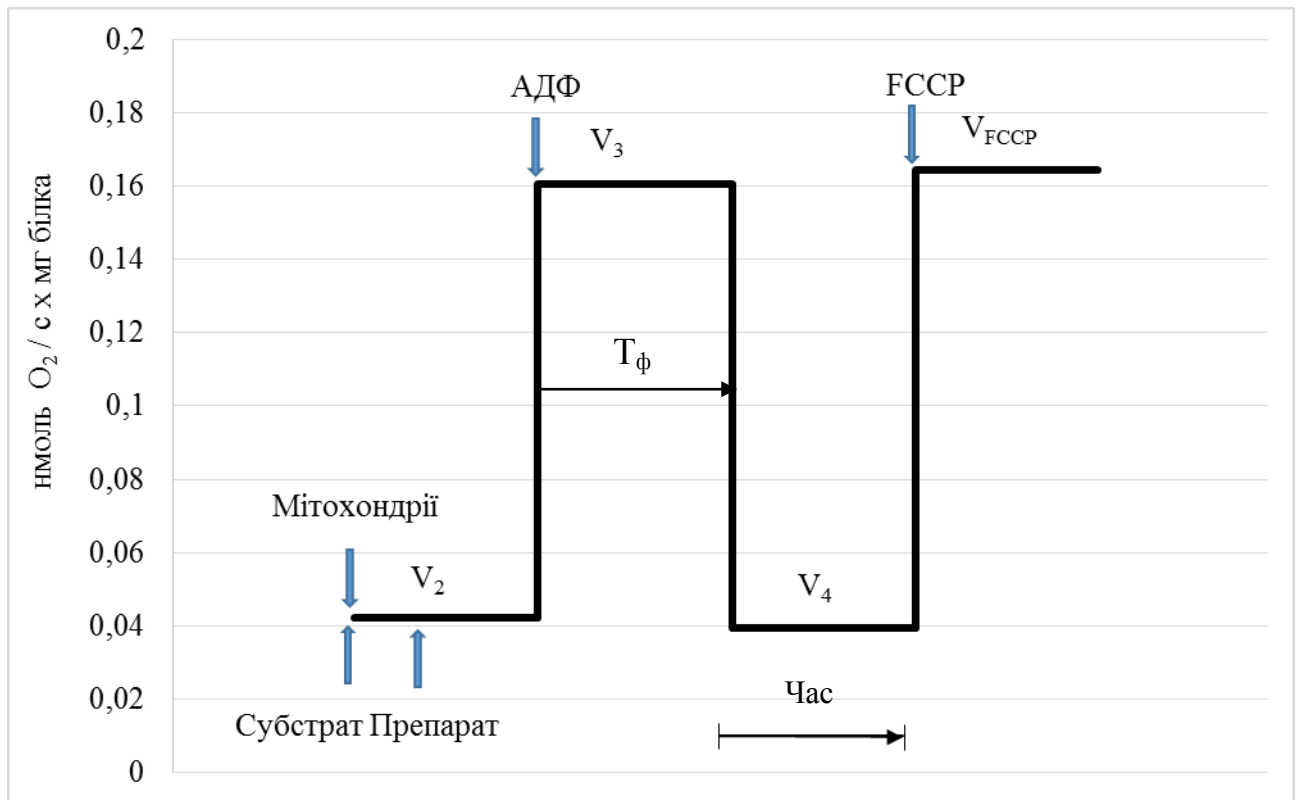
субстрати використовували  $\alpha$ -кетоглутарат та сукцинат у концентраціях близьких до  $K_m$ : відповідно 1 і 0,35 ммоль/л. Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці об'ємом 1,4 мл становила 200 мкмоль/л).

За полярографічними кривими визначали швидкість поглинання кисню у трьох метаболічних станах, які були запропоновано Чансом і Вільямсом [23, 50] (рис.2.3). У стані «спокою» 2 до мітохондрій додавали екзогенний субстрат без АДФ. За цих умов швидкість дихання ( $V_2$ ) повільна, фосфорилування відсутнє, а дихальні переносники значною мірою відновлені. В «активному» стані 3 мітохондрії забезпечені субстратами окиснення і АДФ. Швидкість дихання ( $V_3$ ) різко стимулюється і супроводжується фосфорилуванням АДФ. Збільшується концентрація окиснених форм дихальних переносників. У «контрольований» стані 4 мітохондрії переходять після вичерпання повного фосфорилування доданого АДФ до АТФ. Концентрація субстратів продовжує залишатися високою, а швидкість поглинання кисню ( $V_4$ ), в порівнянні з станом 3, зменшується. Наприкінці полярографічного запису у деяких експериментах додавали роз'єднувач дихання і окисного фосфорилування карбоніл цианіду-р-трифлюорометоксифенілгідразон (FCCP), який різко стимулював швидкість дихання ( $V_p$ ), виявляючи максимальну окисну здатність мітохондрій. Такі метаболічні стани є зручною моделлю для характеристики функціонального стану мітохондрій за умов, що дозволяють оцінити їхню роботу в активному і контрольованому станах [23, 114]. Також розраховували дихальний контроль (ДК,  $V_3/V_4$ ) – за Чансом, і  $V_3/V_2$ ) – за Ларді), ефективність (АДФ/О), час ( $T_\phi$ ) і швидкість ( $V_\phi$ ) окисного фосфорилування. Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчиняється 200 нмоль  $O_2$  [16].



**Рис. 2.3.** Типовий полярографічний запис (дихання мітохондрій печінки щура). Чорною лінією відображено первинні дані, червоною – лінеаризовані та обчислені.

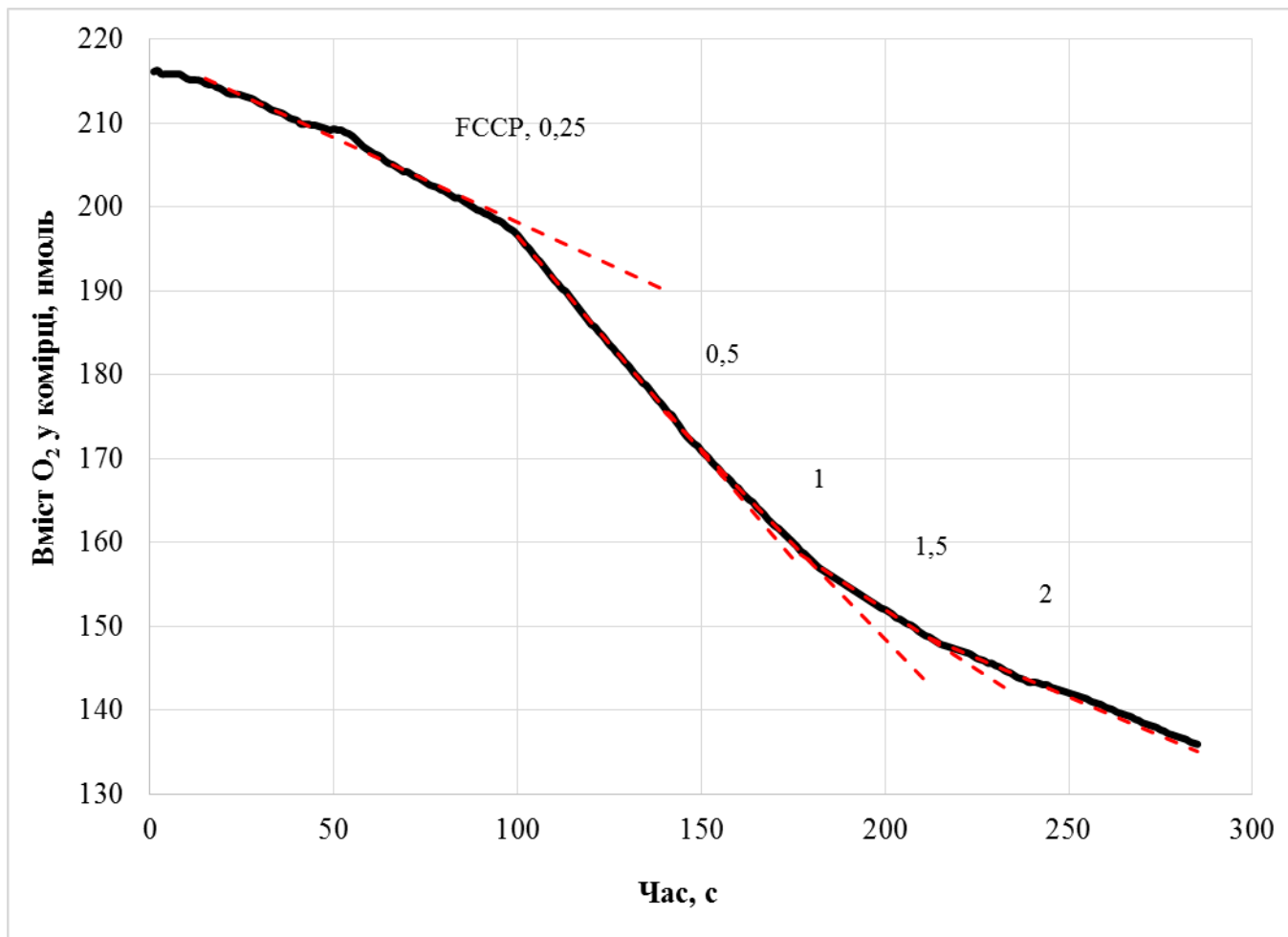
На рис 2.4. зображені швидкості дихання мітохондрій у діаграмному представленні. Такий спосіб візуальної презентації даних запропонований проф. М. М. Кондрашовою [114]. Він вибраний з метою кращого порівняння різних полярограм між собою у внормованому (у перерахунку на одиницю мітохондріального білка) вигляді. Швидкість фосфорилування на діаграмах виражається або у нмолях  $O_2 / c (xв) \times мг$  білка або у нг-атомах  $O / c (xв) \times мг$  білка, а час фосфорилування – у  $c (xв) \times мг$  білка.



**Рис. 2.4.** Діаграмне зображення швидкостей дихання мітохондрій.

## 2.5. Визначення максимальної окисної здатності клітин NK/Ly

Для визначення швидкості поглинання кисню клітинами лімфоми NK/Ly відмиті від асцитної рідини клітини інкубували 15 хв при температурі 37 °С у закритій пробірці у базовому позаклітинному середовищі (контроль), що містило, ммоль/л: NaCl – 140,0, KCl – 4,7, CaCl<sub>2</sub> – 1,3, MgCl<sub>2</sub> – 1,0, HEPES–10,0; рН 7,4. До базового середовища в експериментах додавали субстрати (по 2 ммоль/л). Після інкубації 10 млн пухлинних клітин вносили у полярографічну комірку. Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом за допомогою установки, зібраної на базі електрода Кларка, полярографа YSI 5300, цифрового вольтметра, комп'ютера та скляної термостатованої закритої комірки об'ємом 1,6 мл, за температури 37°С. Перемішування суспензії у полярографічній комірці здійснювали за допомогою пропелерної мішалки [157]. Типовий запис дихання клітин NK/Ly стимульованого додаваннями FCCP наведено на рис. 2.5.



**Рис 2.5.** Типовий запис дихання клітин NK/Ly стимульованого додаваннями FCCP (в мкмоль/л) за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (2 ммоль/л). Пунктирними лініями наведено лінеаризовані та екстрапольовані швидкості дихання.

## 2.6. Трансмійсна електронна мікроскопія

Для електронної мікроскопії суспензію мітохондрій промивали какодилатним буфером (0,2 моль/л) та фіксували 1,5% розчином глутарового альдегіду на какодилатному буфері (2 год) та 1% розчином OsO<sub>4</sub> (2 год), який також виготовлений на какодилатному буфері. Після цього зразки переносили у 1,5% водний розчин уранілацетату на 12 год. Фіксовані зразки промивали і зневоднювали при кімнатній температурі у зростаючих концентраціях етанолу (у діапазоні від 70° до 100°). Зневоднені зразки переносили у чисту епоксидну смолу і поміщали у капсули для полімеризації й витримували 24 год при температурі

40°C у термостаті та 48 год при температурі 60°C. Зрізи виготовляли за допомогою ультрамікротома УМТП-6М. Контрастували їх у 1,5% розчині уранілацетату, виготовленому на 70° етанолі. Ще раз контрастували зрізи у цитраті свинцю за Рейнольдсом, після чого переглядали і фотографували на трансмісійному електронному мікроскопі ПЭМ-100.

## 2.7. Визначення АТФ-азної активності

На початку експерименту 200 мкл постмітохондріальної фракції клітин лімфоми поміщали у середовище інкубації без АТФ, яке містило (у ммоль/л): NaCl – 50,0; KCl – 100,0; трис/HCl – 20,0; MgCl<sub>2</sub> – 3,0; CaCl<sub>2</sub> – 0,01; NaN<sub>3</sub> – 1 (селективний інгібітор АТФ-ази мітохондрій); рН = 7,4 за 37 °С. АТФ-гідролазну реакцію ініціювали додаванням 3 ммоль/л АТФ (Sigma) й інкубували проби протягом 15 хв за 37°C та помірного струшування у водяному ультратермостаті. Для активування НААДФ-чутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів до суспензії до давали НААДФ (Sigma) у концентрації 7 мкмоль/л. Для блокування Н<sup>+</sup>-помпи застосовували бафіломіцин (Sigma) у концентрації 1 мкмоль/л. Після завершення інкубації реакцію зупиняли додаванням 5 мл 10 % трихлороцтової кислоти, витримували проби 10 хв і центрифугували при 1600 g протягом 10 хв. Одержану безбілкову надосадову рідину використовували для визначення в ній вмісту неорганічного фосфору (P<sub>н</sub>) за методом Фіске–Субарроу. Активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми розраховували за різницею вмісту P<sub>н</sub> у середовищах різного складу та виражали в ммоль P<sub>н</sub> у перерахунку на 1 мг білка на 1 год. Сумарну АТФ-азну активність постмітохондріальної фракції клітин визначали у Ca<sup>2+</sup>- та Mg<sup>2+</sup>-вмісному середовищі інкубації. Для визначення питомої активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази зі сумарної активності АТФ-аз обчислювали АТФ-азну активність постмітохондріальної фракції клітин у середовищі, яке містило 1 ммоль/л оуабаїну (Sigma). Питому Mg<sup>2+</sup>-АТФ-азну активність визначали у середовищі інкубування, що містило 1 ммоль/л ЕГТА без CaCl<sub>2</sub> і наявності 1 ммоль/л оуабаїну. Тапсигаргін у концентрації 1 мкмоль/л

застосовували для того, щоб відокремити внесок  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ЕПР. У всіх дослідах контролем на неферментативний гідроліз АТФ було реакційне середовище, в яке не додавали фракції клітин.

## 2.8. Обробка первинних даних та статистичний аналіз полярографічних даних

Отримані первинні полярографічні дані аналізували за допомогою авторського скрипту на базі математичного процесора MATLAB [7] та авторської програми MitoDancer, з використанням у обчисленнях лінеаризації (метод найменших квадратів) та кластерного аналізу (метод k-means).

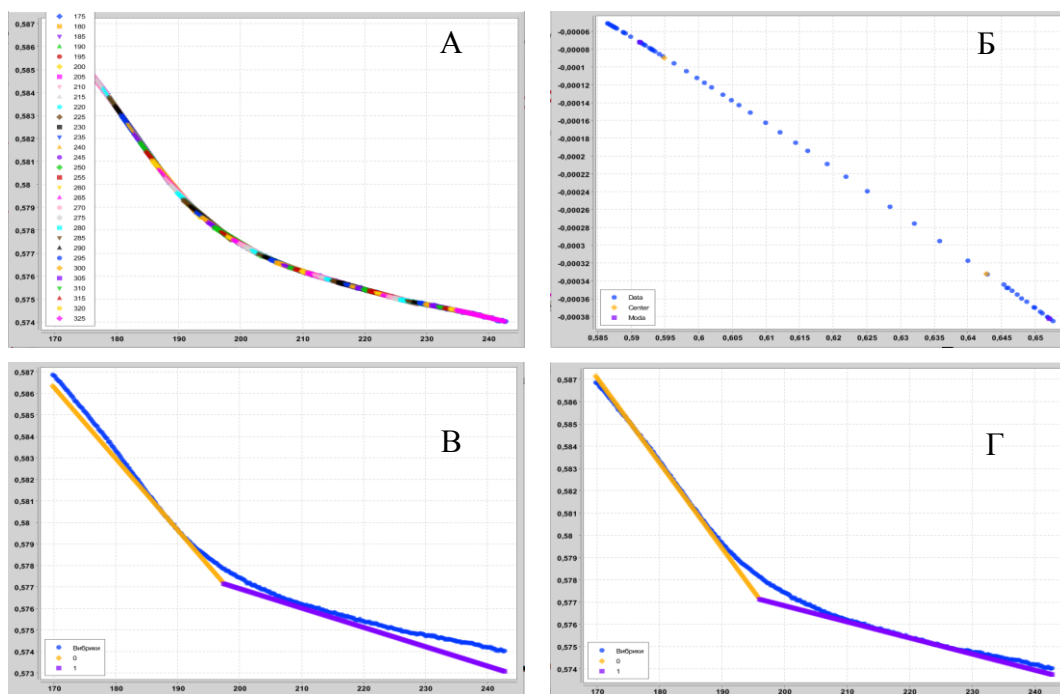
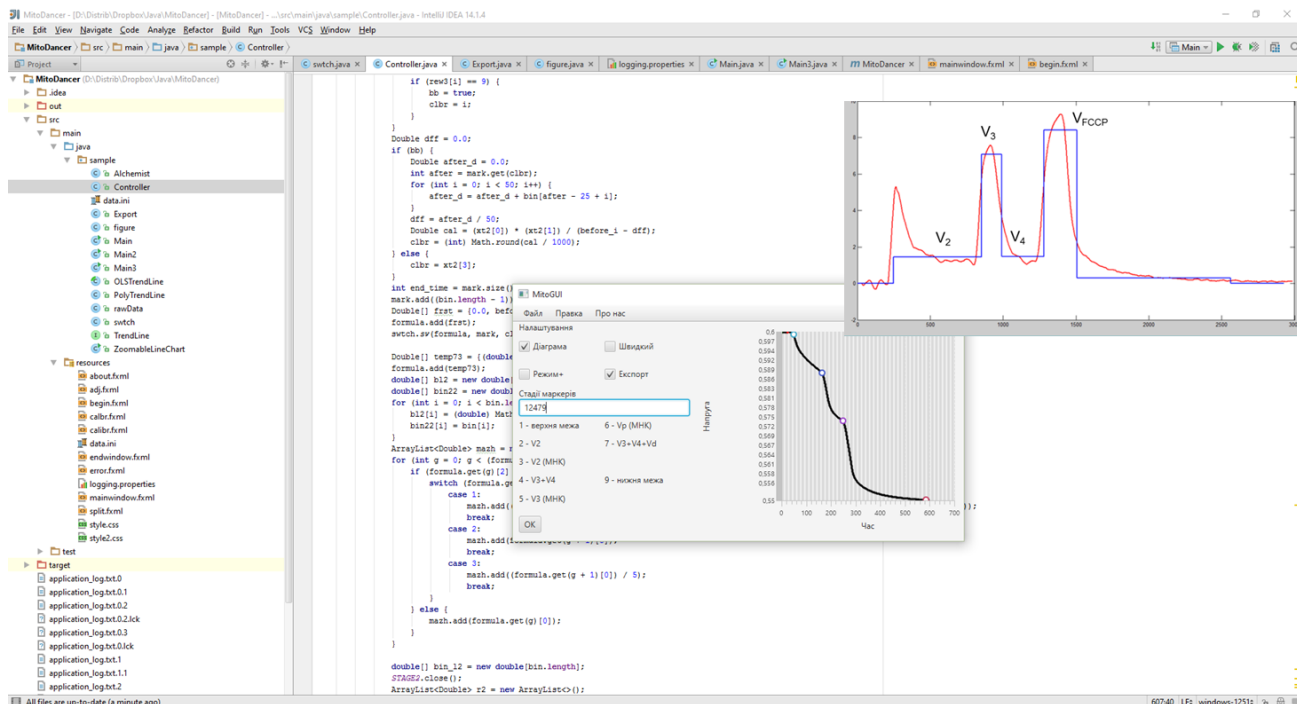


Рис. 2.6. Візуалізація принципу програмного аналізу полярографічних записів

Полярографічні дані реєструвалися на базі полярографічної установки «Record 4» з використанням однойменної програми, що запускала в операційній системі Windows 98SE, емульованій віртуальним гіпервізором VMware Workstation Player. З електрода знімалися дані з частотою 5 показників за секунду. В результаті був отриманий псевдотекстовий файл з розширенням gc4, що містив технічні дані проби, дані часу, сили струму та етап проби у представленні CSV-типу.



**Рис. 2.7.** Інтерфейс програми MitoDancer з елементами програмного коду

Файли завантажувалися у скомпільовану Java-програму MitoDancer, де аналізувалися напівавтоматичним шляхом. Усі дані проаналізовані програмою тої ж версії, під час обробки алгоритм не змінювався. Згідно алгоритму програми, однолінійні ділянки лінеаризувалися методом найменших квадратів. Дво- та трилінійні ділянки розбивалися на певне скінченне число (50-200, залежн овід довжини відрізка) лінійних ділянок (Рис. 2.6.А), параметри яких групувалися у 2 (або 3, залежно від етапу дослідження) групи за методом кластерного аналізу (k-means) (Рис. 2.6.Б). У кожній групі визначався як центр групи (значення, найбільш рівновіддалене від решти сукупності точок) так і мода групи (значення, що найчастіше зустрічалася). Моді та центри досліджуваних груп (Рис. 2.6.В і 2.6.Г) порівнювалися з первинними даними методом  $R^2$  (алгоритм, що кількісно визначає ступінь відповідності обчислених даних до первинних). Як точніший вибирався більш приближений до первинних даних варіант, який і використовувався для подальших обчислень. Достатнім вважався коефіцієнт  $R^2 \geq 0,95$  (за випадків, коли ні моди, ні центри груп не відповідали даному критерію, програма відображала цей факт попереджувачим сигналом). Швидкість



дихання розраховували, вважаючи що при температурі 25°C в 1 мл розчинено 238 нмоль O<sub>2</sub>. Отримані параметри перераховували відповідно до кількості мітохондрійного білка, який визначали за методом Лоурі[131].

## **2.8. Статистичний аналіз результатів**

Усі досліди повторювали як мінімум п'ять разів у кожному варіанті. Кожна точка графіків, наведених на рисунках, та ордината діаграм відповідає середньому значенню  $M$ . Середню похибку  $m$  отриманого результату вираховували за величиною середньої квадратичної похибки  $\sigma$ . Вірогідність різниці між порівнюваними групами визначали за  $t$ -критерієм Стюдента [11]. Дисперсійний аналіз здійснювали, використовуючи метод ANOVA. Критичні рівні достовірності за перевірки статистичних гіпотез у дослідженнях відповідали значенням 0,05, 0,01 і 0,001. Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Office Excel.

### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За вивчення особливостей біоенергетичних процесів у пухлинних клітинах важливе значення має вибір об'єкту дослідження. Процеси дихання ракових пухлин на субклітинному та клітинному рівні безпосередньо залежать від процесів дифузії та перфузії у капілярах неоплазматичних утворень, які регулюють надходження кисню та поживних речовин до клітин. На сьогодні розроблені модерні неінвазивні методи ядерно-магнітного резонансу для дослідження первинних пухлин та їх метастазів. Ці методи є надзвичайно актуальними для вивчення механізмів канцерогенних перетворень, ранньої діагностики й оцінки ефективності хіміо- і радіотерапії. Зокрема диекспоненційна модель аналізу дифузійно-градієнтних  $^1\text{H}$ -зображень магнітно-резонансної томографії солідних пухлин дає змогу отримати важливу інформацію про канцерогенні зміни перфузії у капілярах пухлин та дифузії молекул води в цій тканині. На моделі гепатоклітинної карциноми було встановлено, що швидку (перфузійну) та повільну (дифузійну) складові коефіцієнта дифузії води можна розмежувати за аналізу дифузійно-градієнтних  $^1\text{H}$ -зображень [32]. У цій роботі зображення магнітно-резонансної томографії реєстрували на горизонтальній установці фірми Varian за умов зовнішнього магнітного поля величиною 9,4 Т. В ортотопній гепатоклітинній карциномі швидка складова коефіцієнта дифузії води, яка становить 38% загального сигналу пухлини, була нижчою порівняно із нормальною печінкою, тоді як повільна складова коефіцієнта дифузії води не відрізнялась у нормальній печінці та гепатоклітинній карциномі, локалізованих у печінці та під шкірою. Зниження швидкої складової коефіцієнта дифузії води могло бути викликане обмеженням перфузії у невнормованій системі капілярів у пухлині. Таким чином, опубліковані раніше дані (на підставі аналізу мап коефіцієнта дифузії води чи за допомогою моноекспоненційної моделі обрахунку [32, 35]) про зниження цього показника за умов канцерогенезу були обумовлені в основному сповільненням перфузійних процесів. Одночасний неінвазивний моніторинг коефіцієнта дифузії води в ортотопній і підшкірній формах солідних

пухлин можна використовувати з урахуванням фізіологічних і метаболічних особливостей канцерогенезу різної локалізації, а також у порівнянні із процесами клітинного дихання. Однак, використання методу ядерно-магнітного резонансу є достатньо коштовним і не завжди доступним. Окрім цього, в асцитних пухлинах, якою є досліджувана у нашій роботі лімфома Немет-Келнера, роль перфузії у забезпеченні киснем і субстратами є не такою визначальною як у солідних пухлинах. Більше того, для вивчення особливостей клітинних неоплазматичних трансформацій та для аналізу механізмів змін, що виникають за дії протипухлинної терапії, більш результативним є дослідження функціонування метаболічних процесів у пухлинах на клітинному чи субклітинному рівні.

Досі дихання ракових клітин вивчали переважно на клітинному рівні, з використанням глюкози як енергетичного субстрату. Даний метод також має деякі методичні обмеження, оскільки не всі енергетичні субстрати проникають через плазматичну мембрану. Для вирішення цієї проблеми зазвичай використовують інвазивну пермеабілізацію мембрани [92]. Більш фізіологічним підходом могло б бути використання метильованих форм субстратів, які проникають крізь мембрану, або виділення мітохондрій. У роботі було проаналізовано обидва підходи для того щоб виявити особливості дихання та енергетичних процесів у клітинах лімфоми.

### **3.1. Визначення максимальної окисної здатності клітин NK/Ly**

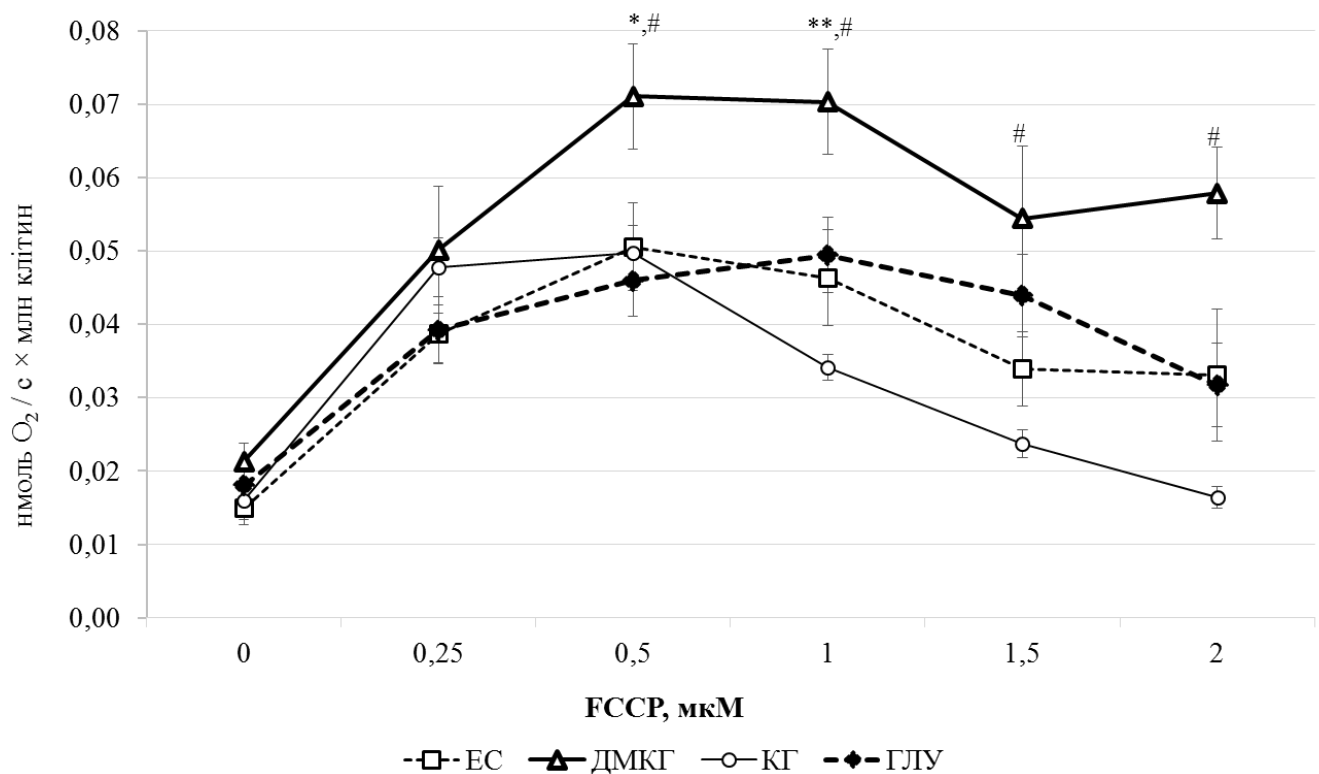
Аналіз субстрат-залежного дихання мітохондрій дає змогу отримати цінну інформацію про енергетичні процеси, які відіграють важливу роль у метаболізмі ракових клітин [69, 203]. Перспективним напрямком дослідження функціонального стану мітохондрій у нормі і при патологіях є вивчення максимальної окисної здатності органел, які розміщені у клітині *in situ* [27, 44]. За цих умов можна краще зберегти природне оточення мітохондрій у клітині. Р. Горбай та співавтори [93] встановили, що пермеабілізовані клітини лімфоми

NK/Ly демонстрували значне зростання швидкості дихання за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату.

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. Для покращення транспорту субстратів крізь плазматичну мембрану за експериментальних умов *in vitro* можна використовувати метилові естери субстратів циклу Кребса, зокрема диметил-кетоглутарат (ДМКГ) та монометил-сукцинат (МСК). Попередні дані виявили, що метилювання сукцинату може покращувати проникнення цього субстрату крізь плазматичну мембрану у клітину [133, 171]. Однак, ефективність проникності метилових естерів ди- і трикарбоксихильних субстратів циклу Кребса та збереження їхньої здатності до дегідрування, а також максимальну окисну здатність пухлинних клітин і, зокрема, лімфоми досі не досліджували.

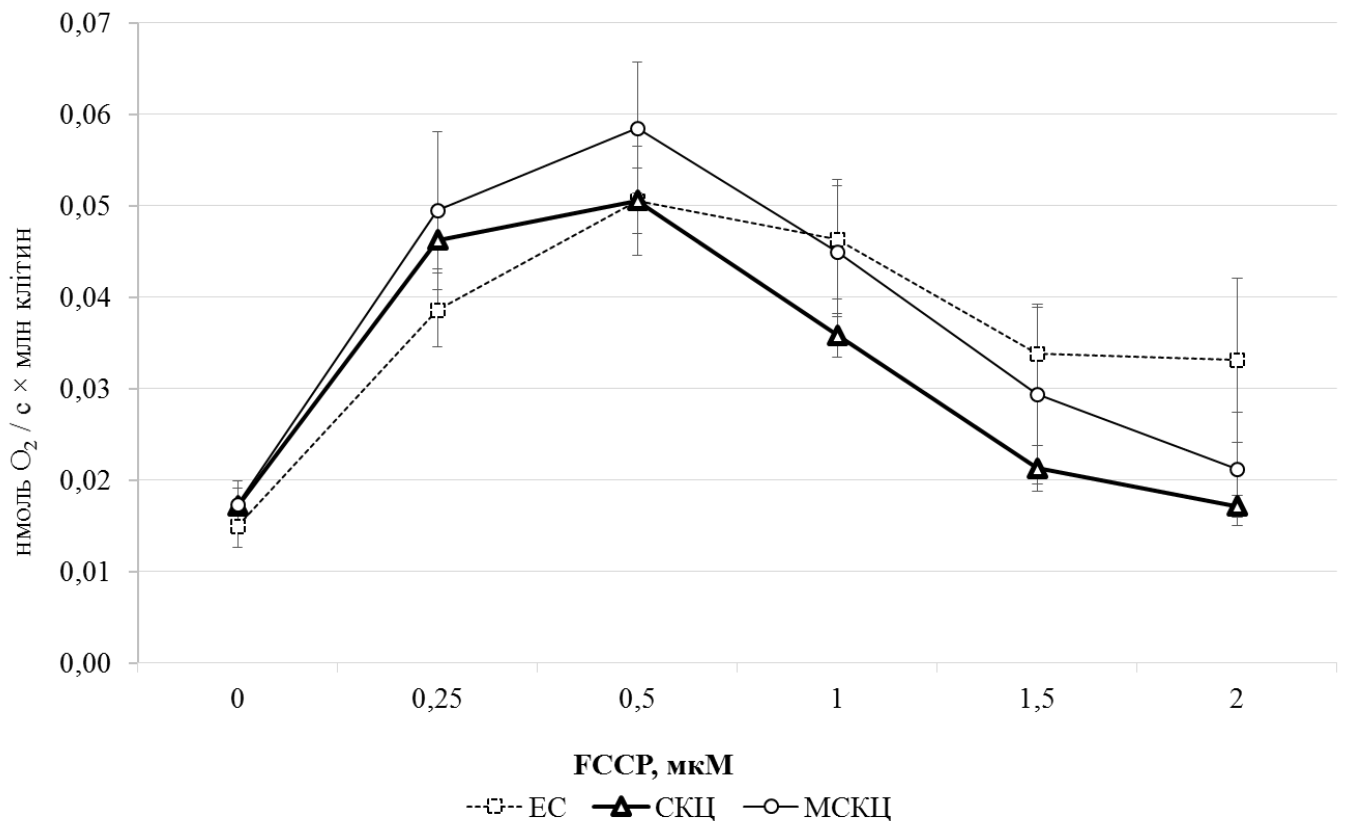
Для оцінки максимальної окисної здатності клітин їхнє дихання стимулювали послідовними додаваннями протонофора FCCP у полярографічну комірку в кінцевих концентраціях (0,25, 0,5, 1, 1,5 і 2 мкмоль/л). На рис 3.1 наведено вплив FCCP на швидкості дихання лімфомних клітин у чотирьох експериментальних групах: без екзогенних субстратів (ендогенні субстрати (контроль), ЕС), з  $\alpha$ -кетоглутаратом, ДМКГ та глутаміном (ГЛУ). Як видно, FCCP у концентраціях 0,25 і 0,5 мкмоль/л стимулював дихання в усіх групах. Однак, 1 мкмоль/л FCCP інгібував дихання за окиснення ЕС (на 8% - з  $0,05 \pm 0,006$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин до  $0,046 \pm 0,005$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин) та додавання  $\alpha$ -кетоглутарату (на 32 % - з  $0,050 \pm 0,003$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин до  $0,034 \pm 0,001$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин). Вищі концентрації FCCP (1,5 і 2 мкмоль/л) інгібували дихання вже в усіх експериментальних групах. За окиснення ДМКГ швидкість стимульованого FCCP дихання достовірно зростала за концентрацій протонофора 0,5 мкмоль/л (на 42% - з  $0,05 \pm 0,006$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин до  $0,071 \pm 0,007$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин), і 1 мкмоль/л (на 52,8% - з  $0,046 \pm 0,00$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин до  $0,07 \pm 0,007$  нмоль  $O_2/$  с  $\times$  млн клітин) у порівнянні із контролем чи

дослідом з  $\alpha$ -кетоглутаратом, що на нашу думку свідчить про кращу проникність плазматичної мембрани для ДМКГ. Достовірної різниці між швидкістю дихання клітин контрольної групи та групи з додавання  $\alpha$ -кетоглутарату не було виявлено за жодної концентрації FCCP. Це підтверджує робочу гіпотезу про те, що активність специфічного транспортера  $\alpha$ -кетоглутарату є низькою у мітохондріях досліджуваних клітин NK/Ly. Аналогічне твердження є справедливим і для глутамату. Проте було встановлено, що за таких доз протонофора, як 0,5 і 1 мкмоль/л, швидкість дихання клітин, інкубованих з диметил- $\alpha$ -кетоглутаратом, статистично достовірно була вищою порівняно як з клітинами з  $\alpha$ -кетоглутаратом, так і з клітинами контрольної проби (на 44,8% і 105,8% порівняно з  $\alpha$ -кетоглутаратом та на 39,2% і 52,1% - порівняно з клітинами контрольної проби), а за дози 2 мкмоль/л – тільки з клітинами, інкубованими з  $\alpha$ -кетоглутаратом (на 74,9% відповідно).



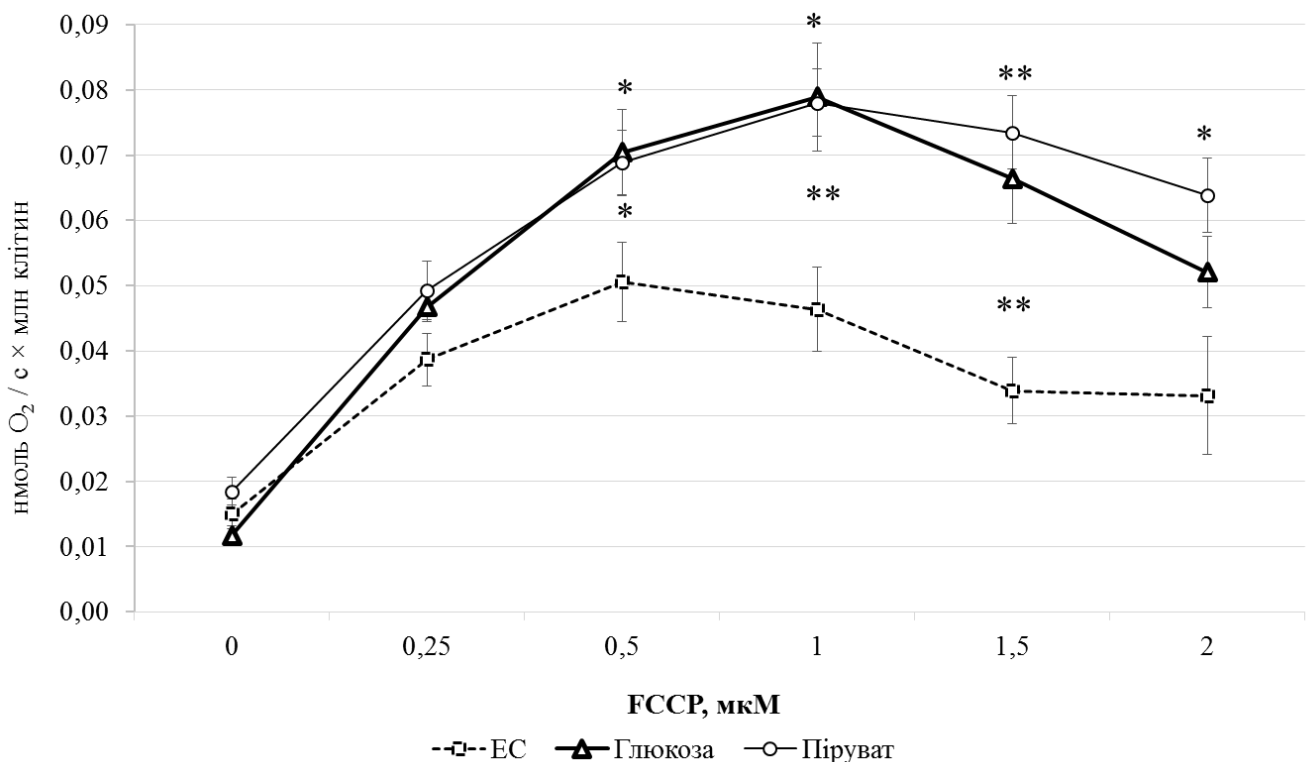
**Рис. 3.1.** Зміни швидкості дихання клітин NK/Ly за окиснення ендогенних субстратів (ЕС) та додавання  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ), ДМКГ і ГЛУ на фоні протонофора FCCP. Достовірні зміни: \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем (ЕС), \*\* –  $p < 0,01$ ; # –  $p < 0,05$  порівняно з КГ.

На рис 3.2 наведено вплив FCCP на швидкості дихання лімфомних клітин у трьох експериментальних групах іншої серії: без субстратів (контроль, ЕС), з сукцинатом і МСК. Як видно, дихання лімфомних клітин достовірно не відрізнялося від контрольних значень (ЕС) як за використання звичайого СК, так і за проникного метил-сукцинату. Брак достовірної різниці між клітинним диханням за використання метильованої і неметильованої форм сукцинату може бути пояснена тим, що поглинання сукцинату через NaDC-3 спряжене з активністю  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФази [201], яка б мала відновлювати натрієвий градієнт використаний як джерело енергії для котранспорту субстрату. Також цей ефект можна було б пояснити недостатньо високою активністю сукцинатдегідрогенази, що не може забезпечити ще вищу окисну здатність, навіть за наявності проникного сукцинату.



**Рис. 3.2.** Зміни швидкості дихання клітин NK/Ly за окиснення ендогенних субстратів (ЕС) та додавання СКЦ і ММС на фоні протонофора FCCP.

Була проведена також серія дослідів з додаванням глюкози та пірувату. Виявлено, що дихання клітин з глюкозою та піруватом за стимуляції FCCP є достовірно вищим, порівняно з параметрами дихання клітин, що інкубувалися без субстратів. Так за окиснення глюкози і концентрації FCCP 0,5 мкмоль/л швидкість дихання (у нмоль  $O_2$  / с  $\times$  млн клітин) зростала на 37,2% (з  $0,05 \pm 0,01$  до  $0,07 \pm 0,01$ ), 1 мкмоль/л FCCP - на 71,7% (з  $0,05 \pm 0,01$  до  $0,08 \pm 0,01$ ) та 1,5 мкмоль/л FCCP - на 94,1% (з  $0,03 \pm 0,01$  до  $0,07 \pm 0,01$ ). За окиснення пірувату і концентрації FCCP 0,5 мкмоль/л швидкість дихання зростала на 35,3% (з  $0,05 \pm 0,01$  до  $0,07 \pm 0,01$ ), 1 мкмоль/л FCCP - на 69,6% (з  $0,05 \pm 0,01$  до  $0,08 \pm 0,01$ ), 1,5 мкмоль/л FCCP - на 117,6% (з  $0,03 \pm 0,01$  до  $0,08 \pm 0,01$ ) та 2 мкмоль/л - на 88,2% (з  $0,03 \pm 0,01$  до  $0,06 \pm 0,01$ ) для пірувату. Відповідно, ми можемо припустити наявність у клітинах NK/Ly транспортерів для даних субстратів, якими виступають МСТ для пірувату [201] та GLUT для глюкози [28].



**Рис. 3.3.** Зміни швидкості дихання клітин NK/Ly за окиснення ендогенних субстратів (ЕС) та додавання глюкози і пірувату на фоні протонофора FCCP.

Зазвичай FCCP використовують для зниження мембранного потенціалу мітохондрій, що супроводжується інтенсивним зростанням поглинання кисню [16, 91]. FCCP-стимульовані швидкості дихання за окиснення ендогенних субстратів,  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату достовірно не відрізнялись, що опосередковано свідчить або про недостатню проникність плазматичної мембрани лімфомних клітин для даних дикарбоксилатів, або про наявність високих запасів ендогенних субстратів у клітинах, що «насихують» дихальний ланцюг відновлювальними еквівалентами. У переабілізованих лімфомних клітинах [93] чи в ізольованих мітохондріях [94], де доступ сукцинату і  $\alpha$ -кетоглутарату до мітохондрій вільний, ці сполуки активно окиснюються.

Чи впливають метильні групи на афінність і/чи активність дикарбоксилатних транспортерів, чи вони полегшують перенесення субстратів за механізму дифузії через ліпідний бішар, ще належить дослідити. Проте вже сьогодні відомо, що у переабілізованих клітинах лімфоми інтенсивність дихання за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату є вищою у порівнянні із сукцинатом [93]. Наші дані підтвердили, що за використання метильованих форм естерів субстратів максимальна окисна здатність інтактних клітин лімфоми є вищою на 43% за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату в порівнянні із сукцинатом (рис 3.1 та 3.2). Більше того максимальна окисна здатність за окиснення метильованого  $\alpha$ -кетоглутарату була практично рівновеликою до умов за окиснення глюкози чи пірувату (рис. 3.3), для перенесення яких функціонують добре відомі і раніше описані переносники [28, 152, 203]. Отже,  $\alpha$ -кетоглутарат може бути ключовим енергетичним субстратом для мітохондрій лімфоми. Теоретично відомо, що ефективність окисного фосфорилування за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату (АДФ/О = 2,5) переважає ефективність ФАД-залежного сукцинату (АДФ/О = 1,5) [92]. З іншого боку економне використання кисню є важливим для зазвичай гіпоксійних ракових клітин, тому використання більш ефективних субстратів є енергетично виправданим.



Починаючи із концентрації FCCP 0.5 мкмоль/л, була встановлена різниця швидкостей дихання між експериментальними групами. Так за цих умов швидкість дихання за окиснення глюкози та пірувату ( $\sim 0,07$  нмоль  $O_2$  / с  $\times$  млн клітин) була достовірно вищою порівняно як із контрольними показниками (0,051 нмоль  $O_2$  / с  $\times$  млн клітин) так і за окиснення глутаміну (0,046 нмоль  $O_2$  / с  $\times$  млн клітин). Ця різниця зберігалась і за вищих концентрацій FCCP і була максимальною для 1 і 1.5 мкмоль/л протонофора (за порівняння із глутаміном і контролем, відповідно). Так за стимулювання дихання з 1,5 мкмоль/л FCCP швидкість дихання за окиснення глюкози і пірувату була відповідно на 85% і 106% вищою у порівнянні із контрольним показником. Натомість за стимулювання дихання з 1 мкмоль/л FCCP швидкість дихання за окиснення глюкози і пірувату була на 60,2% вищою у порівнянні із диханням за окиснення глутаміну. Цікаво, що достовірної різниці між швидкістю дихання клітин контрольної групи та групи з додавання глутаміну не було виявлено за жодної концентрації FCCP. Отже, за доз протонофора 0,5 і 1 мкмоль/л швидкість дихання клітин лімфоми, інкубованих з глюкозою і з піруватом статистично достовірно була вищою порівняно з клітинами контрольної проби і клітин інкубованих з глутаміном. При окисненні глюкози швидкість FCCP-стимульованого дихання достовірно зростала за концентрацій протонофора 0,5 і 1 мкмоль/л у порівнянні із контролем. Такий ефект можна пояснити відомим ефектом Варбурга, який передбачає інтенсивне використання глюкози як енергетичного субстрату раковими клітинами. Для глюкози відома родина білків-переносників GLUT, найбільш поширеними з яких є GLUT1 та GLUT3 [28, 98, 134]. З іншого боку за окиснення кінцевого продукту гліколізу пірувату швидкість стимульованого FCCP дихання також достовірно зростала за концентрацій протонофора 0,5, 1 і 2 мкмоль/л у порівнянні із контролем. На нашу думку це свідчить також про важливість аеробних процесів у несолідній пухлині лімфоми NK/Ly з одного боку і наявність транспортера для цього субстрату, існування якого доведено в багатьох типах пухлинних клітин [28, 176, 177]. Активність транспортеру пірувату

(МСТ), згідно літературних даних, також корелює з темпами росту пухлинних колоній та проявленням ефекту Варбурга [62].

ФССР-стимульовані швидкості дихання за окиснення ендogenous субстратів та глутаміну достовірно не відрізнялись, що опосередковано свідчить або про недостатню проникність плазматичної мембрани лімфомних клітин для даного субстрату або про використання цієї амінокислоти для інших потреб. Глутамін розглядають не лише як енергетичний субстрат, потрібний раковим клітинам [34], але також і як елемент антиацидного захисту [95]. Блокування переносників глутаміну розглядають як можливий протираковий засіб, з огляду на високу різноманітність тканин та типів пухлин, які експресують ці транспортери, та зафіксоване зниження рівня глутаміну в крові в носіїв пухлин [192]. Відсутність достовірної різниці між клітинним диханням за використання даного субстрату може бути пояснена низьким рівнем експресії  $\text{Na}^+$ -залежних та  $\text{Na}^+$ -незалежних переносників [162]. Однак, ми вважаємо, що відсутність активації окиснення глутаміну у клітинах лімфоми викликано анаплеротичним зсувом метаболічних шляхів пухлинних клітин. За наявності глутаміну новоутворення орієнтовно активніше синтезують білки та вуглеводи, вилучаючи з циклу Кребса певну кількість метаболітів, і опосередковано знижуючи швидкість клітинного дихання [56, 59].

### **Підсумок**

Диметил- $\alpha$ -кетоглутарат і метилсукцинат можуть бути використані як енергетичні субстрати для дослідження максимальної окисної здатності мітохондрій *in situ* непермеабілізованих ракових клітин. Встановлено, що окисна здатність клітин лімфоми є максимальною за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, пірувату та глюкози.  $\alpha$ -кетоглутарат може бути ключовим енергетичним субстратом циклу Кребса у мітохондріях лімфоми. Звичним енергетичним "паливом" для клітин НК/Лу слугують також глюкоза і піруват, а глутамін, очевидно, використовується переважно як субстрат для синтезу регуляторних протеїнів. Для детального вивчення параметрів окисного фосфорилування та його

спряження із диханням у наступних розділах використали ізольовані мітохондрії клітин лімфоми за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату і ФАД-залежного субстрату сукцинату.

.....

1. Babsky A. M. Contribution of perfusion in diffusion-weighted  $^1\text{H}$ -MRI of intrahepatic and subcutaneous hepatocellular carcinoma in rat / A. M. Babsky, V. George, V. P. Greniukh [et al.] // *Studia Biologica*. – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 5–14.
2. Гренюх В.П. Максимальна окисна здатність мітохондрій клітин лімфоми NK/Ly за використання метилових естерів енергетичних субстратів / В. П. Гренюх, Б. О. Манько, О. О. Сідорова, Й. В. Царик, М. І. Голубєв, А. М. Бабський // *Біологія тварин*. – 2015. – Т. 18, № 4. - С. 42–48.
3. 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

### 3.2. 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. На нашу думку, більш перспективним є метод ізольованих мітохондрій, який дає змогу моделювати різні функціональні стани, за умов спокою, активності та відновлення за окиснення НАД- та ФАД-залежних субстратів.

Класичним об'єктом дослідження енергетичних процесів є мітохондрії печінки щура. Виділення мітохондрій з тканини лімфоми було пов'язано з низкою особливостей експериментальної моделі лімфоми: малою кількістю мітохондрій у клітині та малими розмірами клітин (табл. 3.1). Зокрема, для виділення "спряжених" мітохондрій, які б відповідали на додавання АДФ зворотнім прискоренням дихання ( $V_3$ ) потрібно було апробувати низку методичних прийомів, які наведені у табл. 1.

Таблиця 3.1.

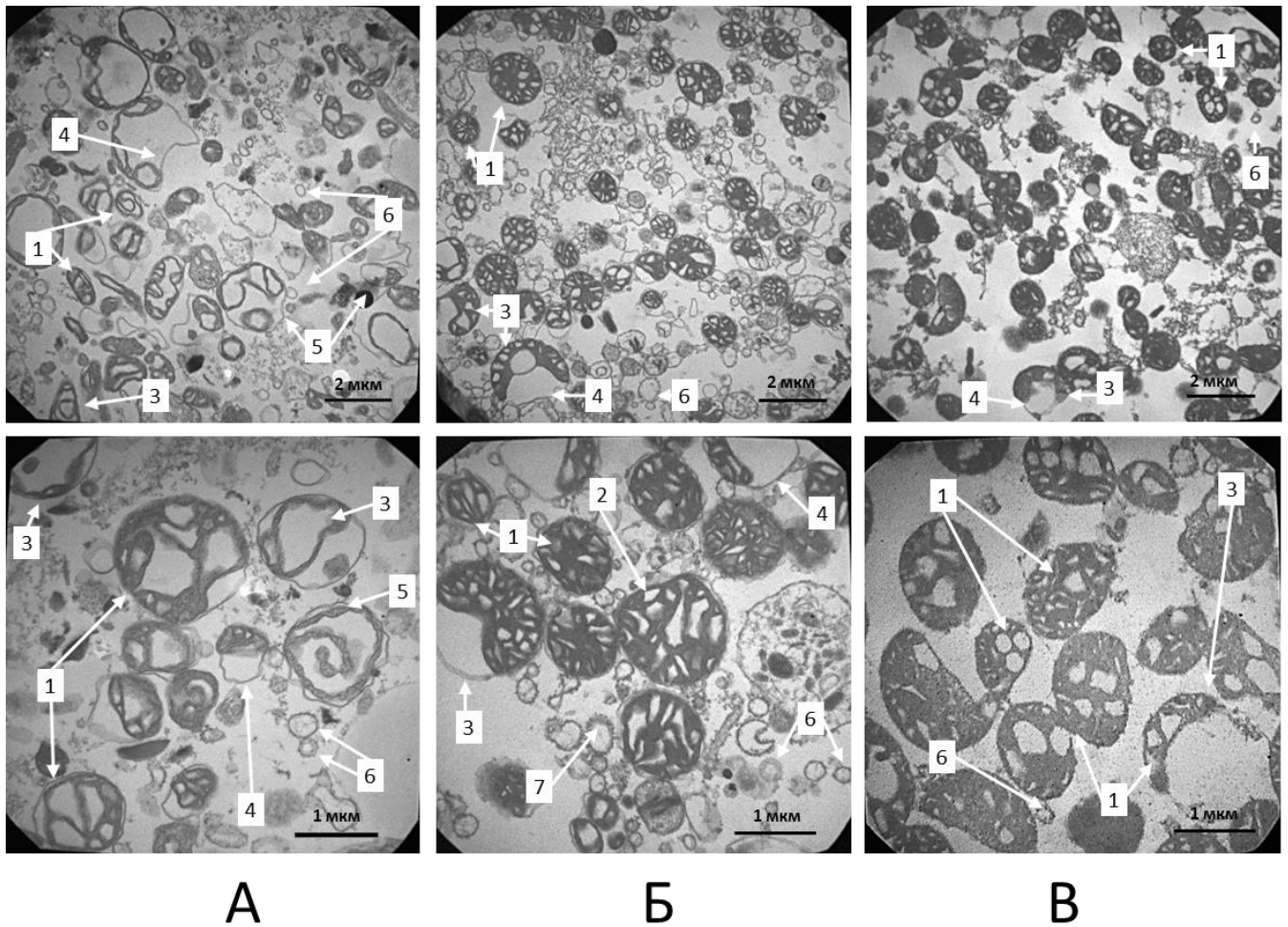
Особливості виділення мітохондрій лімфоми NK/Ly

Етап виділення	Печінка	NK/Ly
Очищення тканини	Відмивання від крові	Відмивання від асцити
Гомогенування	Три вертикальних ходи товчачиком (гомогенізатор Поттера-Евельгейма)	гомогенування 10 хв (гомогенізатор скло-скло)
Центрифугування	1. 100/150 g 2. 4500 g	1. 300 g 2. 8500 g
Стимуляція дихання АДФ	142,9 мкмоль	35,7 мкмоль
Час виділення	30 хв	45-50 хв

Зокрема довелось двічі відмивати клітини лімфоми від асцитної рідини у вдвічі більшому об'ємі розчину (первинним об'ємом розчину вважається об'єм клітинної суспензії, отриманої після дренажу миші). Також для отримання гомогенату клітини рівномірно і тривалий час (10 хв) гомогенізували у гомогенізаторі типу скло/скло за низької температури (0-4°C). (Низьку температуру підтримували охолодженням гомогенізатора у льодяній бані впродовж гомогенізування). Тільки такий спосіб дозволив зруйнувати достатню кількість клітин. Через меншу кількість мітохондрій у лімфомних клітинах (порівняно з гепатоцитами) швидкість обох стадій диференційного центрифугування (осадження ядерної та мітохондріальної фракцій) була збільшена майже удвічі (з 150 до 300 g, та з 4500 до 8500 g відповідно). Внаслідок удосконалень методики дещо зріс час виділення мітохондрій ракових клітин. З методичних причин також була зменшена кількість доданого у полярографічну комірку АДФ, щоби тривалість часу фосфорилування ( $T_{\phi}$ ) була приблизно співмірна для мітохондрій лімфоми і печінки, а полярографічні записи тривали орієнтовно в однакових часових рамках.

На рис. 3.5 наведена електронні мікроскопічні фотографії непромитої суспензії мітохондрій НК/Ly (А), мітохондрій печінки миші (Б) та печінки щура (В) за збільшення  $\times 4000$  (верхній ряд) та  $\times 10000$  (нижній ряд), які використовували зазвичай у наших дослідженнях. Суспензія таких мітохондрій також містить інші клітинні органели. На думку М. М. Кондрашової та ін. у такій суспензії краще зберігаються функціональні особливості мітохондрій та проявляються фізіологічні ефекти [12]. Ця гіпотеза була підтверджена у роботах кафедри фізіології людини і тварин ЛНУ ім. І.Франка [1, 2, 3]. Аналіз цих та інших фотографій показав, що в полі зору мітохондрії лімфоми займають 35-45 % від загальної площі. Лізосоми і пероксисоми натомість займають 6-10 %. Отже співвідношення мітохондрій до пулу лізосом і пероксисом у лімфомі становить 4,3 до 1. На рисунку позначено молоді (1), зрілі (2) та старі (3) мітохондрії. Молодими, зрілими та старими мітохондріями вважають органели,

що перебувають на різних стадіях розвитку (Беякович, 1990). На рисунку також позначено автофагосоми (4), мікросоми (5) та мембрани асоційовані з мітохондріями (6), які формують контакти між ендоплазматичним ретикуломом і мітохондріями. Ізольовані мітохондрії лімфоми мають переважно кулясту форму, з вираженими, злегка набухлими кристами. Мітохондрії лімфоми мають переважно кулясту форму, з вираженими, злегка набухлими кристами.



**Рис. 3.4.** Електронно-мікроскопічна фотографія мітохондрій NK/Ly (А), печінки миші (Б) і печінки щура (В) за збільшення  $\times 4000$  (верхній ряд) і  $\times 10000$  (нижній ряд): 1 – молоді мітохондрії, 2 – зрілі мітохондрії, 3 – старі мітохондрії, 4 – зовнішня мембрана мітохондрій, 5 – автофагосоми, 6 – мікросоми, 7 – мембрани асоційовані з мітохондріями (МAM).

## Підсумок

Вперше методом диференційного центрифугування виділено структурно цілісні мітохондрії лімфоми NK/Ly, які надаються для дослідження окисно-відновних та енергетичних процесів і адекватно відображають процеси у ракових клітинах *in vivo*. Виділені мітохондрії містять усі три форми дозрівання органел: молоді, зрілі та старі. Суспензія ізольованих мітохондрій лімфоми NK/Ly містить також "домішки" лізосом, мікросом, фагосом та інших мембранних структур, основна кількість яких з огляду на їхню меншу масу розташовується в надосадовій рідині після седиментації мітохондрій. Ці "домішки" мають стосунок до кислих депо клітини, які можуть впливати на енергетичні процеси мітохондрій (див. розділ 3.7) і до формування можливої автофагосомної реакції мітоптозу.

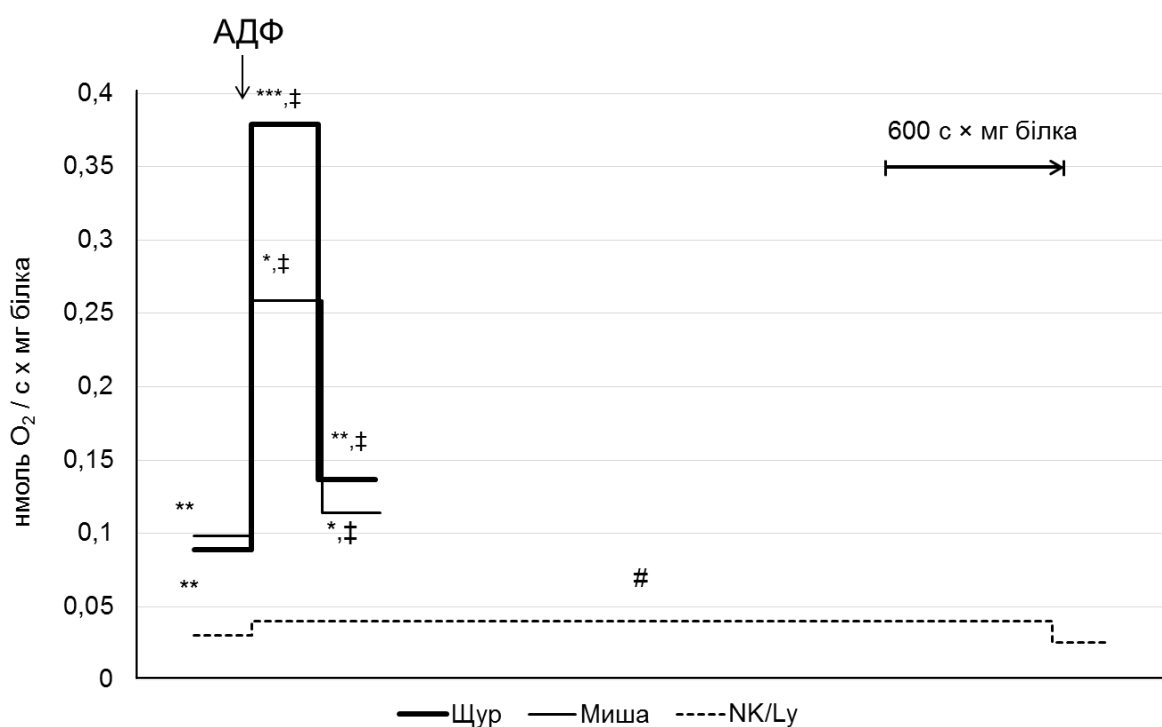
.....

1. Гренюх В. П., Бабський А. М. Аналіз параметрів дихання та окисного фосфорилювання мітохондрій за використання програми MATLAB // 19-й 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

2. Гренюх В. П. Порівняльна характеристика параметрів дихання і окисного фосфорилювання у мітохондріях лімфоми NK/Ly та печінки миші / В. П. Гренюх, М. Д. Луцик, Р. С. Стойка, А. М. Бабський // *Studia Biologica*. – 2015. – №9. – С. 39–50.

### 3.3. Порівняльна характеристика дихання і окисного фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly, печінки миші і печінки щура

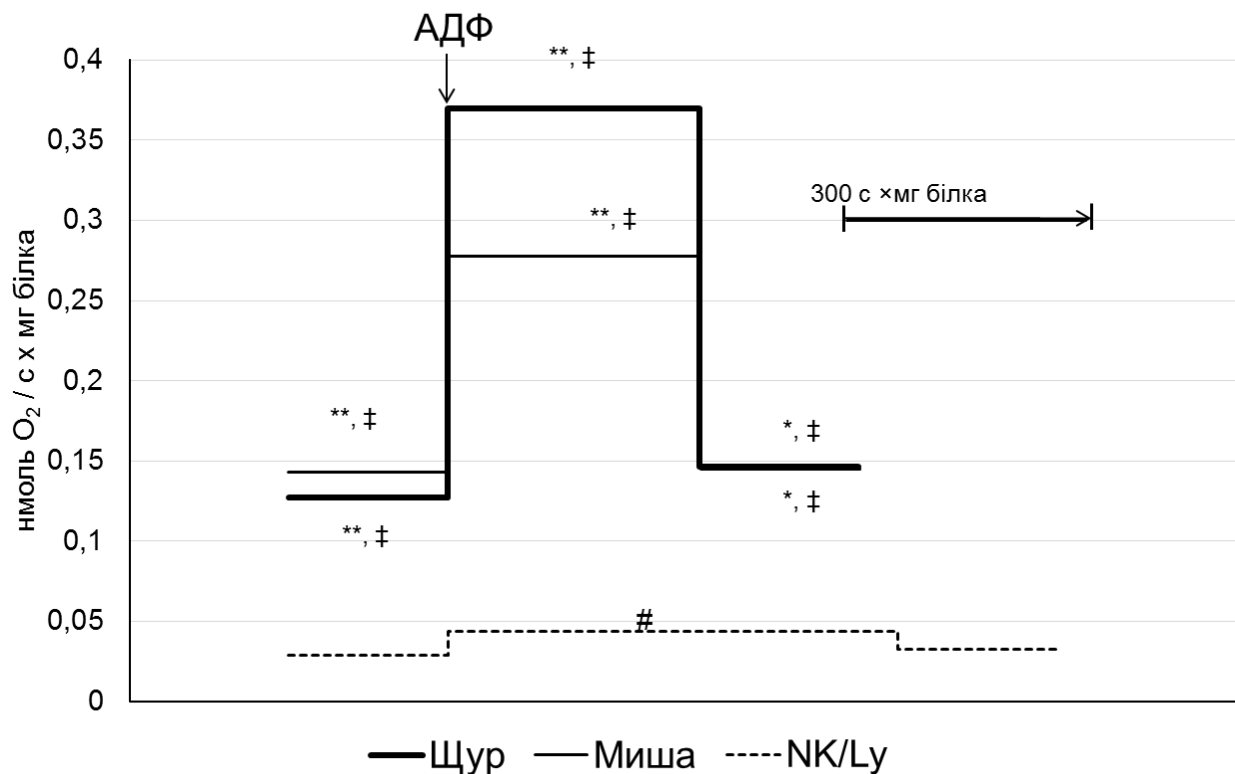
У цьому розділі порівнювали функціональну активність мітохондрій лімфоми з класичними об'єктами біоенергетичних досліджень - мітохондріями печінки щура і миші, за використання полярографічного методу. Мітохондрії печінки щура є класичним об'єктом дослідження енергетичних процесів і часто використовуються як контроль до мітохондрій інших органів з огляду на відсутність принципових структурних і функціональних відмінностей у "силових станціях" різних тканин і навіть видів [146]. Мітохондрії печінки миші є менш вивченими, але, на нашу думку, є навіть більш адекватними для порівняння з енергетичними процесами у мітохондріях лімфоми миші.



**Рис.3.5.** Швидкості дихання мітохондрій лімфоми, печінки щура і печінки миші за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. \* - статистично достовірна різниця порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; \*\*\* -  $p < 0,001$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,001$ . Наведено



усереднені значення швидкостей дихання,  $n = 5$ . Величини стандартних похибок наведені у табл.3.2.



**Рис.3.6.** Швидкості дихання мітохондрій лімфоми, печінки щура і печінки миші за окиснення сукцинату.\*\* - статистично достовірна різниця порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,01$ ;\*\*\* -  $p < 0,001$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,001$ . Величини стандартних похибок наведені у табл.3.2.

На рис. 3.5.та 3.6. наведені швидкості поглинання кисню мітохондріями клітин лімфоми NK/Ly, печінки щура і печінки миші за різних метаболічних станів за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (рис. 3.5) і сукцинату (рис. 3.6). Виявлено, що швидкість поглинання кисню мітохондріями лімфоми у трьох метаболічних станах була у 5-8 разів нижчою, порівняно з мітохондріями печінки миші ( $p < 0,05$ ) (за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату – на 223%, 547% і 349%; сукцинату – на 597%, 537% та 347%) і у 6-10 разів нижчою, порівняно з мітохондріями печінки щура( $p < 0,05$ ) (за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату – на 192%, 748% та 448%; сукцинату

– на 342%, 749% та 352%). За додавання АДФ спостерігали достовірне ( $p < 0,05$ ) зростання швидкості поглинання кисню в усіх зразках мітохондрій. Швидкість дихання мітохондрій печінки миші та щура за фосфорилування АДФ (у стані 3) була достовірно вищою як у разі окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, так і сукцинату. Також виявлена вища варіабельність швидкостей дихання мітохондрій лімфоми, порівняно з мітохондріями печінки (тест Фішера). Це може бути зумовлено вищою гетерогенністю мітохондрійної суспензії лімфоми (див. рис. 3.4), яка, можливо, пов'язана з одного боку з постійним ростом та проліферацією пухлинних клітин, а з іншого – з природніми процесами резистентності до злжкісної трансформації.

Таблиця 3.2

Швидкості поглинання кисню мітохондріями печінки миші та лімфоми NK/Ly в різних метаболічних станах за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Джерело мітохондрій →		Печінка щура	Печінка миші	Лімфома
V <sub>2</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,09±0,02**	0,10±0,01**	0,03±0,005
	сукцинат	0,13±0,02**‡	0,14±0,04**‡	0,03±0,002
V <sub>3</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,38±0,05***‡	0,26±0,03*‡	0,04±0,003
	сукцинат	0,37±0,07**‡	0,28±0,02**‡	0,04±0,004
V <sub>4</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,14±0,03**‡	0,11±0,02*‡	0,03±0,004
	сукцинат	0,15±0,03*‡	0,14±0,02*‡	0,03±0,004

Примітка. Одиниці швидкостей дихання наведено у нмоль O<sub>2</sub> / мг білка × с; \* -  $p < 0,05$  порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; \*\*\* -  $p < 0,001$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,05$ .

У таблиці 3.3. наведено показники дихального контролю в мітохондріях печінки миші, печінки щура та лімфоми NK/Ly. Дихальний контроль - це класичний показник у мітохондріології, модифіковані форми якого запропоновані Чансом, Бальчєфскі та Ларді [123]. Ці метаболічні показники опосередковано характеризують спряження процесів дихання і окисного фосфорилування. Отримані результати свідчать, що показники дихального контролю у мітохондріях мишей за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату достовірно не відрізнялися ( $p < 0,34$  за Ларді і  $p < 0,15$  за Чансом). Разом з тим, у мітохондріях лімфоми величини дихального контролю були достовірно нижчими у порівнянні з мітохондріями печінки миші тільки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (дихальний контроль за Ларді знизився на 44,5%, дихальний контроль за Чансом – на 29,1%), тоді як при порівнянні з мітохондріями печінки щура достовірна різниця була зафіксована при окисненні обох субстратів. (за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату дихальний контроль за Ларді знизився на 68,1%, дихальний контроль за Чансом – на 42,4%; за окиснення сукцинату дихальний контроль за Ларді знизився на 47,9%, дихальний контроль за Чансом – на 47,6%).

Таблиця 3.3.

Показники дихального контролю (ДК) у мітохондріях печінки щура, печінки миші та лімфоми NK/Ly за додавання  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) і сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Джерело мітохондрій	ДК ( $V_3/V_2$ )		ДК ( $V_3/V_4$ )	
	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Печінка щура	4,61 $\pm$ 0,72*	2,92 $\pm$ 0,37*	2,83 $\pm$ 0,15*	2,69 $\pm$ 0,32*
Печінка миші	2,65 $\pm$ 0,36*	2,12 $\pm$ 0,35	2,30 $\pm$ 0,12*	1,96 $\pm$ 0,15
Лімфома	1,47 $\pm$ 0,25	1,52 $\pm$ 0,09	1,63 $\pm$ 0,12	1,41 $\pm$ 0,17

Примітка. \* - статистично достовірна різниця порівняно з мітохондріями лімфоми,  $p < 0,05$ . КГ – 1 ммоль/л, СКЦ – 0,35 ммоль/л.

Безпосередньо про спряження дихання і фосфорилування свідчить інший показник – співвідношення АДФ/О [1, 3, 50], який відображає кількість кисню, що витрачається за фосфорилування доданого АДФ. Встановлено, що за окиснення сукцинату співвідношення АДФ/О у мітохондріях лімфоми було достовірно нижчим на 32,8% ( $p < 0,05$ ), ніж у мітохондріях печінки миші. Подібна відмінність спостерігалась і за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, однак вона не підтверджена статистично через високе значення стандартної похибки показника у мітохондріях лімфоми.

Таблиця 3.4.

Параметри окисного фосфорилування у мітохондріях печінки миші та лімфоми NK/Ly ( $M \pm m$ ) за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату.

Тканина, з якої виділяли мітохондрії →		Печінка щура	Печінка миші	Лімфома
АДФ/О	$\alpha$ -кетоглутарат	1,87±0,07*,#	1,33±0,12*	1,07±0,31
	сукцинат	1,42±0,07*	1,62±0,09**	1,09±0,07
$V_{\phi}$	$\alpha$ -кетоглутарат	1,40±0,18**,##	0,70±0,14*	0,09±0,03
	сукцинат	1,03±0,18**	0,90±0,11*	0,10±0,01
$T_{\phi}$	$\alpha$ -кетоглутарат	230±21,5**	245±20,1*	2779±363
	сукцинат	315±66,6	317±72,9	564±92,3

Примітка. Одиниці наведених параметрів: АДФ/О – у нмоль АДФ /нг-ат. О, швидкість фосфорилування ( $V_{\phi}$ ) - у нмоль АДФ/мг білка  $\times$  с, а час фосфорилування ( $T_{\phi}$ ) - у с  $\times$  мг білка.\* - статистично достовірна різниця порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; # -  $p < 0,05$  порівняно з мітохондріями печінки миші; ## -  $p < 0,01$  порівняно з мітохондріями печінки миші.

Стосовно мітохондрій печінки щура, то їхній параметр АДФ/О був достовірно вищий і за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (зростання на 75,2%), і за сукцинату (зростання на 30,3%). Ймовірною причиною цього явища є зниження експресії білка, що кодує  $\beta$ -білок субодиниці  $F_1$  АТФ-синтази, що було

встановлено для пухлинних клітин, зокрема, для людської карциноми [54, 112, 185], в результаті чого знижується відсоток функціонально активних молекул ферменту.

Виходячи із наведених вище даних, логічно було очікувати нижчу швидкість окисного фосфорилування ( $V_{\phi}$ ) в мітохондріях лімфоми порівняно з мітохондріями печінки, що було підтверджено розрахунками цього показника  $V_{\phi}$  (табл. 3.4.). В мітохондріях печінки щура за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату швидкість становила  $1,4 \pm 0,18$  нмоль АДФ/мг білка  $\times$  с, в мітохондріях печінки миші, вона була нижчою (на 50%), а у мітохондріях пухлинних клітин - на 93,6%, з достовірною різницею у порівнянні до двох попередніх груп. Подібну закономірність спостерігали і за окиснення сукцинату - мітохондрії лімфоми демонстрували нижчу швидкість окисного фосфорилування як супроти мітохондрій печінки щура (90,3%,  $p < 0,01$ ), так і мітохондрій печінки миші щура (88,9%,  $p < 0,05$ ).

Зміни часу фосфорилування ( $T_{\phi}$ ), які представлені на рис. 3.5, 3.6 і у табл. 3.4, свідчать, що за НАД-залежного окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату час фосфорилування у мітохондріях лімфоми майже у 10 разів більший, ніж у мітохондріях печінки. За окиснення сукцинату достовірної відмінності між часом фосфорилування у мітохондріях лімфоми порівняно з мітохондріями печінки миші та щура не виявлено.

Такі особливості енергетичних процесів у мітохондріях лімфоми можуть бути пов'язані із однією з основних характеристик пухлинних клітин - високою швидкістю проліферації. Швидкоростучі пухлини легко стають гіпоксійними внаслідок непристосованості судинної систем для постачання достатньої кількості кисню. Подібні умови, як правило, є летальними для нормальних клітин - проте пухлинні клітини уникають гіпоксійно-опосередкованої загибелі внаслідок зниженої експресії або мутації гену p53 [132], що виявлено для клітин NK/Ly [147]. Автори цих публікацій виявили підвищення експресії транскрипційного фактора E2F-1/2, сигнального каскаду MAPK та c-Мус, що передбачає інтенсивну проліферацію клітин на термінальній стадії розвитку.

Також було виявлено фрагментацію ДНК та відсутність експресії білка p53 та 3, 6 і 7 каспаз, що вказує на каспазо-незалежний тип апоптозу даних клітин [132]. Виявлено, що p53, який є транскрипційним активатором, може впливати на мітохондрійні процеси через синтез цитохром оксидази 2 (SCO2). Відповідно, нестача p53 може призвести до відтворення ефекту Варбурга, оскільки p53 регулює гліколітичні процеси через Akt та фосфогліцератмутазу [138].

Вважається, що через нездатність мітохондрій забезпечити достатню кількість АТФ для виживання за умов гіпоксії, пухлинні клітини активують гліколітичний шлях розщеплення глюкози. Це відбувається за підвищеної експресії відомого фактора, що індуктується гіпоксією [204, 205], і зумовлює ферментативний «зсув» енергетичного метаболізму від окисного фосфорилування в бік субстратного фосфорилування у процесі гліколізу [70]. Такий стан може бути зумовлений або потенційно низьким рівнем кисню в асцитній рідині внаслідок його обмеженого надходження і швидким використанням в процесі росту пухлини, або явищем псевдогіпоксії, спричиненої зниженням рівня супресорів пухлинного росту [109].

Стимуляція гліколізу, високий рівень якого характерний для клітин NK/Ly [154,155], і зниження ролі окисного фосфорилування може також відбуватися шляхом активації фосфоінозитидної 3-кінази (PI3K) та її подальшої мішені - Akt (також відомої як протеїнкіназа B). Активація Akt викликає збільшення розмірів клітин, підвищення активності гліколізу та обміну речовин, виживання клітин [159], і зазвичай спостерігається в злоякісно трансформованих ракових клітинах (Elstrom, 2004). Akt регулює гліколіз через пост-транскрипційні механізми, які включають посилене переміщення транспортера глюкози до клітинної поверхні і підтримку активності гексокінази без впливу зовнішніх факторів.

Індукція HIF-1 може бути викликана власне мітохондріями. Накопичення субстратів циклу Кребса у випадках пригнічення дихання мітохондрій у клітинах пухлини може слугувати сигналом для стимуляції гліколізу [80]. Виявлено, що сукцинат інгібує гідроксилазу HIF-1a, що призводить до стабілізації та активації HIF-1a. Накопичення сукцинату може відбуватись і в результаті інгібування

сукцинатдегідрогенази. Мутації цього ферменту беруть участь у формуванні спадкової схильності до утворення пухлин, тому сукцинатдегідрогеназу можна розглядати як класичний пухлинний супресор [34]. Аналогічний ефект стабілізації HIF-1а був описаний для лактату і пірувату.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що швидкості дихання мітохондрій мишиної лімфоми NK/Ly достовірно нижчі у порівнянні з мітохондріями печінки миші. Відмінності у швидкості поглинання кисню та швидкості фосфорилування у наших дослідах не залежали від енергетичного субстрату. Разом з тим, у мітохондріях клітин лімфоми зменшення показника дихального контролю і збільшення тривалості часу фосфорилування спостерігали тільки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Подібне до отриманих нами результатів спостереження було описане для мітохондрій карциноми Ерліха, швидкість окисного фосфорилування яких була нижчою порівняно із мітохондріями печінки щура [43, 88].

Наведені літературні дані безпосередньо чи опосередковано пояснюють те, що швидкість поглинання кисню мітохондріями печінки миші у різних метаболічних станах є вищою, ніж у мітохондрій клітин лімфоми NK/Ly за ФАД-, так і НАД-залежного окиснення субстратів. Окрім того, за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату в мітохондріях лімфоми дихальний контроль є нижчим, а час фосфорилування тривалішим, тоді як за окиснення сукцинату спостерігали тільки зниження співвідношення АДФ/О в порівнянні із мітохондріями печінки.

### **Підсумок**

За допомогою полярографічного методу встановлено, що ізольовані методом диференційного центрифугування мітохондрії лімфоми Немет-Келнера здатні синтезувати АТФ і цей процес є спряжений із окисненням енергетичних субстратів циклу Кребса  $\alpha$ -кетоглутаратом і сукцинатом. Швидкість дихання ізольованих мітохондрій лімфоми є суттєво повільнішою, ніж у мітохондріях печінки, незалежно від метаболічного стану чи субстрату окиснення. Інтенсивність та спряженість процесів окисного фосфорилування у мітохондріях

лімфоми є суттєво нижчими у мітохондріях лімфоми, ніж у мітохондріях печінки щура і миші. Показники дихання, окисного фосфорилування та спряженість цих процесів достовірно не відрізняються у мітохондріях печінки щура і миші незалежно від субстрату окиснення. Безумовно, ідеальним контролем до мітохондрій лімфоми були б мітохондрії здорових лімфоцитів. Однак, з огляду на обмеження у вигляді невеликого об'єму крові мишей чи щурів і невелику кількість мітохондрій у лімфоцитах технічно неможливо виділити достатню кількість мітохондрій для полярографічного дослідження. Р. П. Нарциссов та інші пропонують вивчати активність дегідрогеназ мітохондрій (зокрема сукцинатдегідрогенази) у мазках крові, забарвлених тетразолієм синім (патент RU 989364, 1981 р.). Такий експрес-метод дозволяє виявити зміни енергетичних процесів у новонароджених, і в майбутньому міг би бути використаний і в наших дослідженнях [108].

.....

1. Гренюх В. П. Порівняльна характеристика параметрів дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях лімфоми NK/Ly та печінки миші / В. П. Гренюх, М. Д. Луцик, Р. С. Стойка, А. М. Бабський. // *Studia Biologica*. – 2015. – №9. – С. 39–50.

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

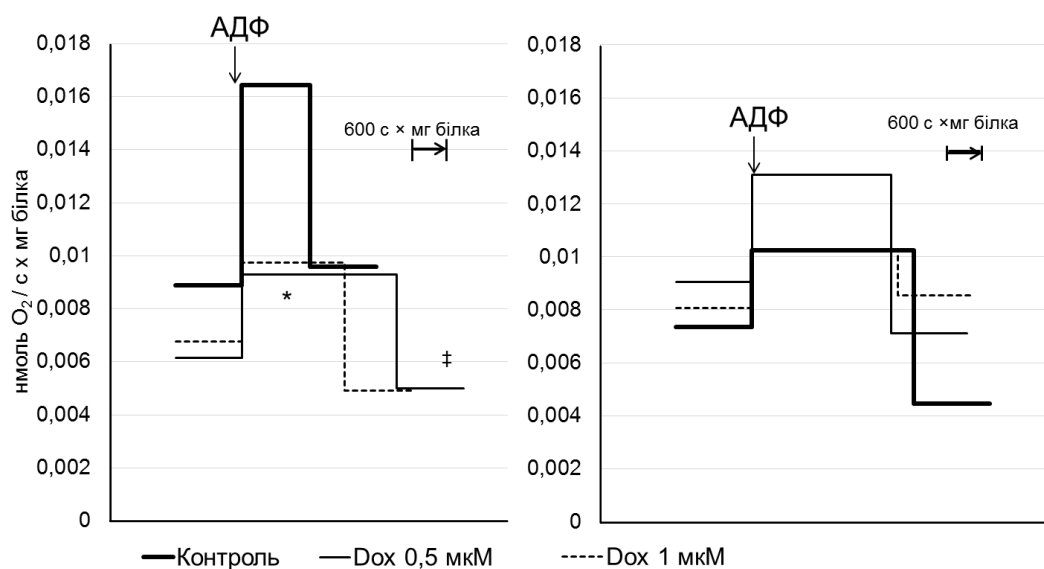


### **3.4. Вплив доксорубіцину на дихання і окисне фосфорилювання мітохондрій лімфоми NK/Ly**

Резистентність ракових клітин до хіміотерапії визначається енергетичним станом мітохондрій, інтенсивністю їхнього дихання та спряженням дихання і окисного фосфорилювання [58, 72]. Модуляція енергетичних параметрів пухлинних клітин за допомогою антиракових препаратів може мати хороші перспективи за лікування раку. Важливу роль у цьому відіграють мітохондрії залучені в апоптозні та вільнорадикальні процеси, а також до процесів енергозабезпечення та адаптації клітин до гіпоксії. Відомо, що ракові клітини надають перевагу гліколітичному типу метаболізму, навіть за достатнього забезпечення клітин киснем [77]. На сьогодні мітохондрії пропонуються як важлива мішень за розробки нових хіміотерапевтичних препаратів, зокрема через їхнє безпосереднє відношення до апоптозу [78, 79].

Для тестування різних протипухлинних препаратів на мітохондріях печінки і лімфоми були вибрані як відомі так і нові хіміотерапевтичні препарати, які щойно розробляються. В усіх полярографічних пробах препарати додавались безпосередньо в комірку в концентраціях близьких до LD<sub>50</sub> чи LD<sub>75</sub> практично без попередньої інкубації з мітохондріями. Об'єм добавок препаратів був малим (10 – 20 мкл) і не впливав на загальний об'єм проби і на концентрацію інгредієнтів середовища інкубації (субстратів, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, АДФ та ін.) з огляду на фіксований об'єм полярографічної комірки (1,4 мл).

Антибіотик доксорубіцин (адриаміцин), що відомий з 60-х років ХХ століття, належить до найпоширеніших протипухлинних препаратів, проте йому притаманні такі властивості, як кардіотоксичність та накопичення мітохондрій [101]. У таблиці 3.5. та рис. 3.7 наведено швидкості дихання мітохондрій лімфоми за впливу доксорубіцину.



**Рис.3.7.** Швидкості дихання мітохондрій лімфоми за впливу доксорубіцину (Dox) за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (ліворуч) та сукцинату (праворуч). \* -  $p < 0,05$  порівняно з мітохондріями NK/Ly; ‡ - статистично достовірні різниці за тестом Фішера порівняно з мітохондріями NK/Ly,  $p < 0,001$ . Величини стандартних похибок наведені у табл.3.5.

За додавання доксорубіцину до мітохондрій (кінцева концентрація у комірці 0,5 мкмоль/л) спостерігали зниження швидкості дихання у 3 метаболічному стані (з  $0,016 \pm 0,003$  нмоль  $O_2$  / с x мг білка. – до  $0,009 \pm 0,002$  нмоль  $O_2$  / с x мг білка.), порівняно з контрольними параметрами, за окиснення НАД-залежного субстрату. Слід зазначити, що доксорубіцин достовірно збільшував варіабельність  $V_4$ , про що засвідчив тест Фішера. За окиснення ФАД-залежного субстрату змін швидкостей дихання виявлено не було, незалежно від концентрації препарату, що свідчить про вплив доксорубіцину саме на перший комплекс дихального ланцюга. Це узгоджується з літературними даними, адже доксорубіцин здійснює свій вплив не тільки як ДНК-інтеркалюючий агент, але й як потужний генератор активних форм кисню за окиснення убісеміхінону [202].

Таблиця 3.5

Швидкості поглинання кисню мітохондріями лімфоми НК/Лу в різних метаболічних станах за впливу доксорубіцину за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

		Контроль	Доксорубіцин 0,5 мкмоль/л	Доксорубіцин 1 мкмоль/л
V <sub>2</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,009 $\pm$ 0,002	0,006 $\pm$ 0,002	0,007 $\pm$ 0,003
	сукцинат	0,007 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,008 $\pm$ 0,002
V <sub>3</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,016 $\pm$ 0,003	0,009 $\pm$ 0,002*	0,010 $\pm$ 0,003
	сукцинат	0,010 $\pm$ 0,001	0,013 $\pm$ 0,001	0,010 $\pm$ 0,003
V <sub>4</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,016 $\pm$ 0,001	0,005 $\pm$ 0,001‡	0,005 $\pm$ 0,002‡
	сукцинат	0,004 $\pm$ 0,001	0,007 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,002

Примітка. Одиниці швидкості наведено у нмоль O<sub>2</sub> / с  $\times$ мг білка; \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з мітохондріями НК/Лу,  $p < 0,05$

Таблиця 3.6.

Показники дихального контролю (ДК) у мітохондріях НК/Лу за впливу доксорубіцину за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) та сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

	ДК (V <sub>3</sub> /V <sub>2</sub> )		ДК (V <sub>3</sub> /V <sub>4</sub> )	
	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Контроль	2,09 $\pm$ 0,36	1,41 $\pm$ 0,10	2,04 $\pm$ 0,71	2,81 $\pm$ 0,48
Доксорубіцин 0,5 мкмоль/л	2,42 $\pm$ 1,00	1,43 $\pm$ 0,07	2,01 $\pm$ 0,26	2,05 $\pm$ 0,47
Доксорубіцин 1 мкмоль/л	2,44 $\pm$ 0,81	1,29 $\pm$ 0,09	2,24 $\pm$ 0,33	1,37 $\pm$ 0,24*

Кількісні параметри дихального контролю (табл 3.6) були знижені тільки за впливу вищої дози препарату (1 мкмоль/л) за окиснення сукцинату з  $2,81 \pm 0,48$  відносних одиниць до  $1,37 \pm 0,24$ . За інших комбінацій дози та субстратів дихальний контроль не змінювався, що могло свідчити про відносну стабільність спряження процесів дихання і окисного фосфорилування за цих умов. Оскільки дихальний контроль також опосередковано свідчить про цілісність та інтактність внутрішньої мембрани мітохондрій, то можна припустити, що доксорубіцин не пошкоджує значним чином мітохондрійну мембрану клітин NK/Ly, на відміну від кардіоміоцитів, в яких після впливу препарату зафіксовані мембранні порушення [40].

Аналіз впливу доксорубіцину на процеси окисного фосфорилування наведено у табл. 3.7. Як видно, доксорубіцин не змінював ні ефективність, ні швидкість окисного фосфорилування, оскільки параметри АДФ/О, швидкість та час фосфорилування не змінювалися ні за концентрації доксорубіцину 0,5 мкмоль/л, ні за 1 мкмоль/л.

Таблиця 3.7.

Параметри окисного фосфорилування у мітохондріях NK/Ly за впливу доксорубіцину ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

		Контроль	Доксорубіцин 0,5 мкмоль/л	Доксорубіцин 1 мкмоль/л
АДФ/О	$\alpha$ -кетоглутарат	$2,07 \pm 0,51$	$1,26 \pm 0,49$	$2,04 \pm 0,59$
	сукцинат	$1,05 \pm 0,31$	$0,92 \pm 0,26$	$1,07 \pm 0,22$
$V_{\phi}$	$\alpha$ -кетоглутарат	$0,07 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
	сукцинат	$0,02 \pm 0,005$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,005$
$T_{\phi}$	$\alpha$ -кетоглутарат	$1540 \pm 663$	$3508 \pm 880$	$2330 \pm 694$
	сукцинат	$3200 \pm 703$	$2750 \pm 588$	$2883 \pm 878$

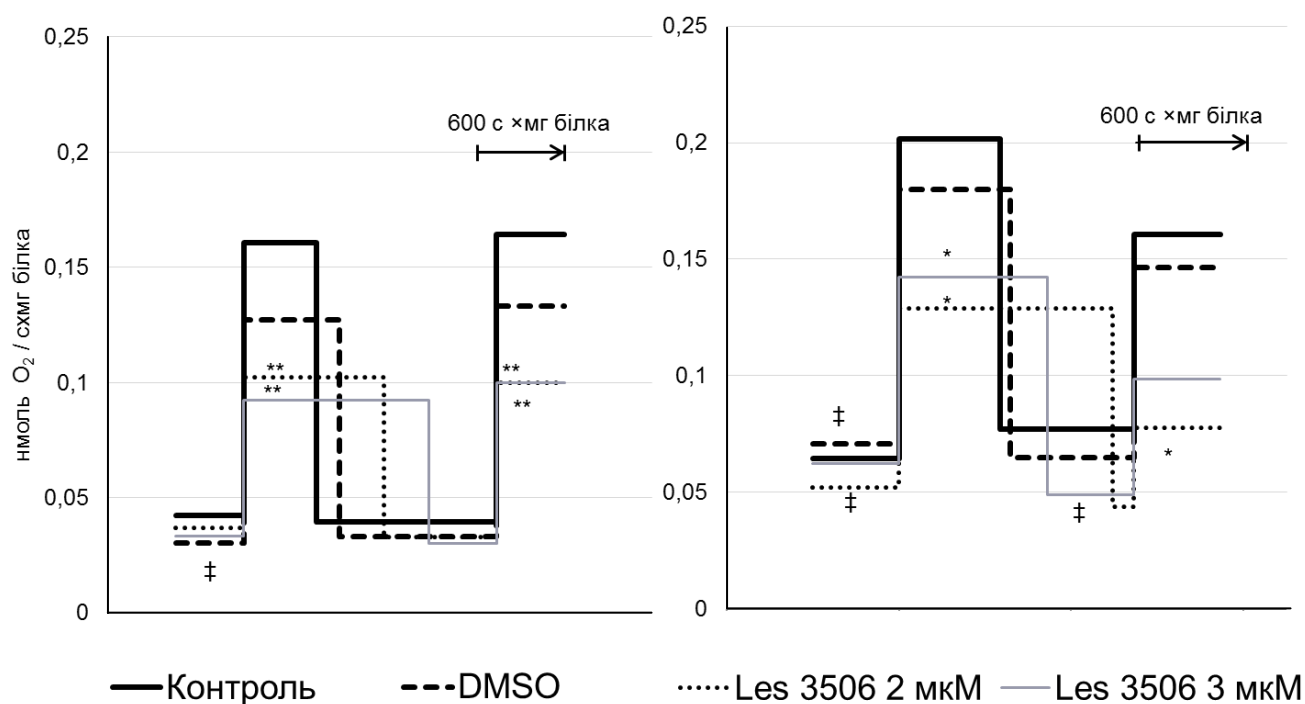
Примітка. Одиниці наведених параметрів: АДФ/О – у нмоль АДФ / нг-ат. О, швидкість фосфорилування ( $V_{\phi}$ ) - у нмоль АДФ / мг білка  $\times$  с, а час фосфорилування ( $T_{\phi}$ ) - у с  $\times$  мг білка.

## **Підсумок**

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

### 3.5. Вплив Les 3506 на дихання і окисне фосфорилювання мітохондрій печінки щура

Важливою проблемою використання протипухлинних препаратів є їхні побічні негативні ефекти на нормальні клітини, зокрема на клітини печінки. Це може стосуватися і новосинтезованого ізатинвмісного похідного 4-тіазолідинонів препарату Les 3506 (3106). Препарат був синтезований і люб'язно наданий в.о. завідувача кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, доктором фарм. наук Лесиком Романом Богдановичем. Препарати даної групи володіють активною протипухлинною дією, яка була встановлена на різних лініях ракових клітин [25]. У наших експериментах було досліджено вплив препарату Les 3506 *in vitro* на енергетичні процеси мітохондрій печінки щура.



**Рис.3.8** Швидкості дихання мітохондрій печінки за впливу Les 3506 за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату. \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем. Стандартні похибки див. у табл. 3.8.

На рис. 3.8 і у таблиці 3.8. наведено швидкості дихання мітохондрій печінки за впливу Les 3506. Виявлено, що досліджувана речовина статистично достовірно інгібувала швидкість стимульованого дихання мітохондрій – як при стимуляції за додавання АДФ, так і за додавання FCCP, протонифору мітохондрійної мембрани, який розпрямлює процеси дихання та окисного фосфорилування. Отримані результати свідчать про інгібуючий вплив препарату на дихальний ланцюг мітохондрій печінки, незалежно від субстрату окиснення

Таблиця 3.8.

Швидкості поглинання кисню мітохондріями печінки щура в різних метаболічних станах за впливу Les 3506 за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

		Контроль	Контроль + DMSO	Les 3506 2 мкмоль/л	Les 3506 3 мкмоль/л
V <sub>2</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,002
	Сукцинат	0,06 $\pm$ 0,002	0,07 $\pm$ 0,01‡	0,05 $\pm$ 0,01‡	0,06 $\pm$ 0,004
V <sub>3</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,16 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02*	0,09 $\pm$ 0,01*
	Сукцинат	0,20 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,03*	0,14 $\pm$ 0,01*
V <sub>4</sub>	$\alpha$ -кетоглутарат	0,04 $\pm$ 0,005	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,004
	Сукцинат	0,08 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,003‡
V <sub>FCCP</sub>	кетоглутарат	0,16 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02*	0,10 $\pm$ 0,01*
	Сукцинат	0,16 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01*	0,10 $\pm$ 0,02‡

Примітка. Одиниці швидкості наведено у нмоль O<sub>2</sub> / с  $\times$  мг білка; \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p < 0,05$

Було обчислено також і показники дихального контролю (рис. 3.9). За окиснення кетоглутарату зміни не були зафіксовані ні за впливу DMSO –

розчинника Les 3506, ні за обох концентрацій протипухлинної речовини. При окисненні сукцинату було виявлено зниження дихального контролю за Ларді за концентрації Les 3506 3 мкмоль/л.

Таблиця 3.9.

Показники дихального контролю (ДК) у мітохондріях печінки щура за впливу Les 3506 за додавання  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) та сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

	ДК ( $V_3/V_2$ )		ДК ( $V_3/V_4$ )	
	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Контроль	4,09 $\pm$ 0,58	3,11 $\pm$ 0,18	4,30 $\pm$ 0,75	2,80 $\pm$ 0,40
Контроль+DMSO	4,37 $\pm$ 0,47	2,54 $\pm$ 0,13	4,08 $\pm$ 0,53	3,14 $\pm$ 0,50
Les 3506 2 мкмоль/л	3,70 $\pm$ 1,04	2,64 $\pm$ 0,33	3,34 $\pm$ 0,34	3,09 $\pm$ 0,45
Les 3506 3 мкмоль/л	2,78 $\pm$ 0,38	2,33 $\pm$ 0,17	3,27 $\pm$ 0,71*	2,94 $\pm$ 0,18

Примітка. \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

На рис. 3.10 наведено параметри спряження та інтенсивності окисного фосфорилювання мітохондрій печінки. Як видно, Les 3506 не змінював достовірно роботу АТФ-синтетази, оскільки співвідношення АДФ/О не змінювались за різних комбінацій концентрації препарату чи субстратів. Однак, швидкості фосфорилювання АДФ достовірно сповільнювались за окиснення і НАД-, і ФАД-залежного субстратів. Так за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату швидкість фосфорилювання достовірно знизилася щодо контролю – на 44,7% за нижчої дози препарату, і на 50% - за вищої. Схожу картину спостерігали за присутності сукцинату як окисного субстрату: Les 3506 за концентрації 3 мкмоль/л знижував швидкість фосфорилювання на 34,3% щодо контрольної проби.

Відповідно, час фосфорилювання теж змінився – за концентрації Les 3506 2 мкмоль/л та окиснення кетоглутарату час зріс від 535 $\pm$ 26,0 с $\times$ мг білка до



1032±173 с×мг білка (92,9%), а за концентрації Les 3506 3 мкмоль/л та окиснення сукцинату - від 590±60,0 с×мг білка до 864±42,7 с × мг білка (46,4%). Інші зміни часу фосфорилування достовірними не були.

Таблиця 3.10.

Параметри окисного фосфорилування у мітохондріях печінки щура за впливу Les 3506 за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату та сукцинату ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

		Контроль	Контроль+ DMSO	Les 3506 2 мкмоль/л	Les 3506 3 мкмоль/л
АДФ/О	$\alpha$ -кетоглутарат	1,19±0,08	1,18±0,10	1,05±0,08	1,00±0,14
	сукцинат	0,87±0,05	0,92±0,05	0,82±0,06	0,82±0,01
$V_{\phi}$	$\alpha$ -кетоглутарат	0,38±0,02	0,29±0,03	0,21±0,04*	0,19±0,04*
	сукцинат	0,35±0,03	0,32±0,03	0,22±0,06	0,23±0,01*
$T_{\phi}$	$\alpha$ -кетоглутарат	535±26,0	705±82,0	1032±173*	1359±486
	сукцинат	590±60,0	646±65,1	1240±354	864±42,7*

Примітка. Одиниці наведених параметрів: АДФ/О – у нмоль АДФ /нг-ат. О, швидкість фосфорилування ( $V_{\phi}$ ) - у нмоль АДФ/мг білка × с, а час фосфорилування ( $T_{\phi}$ ) - у с × мг білка. \* -  $p < 0,05$  порівняно з контролем,

Результати порівняльного аналізу енергетичних параметрів контрольних мітохондрій печінки за додавання у полярографічну комірку сукцинату і  $\alpha$ -кетоглутарату слугують підтвердженням відмінностей низки енергетичних показників за окиснення цих субстратів [3, 14]. Швидкості дихання контрольних мітохондрій у всіх метаболічних станах 2 і 4 були трохи вищими за окиснення сукцинату. Співвідношення АДФ/О було на 35-40% вищим за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Оскільки швидкості дихання у метаболічних станах 2 і 4 достовірно не відрізнялись дихальні контролі як за Ларді ( $V_3/V_2$ ) так і за Чансом ( $V_3/V_4$ ) за окиснення обох субстратів також не відрізнялись. Ці факти, а також доволі високі як для непромитих інтактних мітохондрій дихальні контролі (3,5 – 4), опосередковано засвідчують повну відновлюваність переносників електронів у

дихальному ланцюгу після фосфорилування доданого у комірку АДФ і функціональну цілісність мітохондріальних мембран виділених органел.

### **Підсумок**

Для протипухлинного препарату групи 4-тіазолідинонів Les характерна інгібуюча дія на функціонування дихального ланцюга мітохондрій печінки і швидкість синтезу АТФ, що ставить під сумнів можливість його фармакологічного застосування, у зв'язку з можливою гепатотоксичністю даної речовини. Проте рівень токсичності препарату на рівні організму потребує додаткового дослідження.

.....

Гренюх В., Чумак В., Стойка Р., Бабський А. Вплив Les 3106 на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура // Актуальні питання сучасної біології, Львів, 2–3 жовтня, 2014 р. : тези доп. – Львів, 2014. – С. 169.

### **3.6. Вплив ландоміцину А на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly і печінки щура**

Результати представлені у попередніх розділах свідчать, що активні протипухлинні препарати інгібують дихання та окисне фосфорилування як у мітохондріях лімфоми (доксорубіцин), так і у мітохондріях печінки (Les). Наступним етапом досліджень було вивчення впливу нового протипухлинного препарату ландоміцину А, як на мітохондрії лімфоми Немет-Келнера, так і мітохондрії печінки щура.

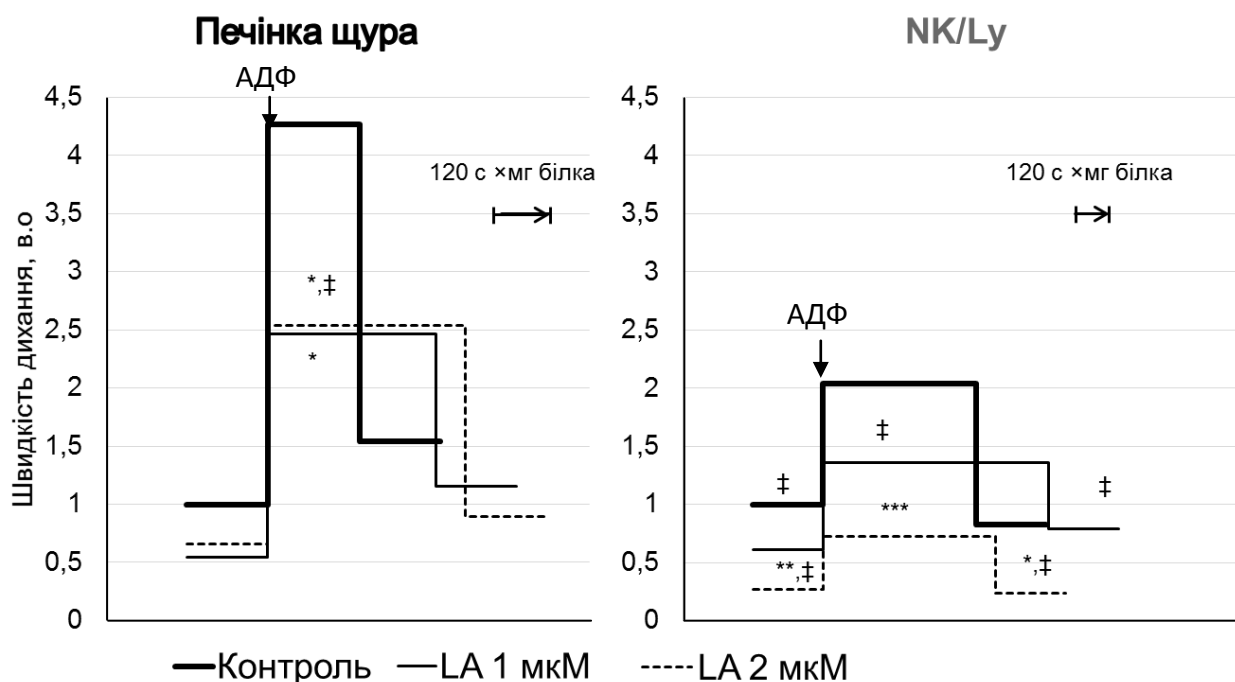
Антибіотики групи ландоміцинів (родина ангуциклінів) використовують як антиракові препарати через яскраво виражені проапоптичні та прооксидативні властивості [115, 116, 153]. Ландоміцину А притаманна найбільша активність порівняно з речовинами свого класу. Проте досі не відомо, як саме цей препарат впливає на біоенергетичні параметри мітохондрій. Тому метою цього розділу роботи було дослідити вплив ландоміцину А на параметри дихання і окисного фосфорилування мітохондрій печінки щура і лімфоми NK/Ly.

На рис. 3.9. і табл. 3.11 наведено швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми ( $V_2$ ,  $V_3$  і  $V_4$ ) у метаболічних станах 2, 3 і 4 за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату без (Контроль) і за додавання у полярографічну комірку 1 і 2 мкмоль/л ландоміцину А. За цих умов ландоміцин А в обох концентраціях не змінював швидкість  $V_2$  мітохондрій печінки. Як видно рис. 3.5. і табл. 3.7 препарат достовірно ( $p < 0,05$ ) інгібував швидкість дихання на 40 – 42 % в активному метаболічному стані ( $V_3$ ) і цей ефект спостерігали за дії обох доз препарату. Натомість ландоміцин А достовірно не впливав на швидкість контрольованого дихання  $V_4$  мітохондрій печінки.

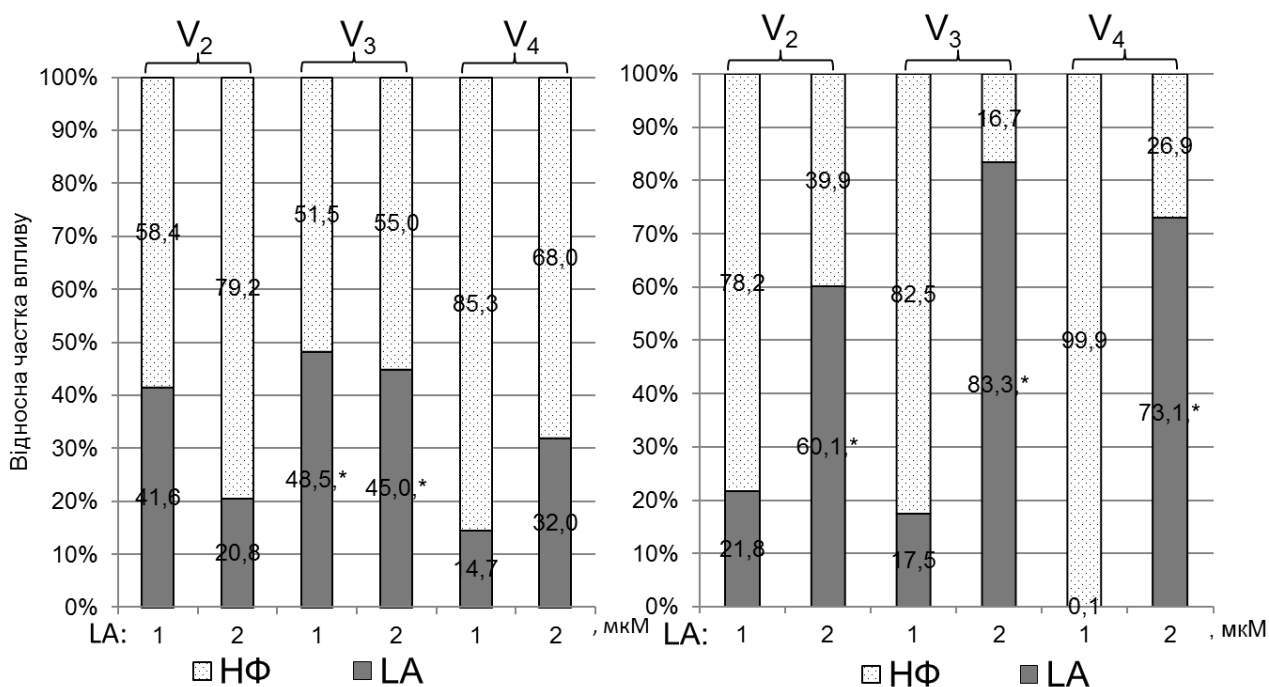
У мітохондріях лімфоми за впливу ландоміцину А ми спостерігали трохи інший ефект препарату. Цей препарат достовірно інгібував дихання у всіх метаболічних станах за концентрації 2 мкмоль/л, на 33,4% і 64,6% відповідно. За концентрації 1 мкмоль/л одержані зміни не були статистично достовірними. Слід зазначити, що додавання ландоміцину А достовірно збільшувало варіабельність

досліджуваних показників, про що свідчить тест Фішера, як у мітохондріях печінки, так і лімфоми (рис 3.10).

Нами було проведено дисперсійний аналіз частки впливу ландоміцину А на енергетичні процеси у мітохондріях. Отримані результати представлені у попередніх розділах свідчать на вагомий вплив препарату на зниження швидкостей дихання мітохондрій (рис. 3.10). Як видно, за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату частка впливу ландоміцину  $V_3$  становила 48,5% (1 мкмоль/л) і 45,0% (2 мкмоль/л). У мітохондріях НК/Лу частка впливу 2 мкмоль/л ландоміцину була достовірною і більш вираженою у всіх метаболічних станах: 60,1% ( $V_2$ ), 83,3% ( $V_3$ ), 73,1% ( $V_4$ ). Це свідчить про вищу чутливість мітохондрій лімфоми до дії протипухлинного препарату за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату.

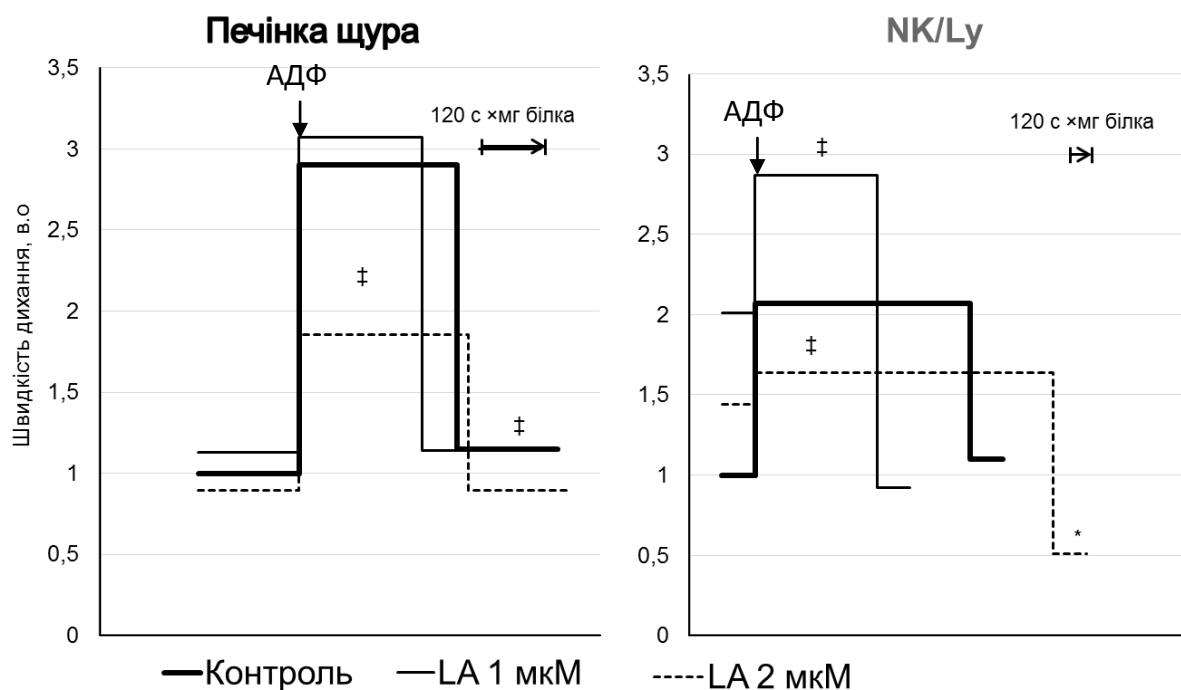


**Рис. 3.9.** Швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за додавання ландоміцину А (LA) і окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Наведено усереднені дані ( $n=5$ ). За одиницю взято значення  $V_2$  контролю. \* -  $p<0,05$  порівняно з контролем; \*\* -  $p<0,01$  порівняно з контролем; \*\*\* -  $p<0,001$  порівняно з контролем; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p<0,05$  Стандартні похибки – див. у табл. 3.11.

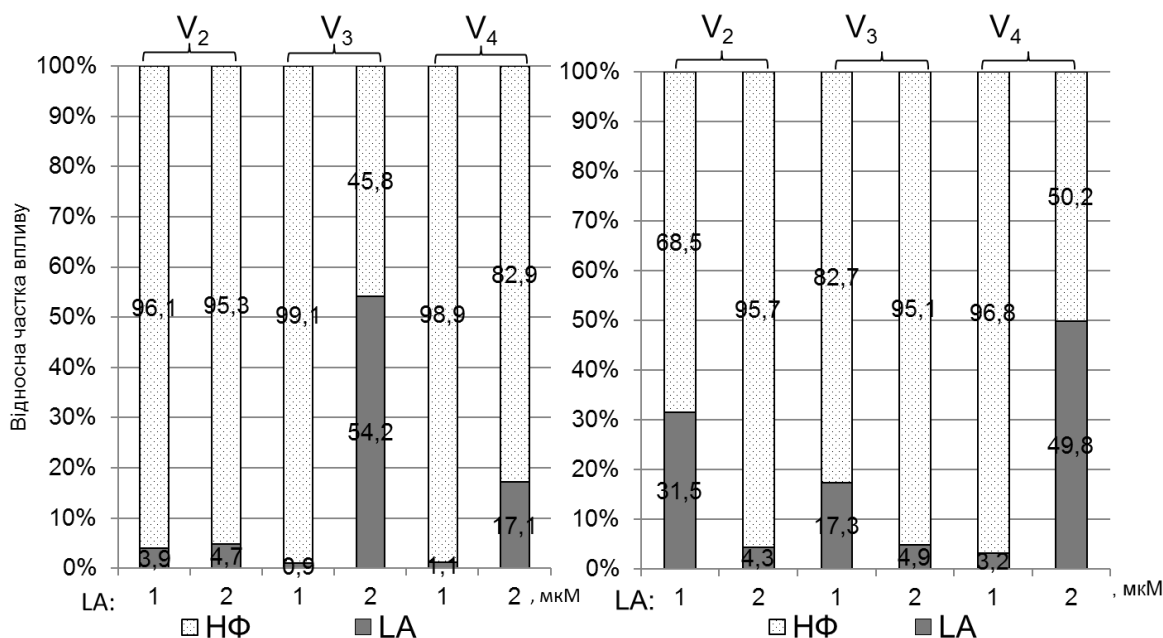


**Рис. 3.10.** Відносна частка впливу ландоміцину А (LA) на зміни швидкостей дихання за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, розрахована методом ANOVA. НФ – частка неврахованих факторів. \* -  $p < 0.05$ .

На рис. 3.9. і табл. 3.11. наведено швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у метаболічних станах 2, 3 і 4 за окиснення сукцинату без (Контроль) і за додавання у полярографічну комірку ландоміцину А. Як видно (рис 3.9)., за окиснення ФАД-залежного субстрату єдиним показником, який мав тенденцію до зниження ( $P < 0,12$ ) була швидкість  $V_3$  мітохондрій печінки після додавання 2 мкмоль/л препарату. Усі інші швидкості дихання за окиснення сукцинату не змінювались, що було підтверджено і дисперсійним аналізом (рис 3.10). Таким чином, можна припустити вибірковий інгібуючий ефект ландоміцину А на перший комплекс дихального ланцюга у мітохондрій.



**Рис. 3.11.** Швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за додавання ландоміцину А (LA) за окиснення сукцинату. Наведено усереднені дані (n=5). За одиницю взято значення  $V_2$  контролю. Стандартні похибки – див. у табл. 3.7. ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p < 0,05$



**Рис. 3.12.** Відносна частка впливу ландоміцину А (LA) на зміни швидкостей дихання, розрахована методом ANOVA. НФ – частка неврахованих факторів.\* -  $p < 0,05$ .

Таблиця 3.11.

Швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за додавання ландоміцину А (LA) за додавання  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) та сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

	$V_2$		$V_3$		$V_4$	
	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Мітохондрії печінки						
Контроль	0,09±0,02	0,13±0,02	0,38±0,05	0,37±0,07	0,14±0,03	0,15±0,03
LA 1 ммоль/л	0,05±0,01	0,14±0,02	0,22±0,02	0,39±0,03	0,10±0,01	0,15±0,03
LA 2 ммоль/л	0,06±0,01	0,11±0,01	0,23±0,03	0,24±0,01	0,08±0,01	0,11±0,01
Мітохондрії лімфоми						
Контроль	0,03±0,01	0,01±0,01	0,07±0,01	0,02±0,003	0,03±0,004	0,01±0,00 2
LA 1 ммоль/л	0,02±0,01	0,02±0,01	0,05±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01	0,01±0,00 4
LA 2 ммоль/л	0,01±0,002	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	0,01±0,001	0,01±0,00 2

Примітка. Одиниці швидкості наведено у  $\text{нмоль O}_2 / \text{с} \times \text{мг білка}$ . \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$  порівняно з контролем; \*\*\* -  $p < 0,001$  порівняно з контролем; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p < 0,05$

З метою підтвердження цього припущення нами було обчислено значення дихальних контролів, АДФ/О, швидкості і часу фосфорилування. Ці параметри дозволяють комплексно оцінити ступінь спряження процесів дихання і окисного фосфорилування. Як видно із табл 3.8, додавання ландоміцину А не спричинило

достовірних змін цих параметрів, незалежно не тільки від доданої в комірку дози препарату (1 чи 2 мкмоль/л) і субстрату окиснення (кетоглутарату чи сукцинату), а й навіть типу мітохондрій (печінки щура чи лімфоми миші).

Таблиця 3.12.

Показники дихальних контролів у мітохондріях печінки та NK/Ly за впливу ландоміцину А за додавання  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) та сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

		ДК ( $V_3/V_2$ )		ДК ( $V_3/V_4$ )	
		КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Мітохондрії печінки	Контроль	4,61±0,72	2,83±0,15	2,92±0,37	2,69±0,32
	LA 1 ммоль/л	4,78±0,54	2,86±0,48	2,16±0,21	2,96±0,39
	LA 2 ммоль/л	4,41±0,73	2,20±0,16	3,10±0,67	2,52±0,25
Мітохондрії лімфоми	Контроль	2,37±0,52	2,95±0,81	2,72±0,51	2,04±0,46
	LA 1 ммоль/л	2,13±0,25	1,53±0,24	2,21±0,35	4,12±0,92
	LA 2 ммоль/л	2,78±0,44	1,38±0,25	3,06±0,23	3,10±1,12

Безпосередньо про спряження дихання і фосфорилування свідчить співвідношення АДФ/О [49]. Цей показник відображає кількість кисню, яка витрачається на фосфорилування доданої АДФ. Дані про вплив ландоміцину А на АДФ/О представлені у таблиці 3.13. Видно, що за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату АДФ/О достовірно знижувався порівняно з контролем на 13% ( $P < 0,02$ ) за додавання ландоміцину А в концентрації 1 мкмоль/л, і на 17% за додавання 2 мкмоль/л ландоміцину А ( $p < 0,05$ ). За окиснення сукцинату значення АДФ/О у мітохондріях печінки щура навпаки зростало, проте ці зміни були тільки близькі до показників достовірності ( $p < 0,12$ ), що 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 впливу препарату на АТФ-синтетазу



Таблиця 3.13.

Параметри окисного фосфорилування у мітохондріях НК/Ly за впливу доксорубіцину за додавання  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) та сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

	АДФ/О		$V_{\phi}$		$T_{\phi}$	
	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Мітохондрії печінки						
Контроль	1,87±0,07	1,42±0,07	1,40±0,18	1,04±0,19	230±21,5	315±66,4
LA 1 ммоль/л	1,58±0,03*	1,48±0,05	0,70±0,07*	1,19±0,13	420±30,2*	245±28,5
LA 2 ммоль/л	1,55±0,11*	1,86±0,21	0,63±0,08*	0,88±0,12	490±89,7*	338±39,0
Мітохондрії лімфоми						
Контроль	0,90±0,28	0,91±0,37	0,12±0,05	0,05±0,03	654±173	1930±480
LA 1 ммоль/л	1,38±0,49	1,82±1,06	0,08±0,02	0,07±0,02	965±225	1094±549
LA 2 ммоль/л	1,74±0,36	1,30±0,76	0,08±0,01	0,03±0,02	737±130	2683±1245

Примітка. Одиниці наведених параметрів: АДФ/О – у нмоль АДФ / нг-ат. О, швидкість фосфорилування ( $V_{\phi}$ ) - у нмоль АДФ / мг білка  $\times$  с, а час фосфорилування ( $T_{\phi}$ ) - у с  $\times$  мг білка. КГ – 1 ммоль/л, СКЦ – 0,35 ммоль/л

Вплив ландоміцину А на мітохондрії печінки щура був виявлений і за аналізу швидкості фосфорилування АДФ, яка відображає швидкість роботи АТФ-синтази у внутрішній мембрані мітохондрій. В контрольних мітохондрій печінки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату швидкість становила 1,4±0,18 нмоль АДФ/(мг білка $\times$ с), а за додавання препарату вона сповільнювалась практично вдвічі – до 0,7±0,08 нмоль АДФ/(мг білка $\times$ с) за 1 мкмоль/л ландоміцину А і до 0,63±0,08 нмоль АДФ/(мг білка $\times$ с) за 2 мкмоль/л досліджуваної речовини (табл 3.13.) За

окиснення сукцинату швидкість фосфорилування у контролі становила  $1,42 \pm 0,07$  нмоль АДФ/нг-ат.О і достовірно не змінювалася за додавання препарату. Як і у попередньому випадку, ми спостерігали відсутність змін у мітохондріях лімфоми – як за  $\alpha$ -кетоглутарату ( $0,12 \pm 0,05$  нмоль АДФ/нг-ат.О), так і за сукцинату ( $0,05 \pm 0,03$  нмоль АДФ/нг-ат.О)

Слід зазначити, що зміни часу фосфорилування були обернено пропорційні до змін  $V_f$ .  $T_f$  відображає тривалість метаболічного стану 3. За окиснення НАД-залежного субстрату час фосфорилування у мітохондріях печінки зріс з  $230 \pm 21,5$  с  $\times$  мг білка (контроль) до  $417 \pm 30,2$  с  $\times$  мг білка (1 мкмоль/л ландоміцину А) і до  $490 \pm 89,7$  с  $\times$  мг білка (2 мкмоль/л ландоміцину А), тоді як у мітохондріях лімфоми контроль ( $654 \pm 173$  с  $\times$  мг білка) та дослідні значення згідно критерію Стюдента не відрізнялися. За окиснення сукцинату достовірних змін порівняно з контролем мітохондрій печінки ( $315 \pm 66,3$  с  $\times$  мг білка) та лімфоми ( $1930 \pm 480$  с  $\times$  мг білка) за дії обох концентрацій ландоміцину не спостерігали. Таким чином, зміни показника часу фосфорилування підтвердили інгібуючу роль ландоміцину на інтенсивність окисного фосфорилування.

### **Підсумок**

Ландоміцин А достовірно знижував швидкість дихання у метаболічному стані 3 та параметри спряження дихання і окисного фосфорилування у мітохондріях печінки за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату. За окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату ландоміцин А викликав тенденцію до змін, що були реципрокними до змін за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (найбільш виражено для АДФ/О). Раніше, реципрокність окиснення сукцинату і  $\alpha$ -кетоглутарату була виявлена за дії відповідно, адреналіну та ацетилхоліну, на мітохондріях печінки і серця щура [2, 6]. Однак, реципрокність дії ландоміцину А за окиснення НАД- і ФАД-залежних субстратів ще потребує додаткових досліджень. Отже, антибіотик ландоміцин А пригнічував енергетичні процеси у мітохондріях як лімфоми, так і печінки щура за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, але не сукцинату.

.....

1. Гренюх В., Легка Л., Єлісеєва О., Панчук Р., Стойка Р., Бабський А. Вплив ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2015. – Т. 69. – С. 49-56.

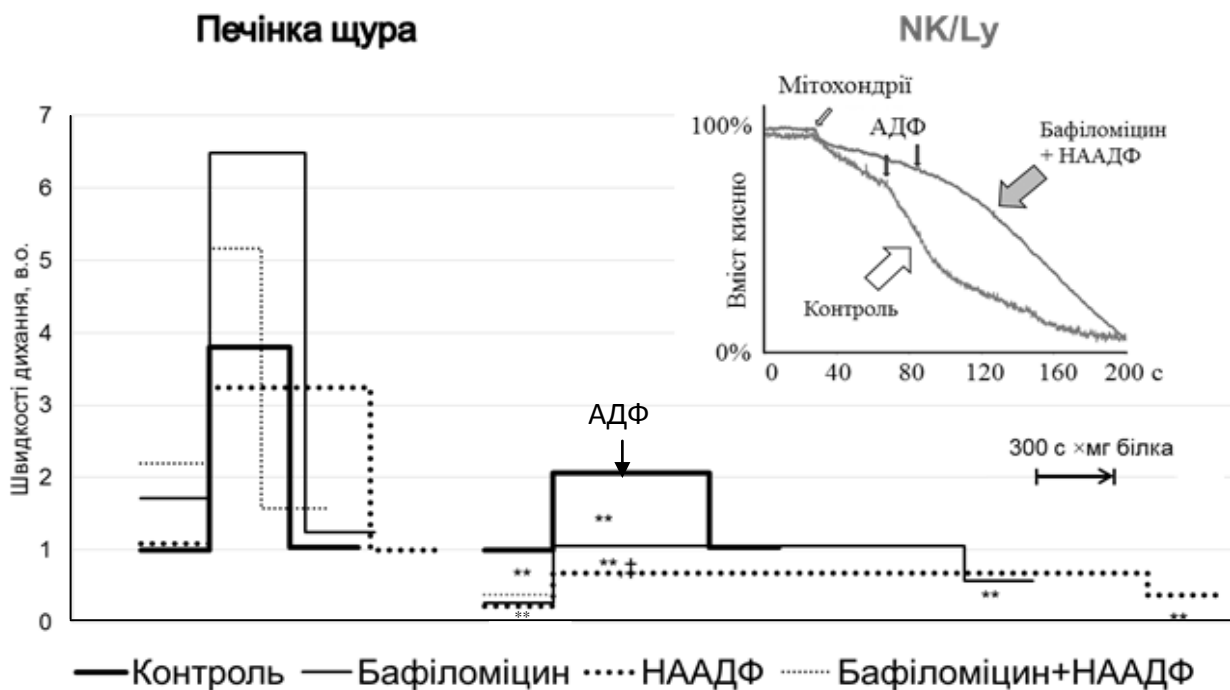
2. Гренюх В., Солиган М., Панчук Р., Бабський А. Вплив ландоміцину А на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій печінки щура // X Міжнародна конференція «Молодь і поступ у біології», Львів, 5–8 квітня 2014 р. : тези доп. – Львів, 2014. – С. 49.

3. Гренюх В., Шалай Я., Бабський А. Поглинання кисню та фосфорилування АДФ у мітохондріях лімфом НК/Лу за впливу ландоміцину А *in vitro*// VI з'їзд Українського біофізичного товариства, Луцьк, 28–30 травня 2015 р. : тези доп. – Луцьк, 2015. – С.44-46.

### **3.7. Вплив бафіломіцину A1 та НААДФ на дихання і окисне фосфорилування мітохондрій лімфоми NK/Ly і печінки щура та АТФазну активність у постмітохондріальній фракції**

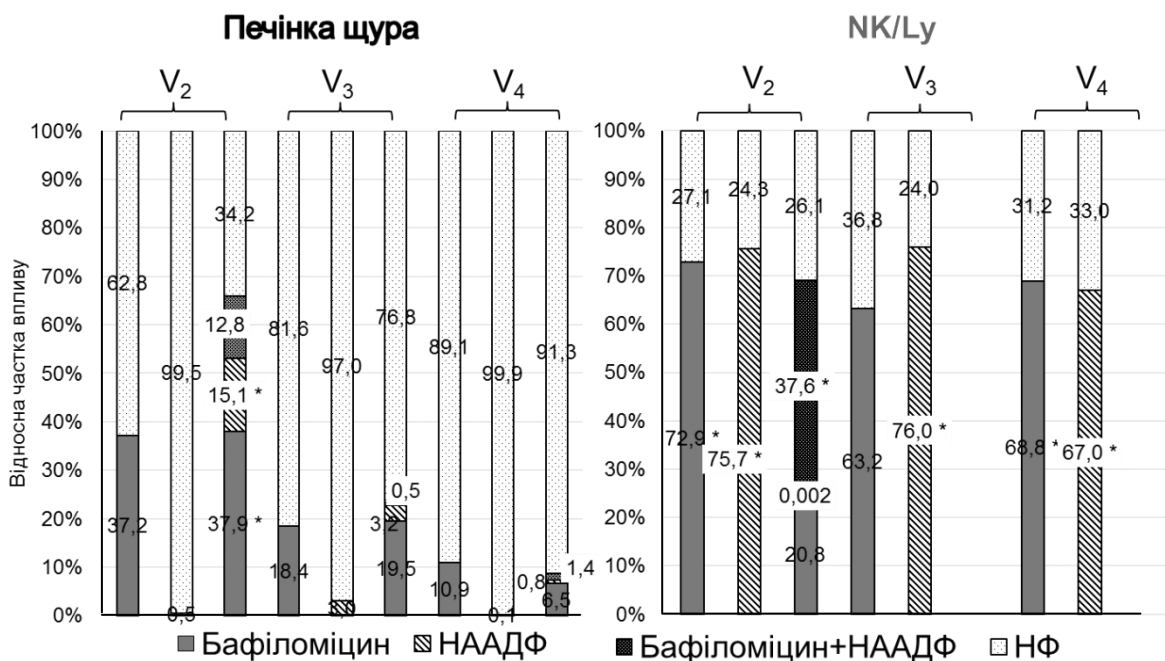
Характерною особливістю ракових клітин є їхня ацидофільність, пов'язана з гіпоксійними умовами та надлишком лактату [74, 209]. Внутрішньоклітинне рН підтримується низкою внутрішньоклітинних механізмів, в ому числі і  $H^+$ -АТФазою [169]. Бафіломіцин A1 – селективний інгібітор  $H^+$  АТФази V-типу - в останні роки розглядається і як можливий протираковий препарат. Він збільшував смертність клітин раку грудей через  $V_{H^+}$ -залежний шлях і значно знижував темпи росту на мишачій моделі *in vivo*. Також інгібування V-АТФази знижує інвазивність та міграцію пухлинних клітин *in vitro*, підтверджуючи тим важливість V-АТФази у метаболізмі новоутворень [80], гіпоксійними умовами та надлишком лактату.

На рис. 3.13 зображено вплив бафіломіцину A1 та агоніста двопорових  $Ca^{2+}$ -каналів НААДФ на швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Не було виявлено достовірних змін швидкостей дихання в досліджуваних метаболічних станах мітохондрій печінки щура за впливу як бафіломіцину, так і НААДФ. Мітохондрії лімфоми демонстрували абсолютно зворотню картину - було встановлено зниження як стимульованого, так і нестимульованого дихання і за додавання бафіломіцину, і НААДФ. При сумісному впливі досліджуваних препаратів після додавання АДФ метаболічні стани 3 і 4 не спостерігали через неконтрольоване підвищення швидкості дихання, що свідчить про пошкодження мембрани та порушення спряження між процесами дихання і окисного фосфорилування.

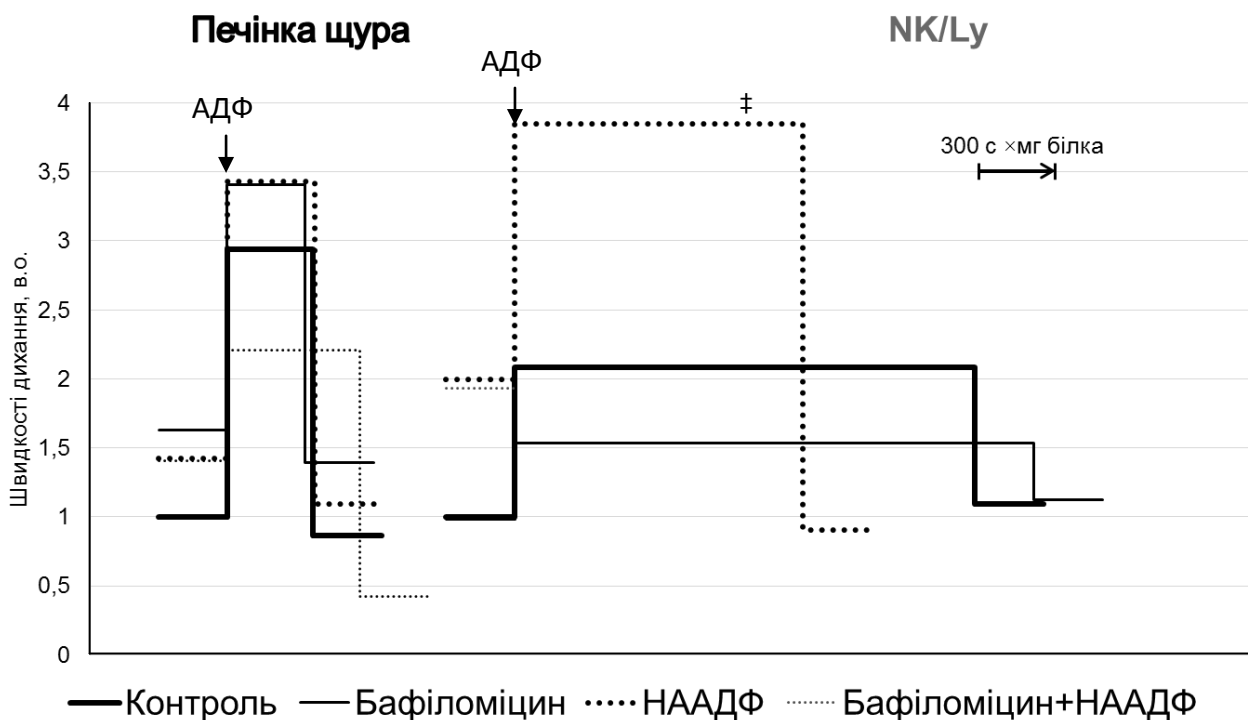


**Рис. 3.13.** Швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за додавання бафіломіцину А1 та НААДФ за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Наведено усереднені дані (n=5). Стандартні похибки і показники достовірності – див. у табл. 3.13.

Нами було проведено дисперсійний аналіз частки впливу бафіломіцину та НААДФ на енергетичні процеси у мітохондріях за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. Отримані результати вказують на значний вплив препаратів на зниження швидкостей дихання мітохондрій NK/Ly за дії досліджуваних препаратів (рис.3.13). Як видно з рис 3.14, частка впливу бафіломіцину була високою, 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% ( $V_4$ ). Як вказувалося вище, у мітохондріях лімфоми додавання АДФ за сумісного впливу бафіломіцину і НААДФ викликало незворотно і неконтрольовану активацію дихання. Як вказано вище, ефекти бафіломіцину і НААДФ на дихання мітохондрій печінки не були підтвержені t-тестом.



**Рис. 3.14.** Відносна частка впливу бафіломіцину А1 та НААДФ на зміни швидкостей дихання за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату. розрахована методом ANOVA,. НФ – частка неврахованих факторів.\* - $p < 0.05$ .



**Рис. 3.15.** Швидкості дихання мітохондрій печінки та лімфоми у різних метаболічних станах за додавання бафіломіцину і НААДФ за окиснення сукцинату. Наведено усереднені дані (n=5). Стандартні похибки і показники достовірності – див. у табл. 3.13.

Однак, дисперсійний аналіз (рис. 3.14) показав достовірну частку впливу бафіломіцину (37,9%) і НААДФ (15,1%) на дихання у 2 метаболічному стані, за їхнього сумісного впливу. Проведений нами дисперсійний аналіз додатково підтвердив вищу чутливість мітохондрій лімфоми до дії досліджуваних препаратів за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату.

Таблиця 3.14.

Швидкості поглинання кисню мітохондріями печінки та лімфоми НК/Лу в різних метаболічних станах за впливу комбінованого впливу бафіломіцину А1 та НААДФ при окисненні  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) і сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

			Контроль	Бафіломіцин А1	НААДФ	Бафіломіцин А1+ НААДФ
Мітохондрії печінки	V <sub>2</sub>	КГ	0,07±0,02	0,11±0,01	0,07±0,03	0,15±0,06
		СКЦ	0,12±0,04	0,20±0,06	0,17±0,06	0,17±0,02
	V <sub>3</sub>	КГ	0,25±0,05	0,43±0,17	0,22±0,07	0,35±,05
		СКЦ	0,36±0,08	0,42±0,07	0,42±0,11	0,27±0,02
	V <sub>4</sub>	КГ	0,07±0,02	0,08±0,01	0,07±0,04	0,11±0,04
		СКЦ	0,11±0,04	0,17±0,05	0,13±0,04	0,05±0,01
Мітохондрії лімфоми	V <sub>2</sub>	КГ	0,03±0,01	0,01±0,02*	0,01±0,001*	0,01±0,02*
		СКЦ	0,01±0,003	0,01±0,004	0,02±0,01	0,02±0,01
	V <sub>3</sub>	КГ	0,07±0,01	0,01±0,002*	0,02±0,01*	Незворотне пошкодження мітохондрій
		СКЦ	0,02±0,003	0,01±0,004	0,04±0,02‡	
	V <sub>4</sub>	КГ	0,03±0,003	0,02±0,004*	0,01±0,006*	
		СКЦ	0,01±0,002	0,01±0,002	0,01±0,005	

Примітка. Одиниці швидкості наведено у нмоль O<sub>2</sub> / с × мг білка; \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p < 0,05$

Таблиця 3.15.

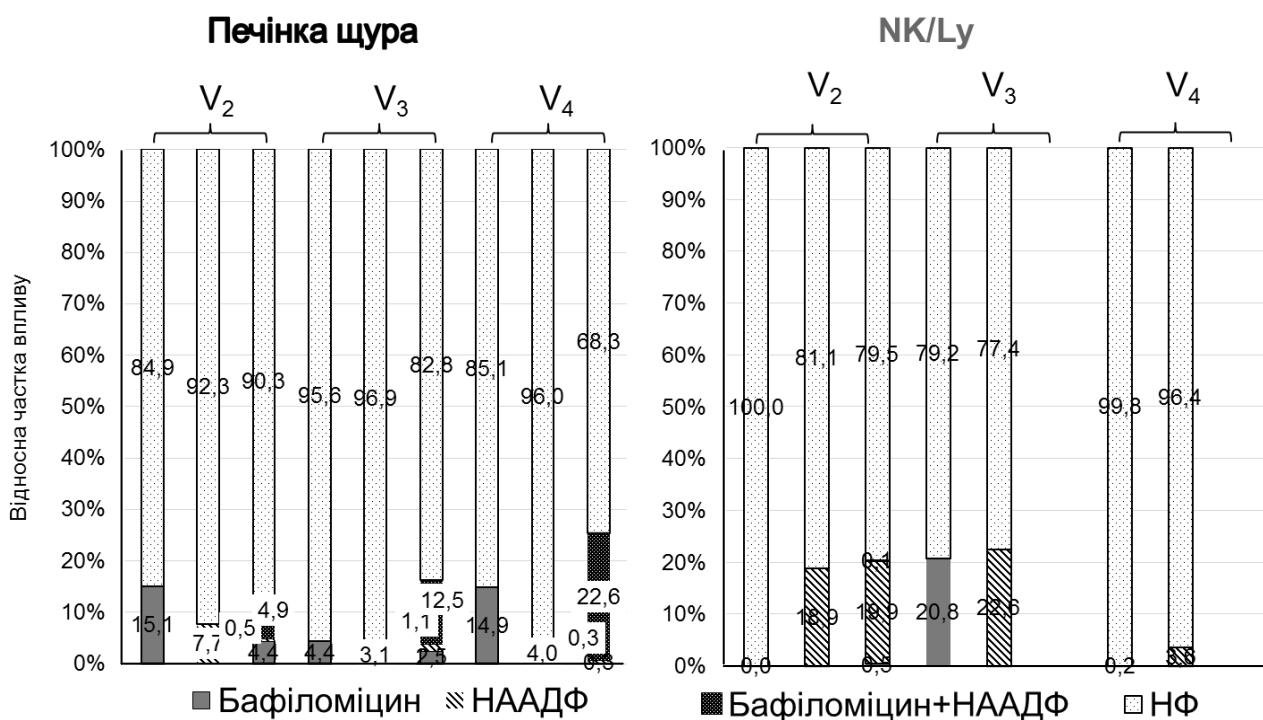
Показники дихального контролю у мітохондріях печінки та лімфоми NK/Ly в різних метаболічних станах за впливу комбінованого впливу бафіломіцину A1 та НААДФ при окисненні  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) і сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

		ДК ( $V_3/V_2$ )		ДК ( $V_3/V_4$ )	
		КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Мітохондрії печінки	Контроль	4,71 $\pm$ 1,28	3,29 $\pm$ 0,38	4,09 $\pm$ 0,78	4,94 $\pm$ 1,46
	Бафіломіцин A1	3,69 $\pm$ 1,11	2,44 $\pm$ 0,46	6,18 $\pm$ 2,76	3,14 $\pm$ 0,98
	НААДФ	3,07 $\pm$ 0,49	2,73 $\pm$ 0,37	4,69 $\pm$ 1,55	3,64 $\pm$ 0,96
	Бафіломіцин A1+НААДФ	2,98 $\pm$ 0,66	1,67 $\pm$ 0,25*	6,24 $\pm$ 2,85	5,77 $\pm$ 0,81
Мітохондрії лімфоми	Контроль	2,40 $\pm$ 0,84	2,88 $\pm$ 0,77	2,01 $\pm$ 0,15	2,06 $\pm$ 0,48
	Бафіломіцин A1	4,05 $\pm$ 0,94	3,43 $\pm$ 1,30	1,78 $\pm$ 0,19	1,50 $\pm$ 0,04‡
	НААДФ	3,33 $\pm$ 1,60	2,52 $\pm$ 1,08	2,00 $\pm$ 0,35	4,62 $\pm$ 0,83*
	Бафіломіцин A1+ НААДФ	Незворотнє пошкодження мітохондрій			

\* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p < 0,05$

Бафіломіцин A1 та НААДФ також впливали і на параметри окисного фосфорилування, дані яких представлені у таблиці 3.15. Зафіксовано зниження АДФ/О за дії обох речовин при окисненні сукцинату, який швидше, порівняно з  $\alpha$ -кетоглутаратом, метаболізується у біоенергетичних шляхах мітохондрій. Можливо, саме цей ефект, викликаний спільною дією обох агентів  $Ca^{2+}$ -метаболізму, що викликає невелике порушення спряження та окисної ефективності, є фатальним для мітохондрій лімфоми.





**Рис. 3.16.** Відносна частка впливу бафіломіцину А1 та НААДФ на зміни швидкостей дихання за окиснення сукцинату, розрахована методом ANOVA, НФ – частка неврахованих факторів.\* - $p < 0.05$ .

Такі енергетичні параметри мітохондрій як швидкість та час фосфорилування, змінювалися відповідно до змін швидкостей дихання – в мітохондріях печінки ці показники не змінювалися порівняно з контрольними значеннями. В мітохондріях лімфоми швидкість фосфорилування знижувалася – з  $0,10 \pm 0,03$  нмоль АДФ/с×мг білка до  $0,02 \pm 0,004$  нмоль АДФ/с×мг білка, а час фосфорилування зростав – від  $682 \pm 173$  с×мг білка до  $2592 \pm 180$  с×мг білка. Дані зміни відбувалися при окисненні  $\alpha$ -кетоглутарату – за окиснення сукцинату змін спостережено не було.

Таблиця 3.16.

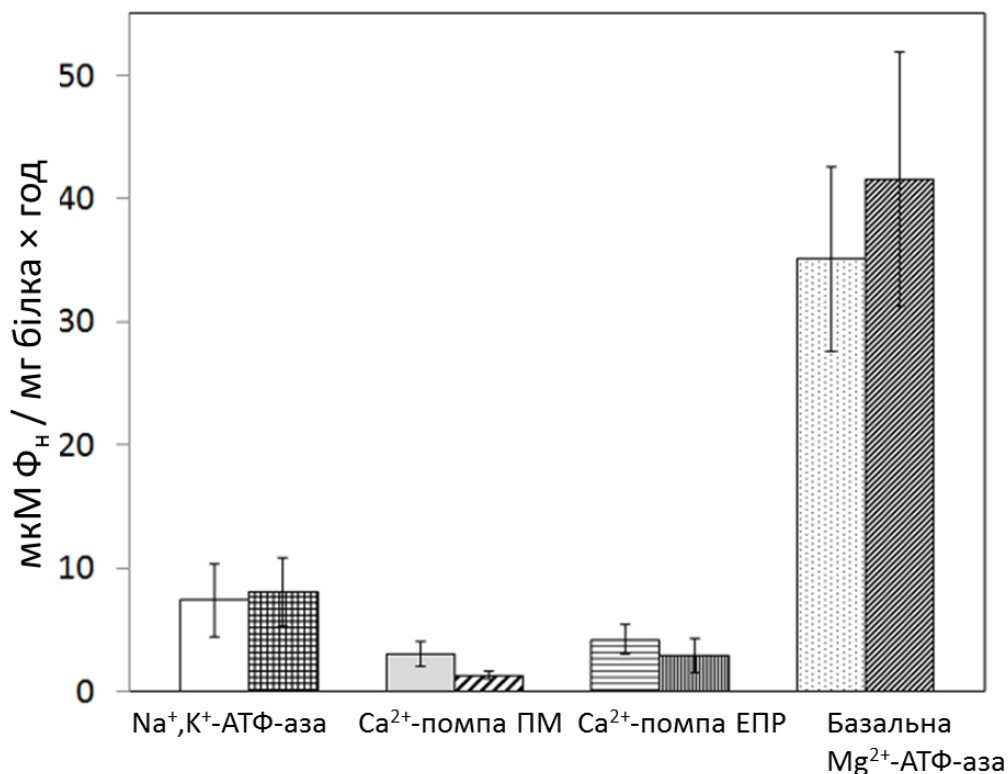
Параметри окисного фосфорилування у мітохондріях печінки та лімфоми NK/Ly в різних метаболічних станах за впливу комбінованого впливу бафіломіцину А1 та НААДФ за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) і сукцинату (СКЦ) ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

			Контроль	Бафіломіцин А1	НААДФ	Бафіломіцин А1+ НААДФ
Мітохондрії печінки	АДФ/О	КГ	1,23±0,11	0,88±0,22	0,90±0,14	1,09±0,03
		СКЦ	0,70±0,02	0,76±0,19‡	0,83±0,17‡	0,53±0,02*
	V <sub>ф</sub>	КГ	0,72±0,35	0,58±0,06	0,42±0,20	0,76±0,11
		СКЦ	0,50±0,12	0,63±0,20	0,75±0,30	0,30±0,02
	T <sub>ф</sub>	КГ	349±102	149±212	703±247	228±28,5
		СКЦ	376±60,0	343±97,5	383±150	581±145
Мітохондрії лімфоми	АДФ/О	КГ	0,78±0,28	0,93±0,35	0,64±0,13	Незворотне пошкодження мітохондрій
		СКЦ	0,90±0,37	1,17±0,61	0,79±0,29	
	V <sub>ф</sub>	КГ	0,10±0,03	0,06±0,02	0,02±0,004*‡	
		СКЦ	0,05±0,03	0,04±0,03	0,06±0,02	
	T <sub>ф</sub>	КГ	682±173	1792±1141‡	2592±180*	
		СКЦ	2019±518	2278±896	1262±632	

Примітка. Одиниці наведених параметрів: АДФ/О – у нмоль АДФ / нг-ат. О, швидкість фосфорилування (V<sub>ф</sub>) - у нмоль АДФ / с × мг білка, а час фосфорилування (T<sub>ф</sub>) - у с × мг білка. \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; ‡ - статистично достовірна різниця за тестом Фішера порівняно з контролем,  $p < 0,05$

Також визначали активність АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми NK/Ly за дії селективного блокатора H<sup>+</sup>-АТФ-ази V-типу – бафіломіцину. Було з'ясовано, що V-АТФази, які розташовані у плазматичній мембрані, залучені у закислення багатьох фенотипів пухлинних клітин молочної

залози людини. Визначали питому активність  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-ази,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз плазматичної мембрани та ендоплазматичного ретикулуму і базальної  $\text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми мишей за наявності бафіломіцину і порівнювали з активністю АТФ-аз контролю (без бафіломіцину). Встановлено, що бафіломіцин не викликав жодних змін активності АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми (рис. 3.17). Це можна пояснити тим, що бафіломіцин-чутлива  $\text{H}^+$ -помпа не має безпосередніх зв'язків з іншими АТФ-азами, які ми вивчали, за умов постмітохондріальної фракції клітин.

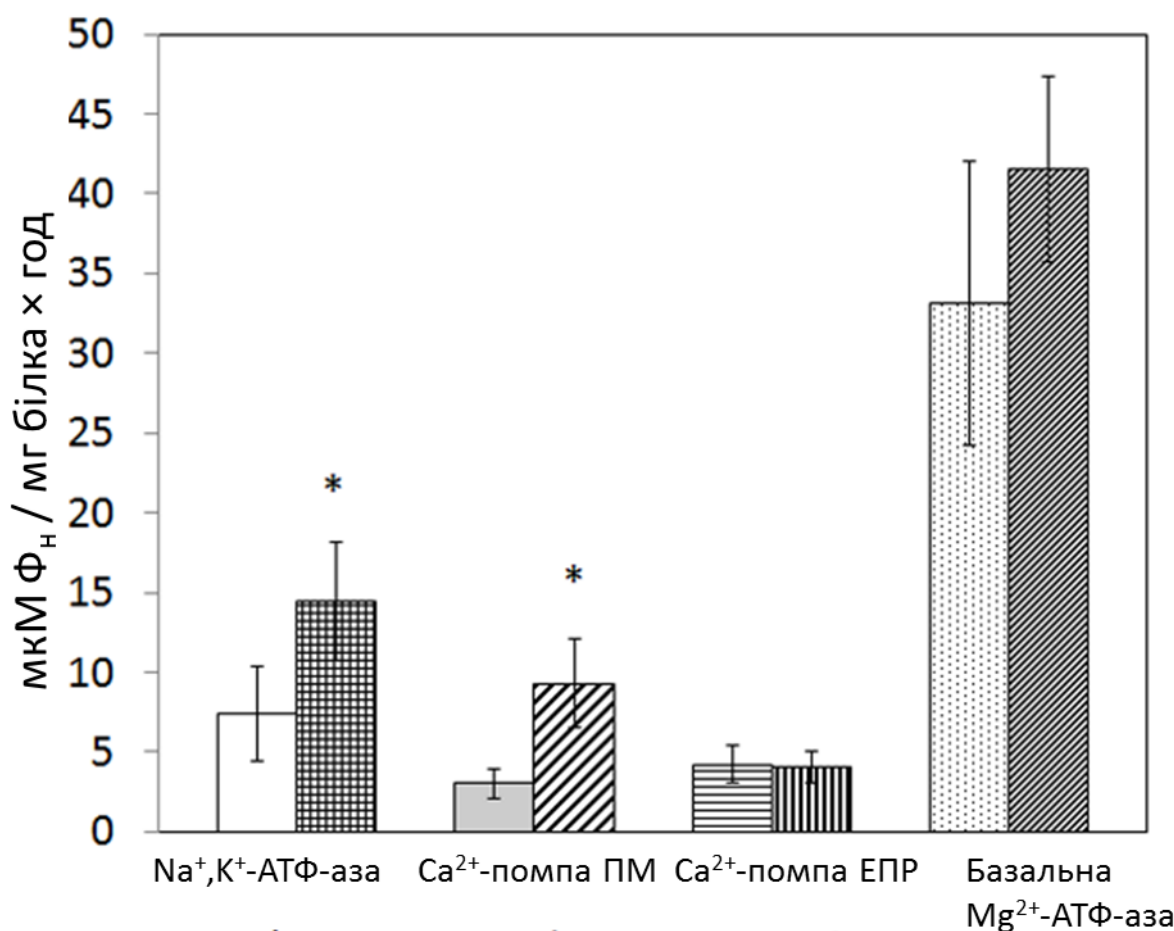


**Рис. 3.17.** Вплив НААДФ на активність АТФаз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми NK/Ly мишей. Ліві стовпці репрезентують контрольні групи, праві – групи з додаванням бафіломіцину

Таке твердження узгоджується з даними про те, що вакуолярна  $\text{H}^+$ -АТФ-аза (V-АТФ-аза), котра за нормальних умов локалізована у мембранах кислих депо, розташована поверхнево і, в такий спосіб, регулює цитозольне рН, підвищуючи

міграційну здатність клітин метастазів [12]. Цілком можливо, що у цілій клітині певні взаємозв'язки можуть бути, але під час диференційного центрифугування й отримання постмітохондріальної фракції клітин вони руйнуються.

Новим внутрішньоклітинним посередником, здатним вивільнювати кальцій, як це показано в останні роки, є НААДФ. Його  $\text{Ca}^{2+}$ -мобілізуюча роль доведена для різних клітин [2; 3, 6, 7, 11, 18]. Однак значення НААДФ як  $\text{Ca}^{2+}$ -мобілізуючого посередника у пухлинних клітинах залишається нез'ясованим. Виявлено, що НААДФ у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми збільшував у 3 рази активність  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи ПМ ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) щодо контролю, але активність  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази ЕПР не зазнала змін (рис. 3.17).

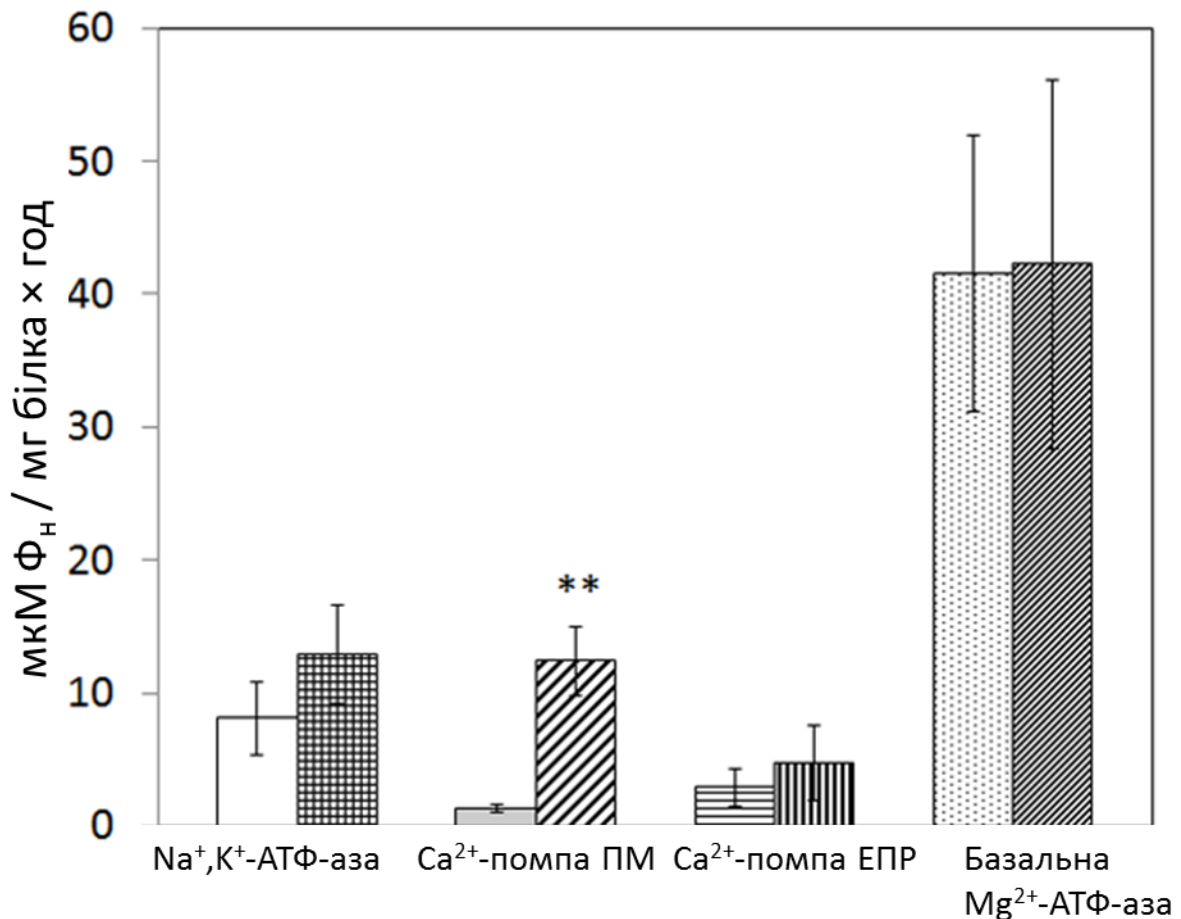


**Рис. 3.18.** Вплив НААДФ на активність АТФаз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми NK/Ly мишей. Ліві стовпці репрезентують контрольні групи, праві – групи з додаванням бафіломіцину \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$

Варто зазначити, що обидві ці помпи активувались додаванням НААДФ до постмітохондріальної фракції клітин печінки щура [16]. Крім того, спостерігали певну тенденцію до збільшення базальної активності АТФаз за дії НААДФ у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми. Цей ефект також був протилежним до його впливу в печінці [16]. Встановлено, що НААДФ у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми NK/Ly мишей викликає збільшення активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази на  $(54,18 \pm 7,84)\%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ). Очевидно, що НААДФ впливає на цю помпу не безпосередньо, а через створення локальних сайтів з підвищеною концентрацією  $\text{Ca}^{2+}$ , які активують інші системи транспорту йонів та, опосередковано,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу. Виявлений нами ефект НААДФ на активність  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпи постмітохондріальної фракції клітин лімфоми був цілком протилежний до попередньо встановленого його впливу у печінці [16].

Таким чином, дія НААДФ у пухлинних клітинах суттєво відрізняється від його впливу на активність систем транспортування йонів у здорових клітинах. Це може свідчити про те, що НААДФ-чутливе депо у клітинах лімфоми має цілком відмінне значення від його ролі в клітинах печінки, а також зовсім інше розташування всередині клітини. На основі отриманих даних ми припускаємо, що є певна спорідненість між плазматичною мембраною і НААДФ-чутливим депо у клітинах лімфоми. Такий висновок ми зробили на підставі того, що НААДФ чинив вплив тільки на помпи, які функціонують у плазматичній мембрані ( $\text{Ca}^{2+}$ - і  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФаза) та не діяв на ті системи активного транспорту, що локалізовані всередині клітини, зокрема у мембранах ендоплазматичного ретикулуму. Хоча на печінковій фракції такий вплив було виявлено нами попередньо [16]. Це припущення узгоджується з висновками, які ми зробили на основі вищеописаного впливу бафіломіцину. Також на підтвердження нашого припущення про спорідненість кислотного НААДФ-чутливого депо із плазматичної мембрани пухлинних клітин свідчать дані про те, що застосування зовнішньоклітинного НААДФ здатне індукувати внутрішньоклітинне вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  [1]. Отже, сайтами впливу НААДФ, як ми

припускаємо, є транспортні білки розміщені у ПМ клітин лімфоми. Це може бути зумовлено тим, що у пухлинних клітинах кислотні депо, такі як ранні чи пізні ендосоми, є асоційованими з плазматичною мембраною унаслідок порушення внутрішньоклітинного транспорту цих органолів.



**Рис. 3.19.** Вплив НААДФ на активність АТФаз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми NK/Ly мишей за умов попередньої преінкубації з бафіломіцином. Ліві стовпці репрезентують групи з додаванням бафіломіцину, праві – групи з додаванням бафіломіцину та НААДФ. \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$

На рис. 3.19 представлено вплив бафіломіцину на НААДФ-індуковані зміни активності АТФ-аз постмітохондріальної фракції клітин лімфоми NK/Ly. Після попередньої преінкубації постмітохондріальної фракції клітин лімфоми з бафіломіцином вплив НААДФ на активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФ-ази був послаблений. Активність Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-помпи знижувалася тільки на  $(37,30 \pm 2,35) \%$  ( $n=6$ ,  $p < 0,05$ ) за

дії НААДФ на фоні бафіломіцину. Також бафіломіцин повністю запобігав тенденції до збільшення базальної АТФ-азної активності за дії НААДФ у пухлинних клітинах. Однак бафіломіцин підсилював НААДФ-індуковане збільшення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-ази ПМ у 9,4 рази ( $n=5$ ,  $p<0,05$ ). Підсилення бафіломіцином НААДФ-індукованого збільшення активності  $\text{Ca}^{2+}$ -помпи плазматичною мембраною можна пояснити взаємозв'язком між цією системою активного транспорту йонів і  $\text{H}^+$ -АТФ-азою. Ймовірно, що заблокувавши протонну помпу, ми зняли конкуренцію між  $\text{H}^+$ -помпою та  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азою плазматичної мембрани у постмітохондріальній фракції клітин лімфоми. Однак такий зв'язок реалізується лише за умов активування вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з НААДФ-чутливого депо, що може опосередковано впливати на  $\text{H}^+$ -помпу. Таким чином, НААДФ-чутливе депо містить протонну помпу і є певним чином пов'язане з  $\text{Ca}^{2+}$ -помпою плазматичної мембрани. Крім того, активування вивільнення кальцію НААДФ також впливає і на ще одну транспортувальну систему плазматичної мембрани –  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -помпу. Ми підтверджуємо наше припущення про те, що сайтами дії НААДФ, як і бафіломіцину, є плазматична мембрана клітин лімфоми. Отже, кислотне депо ракових клітин, яке містить  $\text{H}^+$ -помпу і НААДФ-чутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -канали, є асоційоване з ПМ. Можна припустити, що воно не є залучене у внутрішньоклітинному транспортуванні, яке полягає у перетворенні первинних ендосом у вторинні ендосоми та лізосоми. Можливо, у клітинах лімфоми таке рециркулювання є порушеним, оскільки протонна помпа, яка відіграє головну роль у цьому процесі, в ракових клітинах є “переорієнтована” на плазматичну мембрану і зовнішню інвазію патологічних клітин у вигляді розширення метастаз.

### **Підсумок**

Бафіломіцин і НААДФ вибірково пригнічують енергетичні процеси у мітохондріях лімфоми, але не впливають на мітохондрії печінки. Окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату є більш чутливим до впливів бафіломіцину А1 і НААДФ у порівнянні з окисненням сукцинату. Бафіломіцин разом з НААДФ призводять до

повного розпряження мітохондрій лімфоми протягом чи після синтезу АТФ як за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, так і сукцинату. Інгібуючий ефект бафіломіцину А1 на активність  $H^+$ -АТФази синергічно доповнює ймовірне НААДФ-індуковане  $Ca^{2+}$  вивільнення з автофагосом мітохондрій. Такий значний вплив бафіломіцину А1 та НААДФ на мітохондрії NK/Ly може бути пов'язаний з можливою присутністю кислих депо у мітохондрійних пробах, які одночасно слугують джерелом  $Ca^{2+}$  за інгібування  $H^+$ -АТФаз та/чи відкриття двопорових  $Ca^{2+}$ -каналів у депо, що врешті може призводити до автофагії мітохондрій клітин лімфоми.

.....

1. Бичкова С., Гренюх В. АТФазна активність мікосомальної фракції лімфоми NK/Ly за дії бафіломіцину та НААДФ // *Studia Biologica*. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 31-38.

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

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

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



#### 4. УЗАГАЛЬНЕННЯ

У роботі використано сучасний полярографічний метод вивчення ізольованих мітохондрій, який дає змогу отримати інформацію про швидкості дихання в різних метаболічних станах, швидкість та час окисного фосфорилування та його спряження з процесами дихання за окиснення НАД- і ФАД-залежних субстратів. Суспензія клітин дає змогу реєструвати тільки швидкості дихання з огляду на методичні та функціональні обмеження пов'язані, зокрема, з труднощами транспорту субстратів через плазматичну мембрану.

Виділені вперше мітохондрії лімфоми НК/Лу є функціонально активними і структурно цілісними. Порівняно з мітохондріями печінки, для них характерні нижчі швидкості дихання, незалежно від субстрату окиснення, нижчі параметри дихального контролю та окисного фосфорилування, що пов'язано з певними особливостями пухлинної тканини, зокрема меншою кількістю мітохондрій, а також відомим ефектом Варбурга, який передбачає перевагу гліколізу перед окисними процесами у мітохондріях у енергетичному забезпечення ракових клітин [204]. Разом з тим, у мітохондріях клітин лімфоми зменшення показника дихального контролю і збільшення тривалості часу фосфорилування спостерігали тільки за окиснення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату. Аналогічне зниження швидкості окисного фосфорилування описано у мітохондріях із клітин карциноми Ерліха порівняно із мітохондріями печінки щура [42, 88, 89, 211, 212]. Окрім того, за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату в мітохондріях лімфоми дихальний контроль є нижчим, а час фосфорилування тривалішим, тоді як за окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату спостерігали тільки зниження 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). У таблиці 4.1 представлено кількісні зміни найбільш чутливих з досліджених мітохондрійних показників - швидкості дихання у 3 метаболічному стані та швидкості окисного фосфорилування - за впливу препаратів: ландоміцину А, доксорубіцину, Les 3506, бафіломіцину та НААДФ.

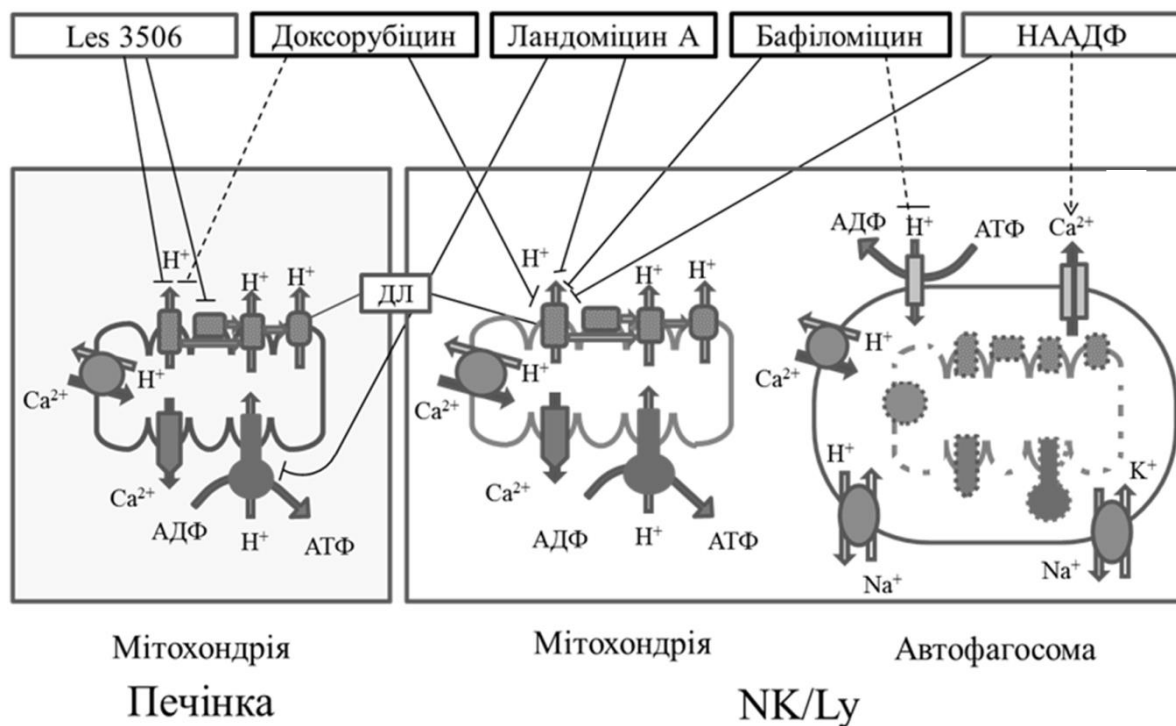
Таблиця 4.1

Відносні зміни швидкості дихання та швидкості окисного фосфорилування у мітохондріях печінки та лімфоми НК/Лу за впливу протипухлинних препаратів за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату (КГ) і сукцинату (СКЦ).

	$V_3$				$V_\phi$			
	Печінка		НК/Лу		Печінка		НК/Лу	
	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ	КГ	СКЦ
Доксорубіцин	-		-42,1%*	+13,9%	-		-60,5%	+13,2%
Les 3506	-39,4%*	-32,8%*	-		-46,3%*	-35,2%*	-	
Ландоміцин А	-41,3%*	-15,2%	-49,0%*	-8,74%	-52,4%*	+0,01%	-36,0%	-1,36%
Бафіломіцин	+70,7%	+15,7%	-49,1%*	-26,1%	-19,3%	+25,6%	-39,1%	-9,22%
НААДФ	-50,0%	+0,78%	-67,1%*	+85,1%	-28,4%	+19,0%	-76,7%*	+23,0%
Бафіломіцин + НААДФ	-20,4%	-35,1%	Розпряження		-30,6%	+53,2%	Розпряження	

Примітка. \* - статистично достовірна різниця порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ;

Отримані результати узагальнені у рис. 4.1, де показано (зліва направо) мітохондрію печінки, мітохондрію лімфоми НК/Лу та гіпотетичну автофагосому, що здійснює процес мітоптозу. На схемі в мембрані мітохондрій розміщено дихальний ланцюг (ДЛ), АТФ-синтетазу та транспортні системи ( $Ca^{2+}/H^+$  обмінник,  $Ca^{2+}$  канали,  $Na^+/H^+$  обмінник), які можуть бути причетні до ефектів досліджуваних речовин.



**Рис. 4.1.** 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 лімфоми 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 мають побічні ефекти. Можливий вплив протипухлинного препарату на нормальні клітини досліджували на мітохондріях печінки, які є, з одного боку - класичним об'єктом дослідження клітинної енергетики, а з іншого – печінка є головним детоксикуючим органом. Препарат Les 3506 проявляв негативний ефект на мітохондрії печінки щура, інгібуючи 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. Такі ефекти треба брати до уваги за планування хіміотерапії пухлин з цим антибіотиком, оскільки він пригнічує енергетичні процеси у мітохондріях як лімфоми, так і печінки щура за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату.

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 у ракових пухлинах активовані процеси фагоцитозу для ліквідації апоптозних та некрозних клітин та їхніх мітохондрій [47]. Проф. В. П. Скулачов виділяє програмований процес смерті мітохондрій – мітоптоз - як важливий етап клітинного апоптозу. Виявлено, що цілі мітохондрії можуть поглинатися та розщеплюватися фагоцитами, які в цьому випадку називають автофагосомами (рис 3.4.) [20].

Бафіломіцин та НААДФ не впливали достовірно на показники мітохондрій печінки, але достовірно пригнічували та розпрямлювали дихання і окисне фосфорилування мітохондрій NK/Ly. Інгібуючий ефект бафіломіцину А1 на активність  $H^+$ -АТФаз [81], може призводити до закислення внутрішньоклітинного середовища, яке часто використовується за протипухлинної терапії. Кальцієвий агоніст НААДФ може викликати вивільнення  $Ca^{2+}$  з автофагосом через двопорові канали [125] 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 відповіддю клітин на дефектні мітохондрії, вихід з яких цитохрому с потенційно може викликати апоптоз [20, 198, 213]. Внаслідок мітоптозу пошкоджені мітохондрії поглинаються автофагосомами. (Присутність автофагосом у фракції непромитих мітохондрій може бути обумовлена приблизно однаковою масою цих органел). Таким чином, на підставі отриманих результатів 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.

Отже, як видно з табл. 4.1 практично усі з досліджуваних протипухлинних препаратів завжди знижували швидкість  $V_3$  на 42 – 67 %, а швидкість фосфорилування на 36 – 77 % (з різним рівнем достовірності) за окиснення кетоглутарату в мітохондріях клітин лімфоми. Більше того, за спільної дії бафіломіцину та НААДФ мітохондрії ракових клітин не «виходили» у 3-ій метаболічний стан, тобто не були здатні фосфорилувати доданий АДФ. Натомість у мітохондріях печінки ці препарати викликали лише недостовірну тенденцію до зниження дихання та окисного фосфорилування за окиснення цього НАД-залежного субстрату. За окиснення сукцинату достовірного зниження  $V_3$  у мітохондріях лімфоми практично не спостерігали.

## 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 NK/Ly 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 c 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 NK/Ly та мітохондрії печінки можуть бути використані як чутливі мішені для вивчення впливу протипухлинних препаратів на енергетичні процеси в пухлинних і нормальних клітинах.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бабский А. М. Влияние адреналина на окислительное фосфорилирование и обмен ионов кальция в митохондриях печени и слизистой оболочки тонкого кишечника крысы : дис. канд. биол. наук : 03.00.13 / Бабский А. М. – Пушино, 1985. – 137 с.
2. Бабский А. М. Действие и последствие адреналина на дыхание митохондрий / А. М. Бабский, М. Н. Кондрашова, И. В. Шостаковская // Физиол. журн. – 1985. – №31. – С. 301–306.
3. Бабский А.М. Субстратно-гормональная система янтарная кислота - катехоламины. Новые данные. / [А. М. Бабский, Ю. С. Стефанкив, М. Н. Кондрашова et al.] // Митохондрии в патологии / [ М. Н. Кондрашова]. – Пушино: ОНТИ, 2001. – С. 14–21.
4. Березов Т.Т. Биологическая химия. / Т.Т.Березов, Б.Ф. Коровкин - Москва.:Мир,1982. -625 с.
5. Бичкова С., Гренюх В. АТФазна активність мікосомальної фракції лімфоми NK/Ly за дії бафіломіцину та НААДФ // Studia Biologica. - 2015. – Т.9, №2. – С. 31-38.
6. Гордій С.К. Адренергічні та холінергічні механізми регуляції ефективності дихання секреторних клітин / [С. К. Гордій, І. В. Шостаковська, М. М. Доліба et al.]. // Фізіол. журн.. – 1994. – №40. – С. 46–56.
7. Гренюх В. П. Аналіз параметрів дихання та окисного фосфорилування митохондрий за використання програми MATLAB // 19-й з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г.Костюка з міжнародною участю, Львів, 26-29 травня 2014 року / В. П. Гренюх, А. М. Бабський. // 2014. – №60. – С. 103.
8. Гренюх В.П. Порівняльна характеристика параметрів дихання і окисного фосфорилування у митохондриях лімфоми NK/Ly та печінки миші / В. П.Гренюх, М. Д. Луцик, Р. А. Стойка, А. М. Бабський. // Studia Biologica. – 2015. – №9. – С. 39–50.



9. Гренюх В. Вплив ландоміцину А на дихання та окисне фосфорилування мітохондрій / В. Гренюх, Л. Легка, О. Єлісеєва [та ін.] // Вісник Львівського університету. Біологічний вісник. – 2015.-Т.69. - С. 49-56.

10. Гренюх В.П. Максимальна окисна здатність мітохондрій клітин лімфоми NK/Ly за використання метилових естерів енергетичних субстратів / В. П. Гренюх, Б. О. Манько, О. О. Сідорова, А. М. Бабський // Біологія тварин. – 2015. – Т. 18, № 4. - 6 с.

11. Деркач М. П. Курс варіаційної статистики / Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Є. – Київ: Вища школа, 1977. – 208 с.

12. Захарченко М. В. Важность сохранения биофизической организации изолированных митохондрий для выявления физиологической регуляции их функций / М. В. Захарченко, М. Н. Кондрашова, Н. В. Хундерякова. // Биофизика. – 2011. – №56. – С. 840–847.

13. Кольман Я. Наглядная биохимия / Я. Кольман, Р. Г. Рем. – Москва: Мир, 2000. – 469 с.

14. Кондрашова М. Н. Структурно- кинетическая организация цикла трикарбоновых кислот в активно функционирующих митохондриях // Биофизика – 1989. – Т. 34, №3. – С. 450-458.

15. Ксенжек О.С. Электрохимические свойства обратимых биологических редокс-систем / О.С. Ксенжек, Петрова А.С. - Москва: Наука, 1986. – 150 с.

16. Манько Б. Б., Волошин Д., Манько В. Дихання ізольованих ацинусів підшлункової залози щурів / Б. Манько, Д. Волошин, В. Манько. // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол.. – 2013. – №61. – С. 172–179.

17. Ньюсхолм Э. Регуляция метаболизма./ Э .Ньюсхолм, К. Старт. - Москва: Мир,1977. – 407 с.

18. Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: Новые взгляды / Э. Рэкер. - Москва: Мир,1979. – 216 с.

19. Северин Е. С. Биохимия: Учебник для вузов / Е. С. Северин. – Москва: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 776 с.

20. Скулачев В. П. Мембранная биоэнергетика / В. П. Скулачев, А. В. Богачев, Ф. О. Каспаринский. – Москва: Издательство МГУ, 2010. – 365 с.
21. Страйер Л. Биохимия / Л. Страйер. - Москва: Мир, 1985. – 312 с.
22. Фільченков А. А. Апоптоз і рак: від теорії до практики / А. А. Фільченков, Р. С. Стойка. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – 524 с.
23. Франк Г.М. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / [Под ред. Г. М. Франк, М. Н. Кондрашова, Е. Н. Мохова и др.]. – Москва: Наука, 1973. – 280 с.
24. Хашен Р. Шейх Д. Очерки по патологической биохимии /Р. Хашен, Д.Шейх. - Москва.:Мир,1981. – 256 с.
25. Чумак В.В. Порівняльне дослідження на пухлинних клітинах людини *in vitro* цитотоксичної активності різних за структурою ізатинвмісних похідних 4-тіазолідинону / [В. В. Чумак, Р. Р. Панчук, Н. О. Манько, et al.]. // Біологічні студії. – 2014. – №8. – С. 29–42.
26. *Abeloff's Clinical Oncology* / [J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, D. H. James et al.], 2014. – 2325 с.
27. Acinar cell respiration in experimental acute pancreatitis / [H. U. Schulz, M. Pross, F. Meyer et al.]. // *Shock*. – 1955. – №3. – С. 184–188.
28. Adekola K. Glucose transporters in cancer metabolism / K. Adekola, S. T. Rosen, M. Shanmugam. // *Curr Opin Oncol*. – 2012. – №24. – С. 650–654.
29. Allen C. D. Germinal-center organization and cellular dynamics / C. D. Allen, T. Okada, J. G. Cyster. // *Immunity*. – 2007. – №27. – С. 190–202.
30. Asoh S. Expression of the apoptosis-mediator Fas is enhanced by dysfunctional mitochondria / [S. Asoh, T. Mori, J. Hayashi et al.]. // *J. Biochem.* – 1996. – №120. – С. 600–607.
31. Augustin W. Role of endogenous and exogenous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria / W. Augustin, I. Wiswedel, H. Noack. // *Mol Cell Biochem*. – 1997. – №174. – С. 199–205.

32. Babsky A.M Contribution of perfusion in diffusion-weighted <sup>1</sup>H-MRI of intrahepatic and subcutaneous hepatocellular carcinoma in rat / A. M. Babsky, B. George, V. P. Greniukh. [et al.] // *Studia Biologica*. – 2013. – T. 7, № 2. – C. 5–14.
33. Bardia A. Johns Hopkins Patients' Guide to Lymphoma / A. Bardia, E. Seifert., 2011.
34. Barger, J. F., Plas D. R. Balancing Biosynthesis and Bioenergetics: Metabolic Programs in Oncogenesis. *Endocrine-Related Cancer* // *Endocr Relat Cancer*. – 2010. – Vol. 17, № 4. – P.287-304.
35. Baysal B. E. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma / [B. E. Baysal, R. E. Ferrell, J. E. Willett-Brozick et al.]. // *Science*. – 2000. – №287. – C. 848–851.
36. Beal M. F. Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice / M. F.Beal, R. T. Matthews, A. Thieleman, C. W. Shults. // *Brain Res*. – 1998. – №783. – C. 109–114.
37. Beal M. F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases / Beal. // *Biochim Biophys Acta*. – 1998. – №1366. – C. 211–223.
38. Benrahmoune M. The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine / M. Benrahmoune, P. Thérond, Z. Abedinzadeh. // *Free Radic Biol Med*. – 2000. – №29. – C. 775–782.
39. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization / Bernardi. // *J Biol Chem*. – 1992. – №267. – C. 8834–8839.
40. Berthiaume J. M. Dietary vitamin E decreases doxorubicin-induced oxidative stress without preventing mitochondrial dysfunction. / J. M.Berthiaume, P. J. Oliveira, M. W. Fariss, K. B. Wallace. // *Cardiovasc Toxicol*. – 2005. – №5. – C. 257–267.
41. Beyer R. E. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an anti-oxidant / Beyer. // *Biochem Cell Biol*. – 1992. – №70. – C. 390–403.

42. Bian X. Roles of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. / [X. Bian, F. M. Hughes, Y. Huang et al.]. // *Am J Physiol.* – 1997. – №272. – C. 1241–1249.
43. Borst P. Preparation and Properties of Mitochondria from Ehrlich Ascites Tumor Cells. / Borst. // *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.* – 1960. – №7. – C. 381–383.
44. Brand M. D. Assessing mitochondrial dysfunction in cells / M. D. Brand, D. G. Nicholls. // *Biochem. J.* – 2011. – №435. – C. 297–312.
45. Cadenas E. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging / E. Cadenas, K. J. Davies. // *Free Radic Biol Med.* – 2000. – №29. – C. 222–230.
46. Cao X. Glucose uptake inhibitor sensitizes cancer cells to daunorubicin and overcomes drug resistance in hypoxia / [X. Cao, L. Fang, S. Gibbs et al.]. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 2007. – №59. – C. 495–505.
47. Cassarino D. S. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear responses, and cell death in neurodegeneration / D. S. Cassarino, J. P. Bennett. // *Brain Res Brain Res Rev.* – 1999. – №29. – C. 1–25.
48. Chaabane W. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer / [W. Chaabane, S. S. User, M. El-Gazzah et al.]. // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* – 2012. – №61. – C. 43–58.
49. Chance B. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs / B. Chance, H. Sies, A. Boveris. // *Physiol Rev.* – 1979. – №59. – C. 527–605.
50. Chance B. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state. / B. Chance, G. Williams. // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1955. – №217. – C. 409–427.
51. Chandra J. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress / J. Chandra, A. Samli, S. Orrenius. // *Free Radic Biol Med.* – 2000. – №29. – C. 323–333.

52. Chen D. Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. / D. Chen, M. Song, O. Mohamad, S.P. Yu// BMC Cancer. – 2014. -№14. C. 716.
53. Costantini P. Mitochondrion as a novel target in anticancer therapy / P. Costantini, E. Jacotot, D. Decaudin, G. Kroemer. // J Natl Cancer Inst. – 2000. – №92. – C. 1042–1053.
54. Cuezva J. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progress / [J. Cuezva, M. Krajewska, M. Heredia et al.]. // Cancer Research. – 2002. – №62. – C. 6674–6681.
55. De Vitto H. Glutamine at focus: versatile roles in cancer / De Vitto H., Pérez-Valencia J., Radosevich J.A.. // Tumour Biol. –2015. – №1. – C. 1-15.
56. DeAtley S. M. Antioxidants protect against reactive oxygen species associated with Adriamycin-treated cardiomyocytes / S. M. DeAtley, M. Y. Aksenov, M. V. Aksenova. // Cancer Lett. – 1999. – №136. – C. 41–46.
57. Debatin K. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment / K. Debatin. // Toxicol Lett. – 2000. – №112. – C. 41–48.
58. Debatin K. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway / K. Debatin, D. Poncet, G. Kroemer. // Oncogene. – 2002. – №12. – C. 8786–8803.
59. DeBerardinis R.J. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis / [ DeBerardinis R.J., Mancuso A., Daikhin E. et al]// Proc Natl Acad Sci U S A. – 2007. – Vol. 104, № 49. – C.19345-19350.
60. Decaudin D. Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy / D. Decaudin, I. Marzo, C. Brenner, G. Kroemer. // Int J Oncol. – 1998. – №12. – C. 141–152.
61. Desagher S. Mitochondria as the central control point of apoptosis / S. Desagher, J. C. Martinou. // Trends Cell Biol. – 2000. – №10. – C. 369–377.
62. Diers A.R. Pyruvate fuels mitochondrial respiration and proliferation of breast cancer cells: effect of monocarboxylate transporter inhibition / Diers A.R.,

Broniowska K.A., Chang C.F., Hogg N // *Biochem J.* – 2012. – Vol. 4446 № 3. – C. 561-71.

63. Dong L. F. Alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II. / [L. F. Dong, P. Low, J. C. Dyason et al.]. // *Oncogene.* – 2008. – №27. – C. 4324–4335.

64. Eakin R. T. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of living cells and their metabolism of a specifically labeled <sup>13</sup>C substrate / [R.T. Eakin, L.O. Morgan, C.T. Gregg et al.] // *FEBS Lett.* -1972. –№67. – C. 259-264

65. Earnshaw W. C. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis / W. C. Earnshaw, L. M. Martins, S. H. Kaufmann. // *Annu Rev Biochem.* – 1999. – №68. – C. 383–424.

66. Engel R. H. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer / R. H. Engel, A. M. Evens. // *Front Biosci.* – 2006. – №11. – C. 300–331.

67. Erecinska M. Regulation of cellular energy metabolism: the Crabtree effect / I. Sussman, M. Erecinska, D.F. Wilson. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. -№591. – C. 209-223.

68. Ernster L. Ubiquinol as a biological antioxidant: a review / Ernster // *Oxidative Processes and Antioxidants* / Ernster. – New York: Raven Press,, 1994. – C. 185–198.

69. Fogg V. C. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death / V. C. Fogg, N. J. Lanning, J. P. Mackeigan. // *Chin J Cancer.* – 2012. – №30. – C. 526–539.

70. Frezza C. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders / C. Frezza, E. Gottlieb. // *Seminars in Cancer Biology.* – 2009. – №19. – C. 4–11.

71. Fukuda R. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells / [R. Fukuda, H. Zhang, J. W. Kim et al.]. // *Cell.* – 2007. – №129. – C. 111–122.

72. Galluzzi L. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy / L.Galluzzi, N. Larochette, N. Zamzami, G. Kroemer. // *Oncogene.* – 2006. – №25. – C. 4812–4830.

73. Gatenby R. A. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer / [R. A. Gatenby, K. A. Smallbone, P. K. Maini et al.]. // *British Journal of Cancer*. – 2007. – №96. – C. 646–653.
74. Gatenby R. A. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy / R. A. Gatenby, R. J. Gillies. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – №39. – C. 358–1366.
75. Geschwind J. F. Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production / [J. F. Geschwind, Y. H. Ko, M. S. Torbenson et al.]. // *Cancer Res.* – 2002. – №62. – C. 3909–3913.
76. Gillies R. J. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? / R. J. Gillies, R. A. Gatenby. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2007. – №39. – C. 251–257.
77. Gogvadze V. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? / V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky. // *Trends in Cell Biology*. – 2008. – №18. – C. 165–173.
78. Gogvadze V. Mitochondria--a bullseye in cancer therapy / V. Gogvadze, B. Zhivotovsky. // *Mitochondrion*. – 2014. – №19. – C. 1-2.
79. Gogvadze V. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. / V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2006. – №1757. – C. 639–647.
80. Gottlieb E. Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update / E. Gottlieb, I. P. Tomlinson. // *Nature Reviews Cancer*. – 2005. – №5. – C. 857–866.
81. Graham R. M. Inhibition of the vacuolar ATPase induces Bnip3-dependent death of cancer cells and a reduction in tumor burden and metastasis. / R.M. Graham, J.W. Thompson, K.A. Webster // *Oncotarget*. -2014. -№ 5. -C. 1162–1173.
82. Hagg M. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. / M. Hagg, S. Wennstrom. // *Exp. Cell Res.* – 2005. – №306. – C. 180–191.
83. Halestrap A. P. Mitochondria and cell death / A. P.Halestrap, E. Doran, J. P. Gillespie, A. O'Toole. // *Biochem Soc Trans*. – 2000. – №28. – C. 170–177.

84. Halicka H. D. 2-Deoxy-D-glucose enhances sensitivity of human histiocytic lymphoma U937 cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor / [H. D. Halicka, B. Ardelt, X. Li et al.]. // *Cancer Res.* – 1995. – №55. – C. 444–449.
85. Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine* / B. Halliwell, J. Gutteridge. – Oxford: Oxford University Press, 1989.
86. Halliwell B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview / B. Halliwell, J. M. Gutteridge. // *Methods Enzymol.* – 1990. – №189. – C. 1–85.
87. Hatzivassiliou G. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth / [G. Hatzivassiliou, F. Zhao, D. E. Bauer et al.]. // *Cancer Cell.* – 2005. – №8. – C. 311–321.
88. Hawtrey A. Mitochondria of the Ehrlich ascites-tumour cell. Isolation and studies of oxidative phosphorylation / A. Hawtrey, M. Silk. // *Biochemical Journal.* – 1960. – №74. – C. 21–26.
89. Heinz A. Evidence for activation of an active electrogenic proton pump in Ehrlich ascites tumor cells during glycolysis / A. Heinz, G. Sachs, J. A. Schafer. // *J. Membr. Biol.* – 1981. – №61. – C. 143–153.
90. Hengartner M. O. The biochemistry of apoptosis / Hengartner. // *Nature (Lond).* – 2000. – №407. – C. 770–776.
91. Heytler P. G. A new class of uncoupling agents — Carbonyl cyanide phenylhydrazones. / Heytler. // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 1962. – №7. – C. 272–275.
92. Hinkle P. C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation / Hinkle. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – №1706. – C. 1–11.
93. Horbay R. O. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma. / [R. O. Horbay, B. O. Manko, V. Manko et al.]. // *Cell Biol Int.* – 2012. – №36. – C. 71–77.
94. Hreniukh V. Influence of bafilomycin and NAADP on respiration of mitochondria and ATPase activity of postmitochondrial fraction of the mouse Nemeth-



Kellner lymphoma/ V. Hreniukh, S. Bychkova, A. Babsky // Cell Biochem. Funct. (Great Britain) – 2015.

95. Huang W A proposed role for glutamine in cancer cell growth through acid resistance / [ Huang W., Choi W., Chen Y. et al]// Cell Res. – 2013. – Vol. 23, № 5. – P.724– 727.

96. Huertas J. R. Virgin olive oil and coenzyme Q10 protect heart mitochondria from peroxidative damage during aging / [J. R. Huertas, E. Martinez-Velasco, S. Ibáñez et al.]. // BioFactors. – 1999. – №9. – C. 337–343.

97. Hunter D. R. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. / D. R. Hunter, R. A. Haworth, J. H. Southard. // J Biol Chem. – 1976. – №251. – C. 5069–5077.

98. Hussein Y.R. Glut-1 Expression Correlates with Basal-like Breast Cancer / [Hussein Y.R., Bandyopadhyay S., Semaan A et al.]// Transl Oncol. – 2011. – Vol. 4. № 6. – P. 321–327.

99. Huttemann M. Mammalian subunit IV isoforms of cytochrome c oxidase / M. Huttemann, B. Kadenbach, L. I. Grossman. // Gene. – 2001. – №267. – C. 111–123.

100. IbsenK. The Crabtree effect: a review / Ibsen. // Cancer Res. – 1961. – №21. -C. 829-841.

101. Ichikawa Y. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation / [Y. Ichikawa, M. Ghanefar, M. Bayeva] // J Clin Invest. –2014. – №.124. – C. 617-630.

102. Isidoro A. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis / [A.Isidoro, F.Casado.,A.Redono et al.] // Carcinogenesis . -2005. –№26. – C. 2095-2104.

103. Jaffe E. S. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research / Jaffe. // Hematology Am Soc Hematol Educ Program. – 2009. – C. 523–531.

104. Jaruga E. Glutathione-independent mechanism of apoptosis inhibition by curcumin in rat thymocytes / E. Jaruga, A. Bielak-Z`mijewska, E. Sikora. // Biochem Pharmacol. – 1998. – №56. – C. 961–965.

105. Jung D. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus / D. Jung, C. Giallourakis, R. Mostoslavsky, F. W. Alt. // *Annu Rev Immunol.* – 2006. – №24. – C. 5541–570.
106. Kaminsky V. Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells. / [V. Kaminsky, K. W. Lin, E. Filyak et al.]. // *Cell Biol Int.* – 2008. – №32. – C. 271–277.
107. Kaufmann S. H. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy / S. H. Kaufmann, W. C. Earnshaw. // *Exp Cell Res.* – 2000. – №256. – C. 42–49.
108. Khunderyakova N.V. Hyperactivation of succinate dehydrogenase in lymphocytes of newborn rats / [N. V. Khunderyakova, M. V. Zakharchenko, A. V. Zakharchenko, M. N. Kondrashova]/*Biochemistry (Mosc).* –2008. –№73. –C.337-341.
109. Kielley R. T. Oxidative phosphorylation by mitochondria of transplantable mouse hepatoma and mouse liver / Kielley. // *Cancer Research.* – 1952. – №12. – C. 124–128.
110. Kim J. S. Role of reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysregulation in 3-bromopyruvate induced cell death in hepatoma cells: ROS-mediated cell death by 3-BrPA / [J. S. Kim, K. J. Ahn, J. A. Kim, et al.]. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2008. – №40. – C. 607–618.
111. Kim. J. W. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia / [J. W. Kim, I. Tchernyshyov, G. L. Semenza et al.]. // *Cell Metab.* – 2006. – №3. – C. 177–185.
112. King A. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer / A. King, A. Selak, E. Gottlieb // *Oncogene.* – 2006. – №25. – C. 4675–4682.
113. Ko Y. H. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase / Y. H. Ko, P. L. Pedersen, J. F. Geschwind. // *Cancer Lett.* – 2001. – №173. – C. 83–91.
114. Kondrashova M.N. Succinic acid oxidation as the only energy support of intensive  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by mitochondria / [M. N. Kondrashova, V. G. Gogvadze, B. I.

Medvedev, A. M. Babsky]// *Biochem Biophys Res Commun.* –1982. –№30. –С. 376-381.

115. Korynevskaya A. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E / [A. Korynevskaya, P. Heffete, B. Matselyukh et al.]. // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – №74. – С. 1713–1726.

116. Korynevskaya A. V. In vitro study of landomycin E antitumor activity / A. V. Korynevskaya, B. P. Matselyukh, R. S. Stoika. // *Експеримент. Онкологія.* – 2003. – №25. – С. 98–105.

117. Krebs H. A. Energy transformations in living matter / H. A. Krebs, H. L. Kornberg. – Berlin: Springer, 1957.

118. Krebs H. A. The History of the Tricarboxylic Acid Cycle / Krebs. // *Persp. Biol. Med.* – 1970. – №14. – С. 54–170.

119. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an overview / Kroemer. // *Biochem Soc Symp.* – 1999. – №66. – С. 1–15.

120. Kroemer G. The biochemistry of programmed cell death / [G. Kroemer, P. Petit, N. Zamzami et al.]. // *FASEB J.* – 1995. – №9. – С. 1277–1287.

121. Kumar D. Apoptosis in isolated adult cardiomyocytes exposed to Adriamycin. / D. Kumar, L. Kirshenbaum, T. Li. // *Ann NY Acad Sci.* – 1999. – №874. – С. 156–168.

122. Kuppers R. Developmental and functional biology of B lymphocytes. / Kuppers // *Non-Hodgkin lymphomas* / Kuppers. – Philadelphia: PA, 2010. – (2). – С. 26–40.

123. Lardy P. Energetic coupling and regulation of metabolic rates / P. Lardy. // *Congr. Intern. Biochem. Report, Brussels.* – 1955. – С. 287–293.

124. Larochette N. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore / [N. Larochette, D. Decaudin, E. Jacotot et al.]. // *Exp. Cell Res.* – 1999. – №239. – С. 413–421.

125. Lee H. C. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP)-mediated Calcium Signaling / Hon Cheung Lee. // *The Journal Of Biological Chemistry.* – 2005. – №280. – С. 33693–33696.

126. Lenaz G. Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defects / G.Lenaz, C. Bovina, G. Formiggini, G. Parenti Castelli. // *Acta Biochim Polon.* – 1999. – №46. – C. 1–21.
127. Lenaz G. Mitochondrial bioenergetics in aging / [G. Lenaz, M. D'Aurelio, M. Merlo Pich et al.]. // *Biochim Biophys Acta.* – 2000. – №1459. – C. 397–404.
128. Lenz G.. Aggressive lymphomas / G/ Lenz, L.M.Staudt. // *Engl J Med.* – 2010. -№ 362. –C. 1417-1429.
129. Lopez-Lazaro M. The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? / Lopez-Lazaro. – 2008. – C. 305–312.
130. Lopez-Rios F. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas / [F.Lopez-Rios, M. Sanchez-Arago., E. Garcia-Garcia et al.] // *Cancer Res.* -2007. –№67. – C. 9013-9017.
131. Lowry O. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. Lowry, N. Rosebroughh, A. Farr. // *The Journal of Biological Chemistry.* – 1951. – №193. – C. 265–275.
132. Lu H. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis / H. Lu, R. A. Forbes, A. Verma. // *Journal of Biological Chemistry.* – 2007. – №277. – C. 23111–23115.
133. MacDonald M. J. Insulin release in pancreatic islets by a glycolytic and a Krebs cycle intermediate: contrasting patterns of glyceraldehyde phosphate and succinate / M. J. MacDonald, L. A. Fahien. // *Arch Biochem Biophys.* – 1990. – №279. – C. 104–108 .
134. Macheda M.L. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer / Macheda M.L., Rogers S., Best J.D. // *J Cell Physiol.* – 2005. – Vol. 202, № 3. – P. 654-662.
135. Magpusao A. N. Cardiac glycoside activities link  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ion-transport to breast cancer cell migration via correlative SAR./[ A.N. Magpusao, G. Omolloh, J. Johnson et al.]// *ACS Chem. Biol.* – 2014. -№ 10. - C. 561–569.

136. Mannella C. A. Toward the molecular structure of the mitochondrial channel, VDAC. / C. A. Mannella, M. Forte, M. Colombini. // *J Bioenerg Biomembr.* – 1992. – №24. – С. 7–19.
137. Martinou J. C. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing / J. C. Martinou, S. Desagher, B. Antonsson. // 2. – 2000. – С. 41–43.
138. Matoba S. p53 Regulates Mitochondrial Respiration / [S. Matoba, J. Kang, W. D. Patino et al.]. // *Science.* – 2006. – №312. – С. 1650–1655.
139. McConkey D. S. The role of calcium in the regulation of apoptosis / D. S. McConkey, S. Orrenius. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – №239. – С. 357–366.
140. Michelakis E. D. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer / E. D. Michelakis, L. Webster, J. R. Mackey. // *Br. J. Cancer.* – 2008. – №99. – С. 989–994.
141. Miquel J. Mitochondrial role in cell aging / J. Miquel, A. C. Economos, J. Fleming, J. E. Johnson. // *Exp Gerontol.* – 1980. – №15. – С. 575–591.
142. Mizuno Y. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease / [Y. Mizuno, H. Yoshino, S. Ikebe et al.]. // *Ann Neurol.* – 1998. – №44. – С. 99–109.
143. Moll U. M. P53 an acrobat in tumorigenesis / U. M. Moll, L. M. Schramm. // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* – 1998. – №9. – С. 23–37.
144. National Cancer Institute Hodgkin Lymphoma SEER Stat Fact Sheets [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа до ресурсу: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/hodg.html>.
145. National Cancer Institute SEER Stat Fact Sheets: Non-Hodgkin Lymphoma [Электронный ресурс]. – 2014. – Режим доступа до ресурсу: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/nhl.html>.
146. Nelson D. L. Lehninger Principles of Biochemistry / D. L. Nelson. M. M. Cox., 2008. – 1100 с. – (5).
147. Nemeth L. A new mouse ascites tumour to be used as a screening tool / L. Nemeth, B. Kellner. // *Neoplasma.* – 1961. – №8. – С. 337–343.

148. Nutt L. K. Indirect effects of Bax and Bak initiate the mitochondrial alterations that lead to cytochrome c release during arsenic trioxide-induced apoptosis / [L. K. Nutt, V. W. Gogvadze, W. Uthaisang et al.]. // *Cancer Biol. Ther.* – 2005. – №4. – C. 459–467.
149. Ott M. The Mitochondrial TOM Complex Is Required for tBid/Bax-induced Cytochrome c Release. / [M. Ott, E. Norberg, K.M. Walter et al.]. // *J Biol Chem.* – 2007. – №282. – C. 27633-27639.
150. Ottino P. Effect of alpha-tocopherol succinate on free radical and lipid peroxidation levels in BL6 melanoma cells / P. Ottino, J. R. Duncan. // *Free Radic. Biol. Med.*. – 1997. – №22. – C. 1145–1151.
151. Packer L. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant / L. Packer, E. H. Witt, H. J. Tritschler. // *Free Radic Biol Med.* – 1995. – №19. – C. 227–250.
152. Palmieri F. Mitochondrial substrate carriers / [F. Palmieri, F. Bisaccia, V. Iacobazzi et al.]. // *Biochim Biophys Acta.* – 1992. – №1101. – C. 223–227.
153. Panchuk R. Angucycline antibiotics of landomycin family as antineoplastic agents: role of reacti / [R. Panchuk, L. Lehka, P. Heffeter et al.]. // *5th Ukrainian-Polish Weigl Conference Chernivtsi.* – 2013. – C. 19.
154. Panchuk R. R. Changes in signaling pathways of cell proliferation and apoptosis during NK/Ly lymphoma aging / [R. R. Panchuk, N. M. Boiko, M. D. Lootsik et al.]. // *Cell Biology International.* – 2008. – №32. – C. 1057–1063.
155. Panchuk R.R. Tumor ageing in murine lymphoma NK/Ly: cytokine expression and cytomorphological study / R.R. Panchuk, N.M.Boiko, M.D. Lootsik, R.S.Stoika // *Central European Journal of Biology.* – 2007. Vol. 2, №1. – P. 71-86.
156. Papandreou I. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption / [I. Papandreou, R. A. Cairns, L. Fontana et al.]. // *Cell Metab.* – 2006. – №3. – C. 187–197.
157. Paul S. The relationship between the rate of respiration and the protonmotive force / S. Paul, P. S. O'Shea, B. J. Chappell. // *Biochem. J.* – 1984. – №219. – C. 401–404.

158. Pedersen P. L. A comparison of some ultrastructural and biochemical properties of mitochondria from Morrishe patomas 9618A, 7800, and 3924A. / [P.L. Pedersen, J.W. Greenawalt, T.L, Chan et al.] // *Cancer Res.* -1970. –№67. – C. 2620-2626.
159. Pelicano H. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism / [H. Pelicano, R. Xu, M. Du et al.]. // *The Journal of Cell Biology.* – 2006. – №175. – C. 913–923.
160. Pelicano R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species imbalance promote breast cancer cell motility through a CXCL14-mediated mechanism.. / [R. Pelicano, W. Lu, Y. Zhou et al.]. // *Cancer Res.* – 2009. – №15. – C. 2375–2383.
161. Perovic S. Flupirtine increases the levels of glutathione and Bcl-2 in hNT (human Ntera/D1) neurons: mode of action of the drug-mediated anti-apoptotic effect / [S. Perovic, P. Pialoglou, H. C. Schröder et al.]. // *Eur J Pharmacol.* – 1996. – №317. – C. 157–164.
162. Pochini L. Membrane transporters for the special amino acid glutamine: structure/function relationships and relevance to human health / [Pochini L., Scalise M., Galluccio M. et al.] // *Front Chem.* – 2014, – Vol. 2. № 61, – C. 1-23
163. Prasad K. N. Effects of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. / K. N. Prasad, J. Edwards-Prasad. // *Cancer Res.* – 1982. – №42. – C. 550–555.
164. Prashant M. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics / Prashant Mishra, David C. Chan // *The Journal of Cell Biology.* – 2016. – Vol. 212, №4. – C. 379-387.
165. Preston T. J. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development / T. J. Preston, A. Abadi, L. Wilson, G. Singh. // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2011. – №49. – C. 45–61.
166. Qian M. RRR-alpha-tocopheryl succinate induces apoptosis in avian retrovirus-transformed lymphoid cells / M. Qian, B. G. Sanders, K. Kline. // *Nutr. Cancer.* – 1996. – №25. – C. 9–26.

167. Raha S. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing / S. Raha, B. H. Robinson. // *Trends Biochem Sci.* – 2000. – №25. – C. 502–508.
168. Ravagnan L. Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore / [L. Ravagnan, I. Marzo, P. Costantini et al.]. // *Oncogene.* – 1999. – №18. – C. 1427-1439.
169. Ricci F. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability / F. Ricci, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone. // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2003. – №18. – C. 165–174.
170. Rodriguez-Nieto S. Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment / S. Rodriguez-Nieto, B. Zhivotovsky. // *Curr Pharm Des.* – 2006. – №12. – C. 4411–4425.
171. Rognstad R. Gluconeogenesis in rat hepatocytes from monomethyl succinate and other esters. / Rognstad. // *Arch Biochem Biophys.* – 1984. – №230. – C. 605–609.
172. Rupnow B. J. The role of radiation-induced apoptosis as a determinant of tumor responses to radiation therapy / B. J. Rupnow, S. Knox. // *Apoptosis.* – 1999. – №4. – C. 115–143.
173. Salomon A.R. Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of  $F_{(0)}F_{(1)}$ -ATPase. / A.R. Salomon, D.W. Voehringer, L.A. Herzenberg, C. Khosla, // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 200. -№97. – C. 14766-14771.
174. Sastre J. Mitochondria, oxidative stress and aging / J. Sastre, F. V. Pallardó, J. García de la Assunción, J. Viña. // *Free Radic Res.* – 2000. – №32. – C. 189–198.
175. Schapira A. H. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia / Schapira. // *Biochim Biophys Acta.* – 1999. – №1410. – C. 159–170.
176. Schell J. The long and winding road to the mitochondrial pyruvate carrier / J. Schell, J. Rutter. // *Cancer Metab.* – 2013. – №1. – C. 1–6.
177. Schell J.C. A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the Warburg effect and colon cancer cell growth / [Schell J.C., Olson K.A., Jiang L. et al] // *Mol. Cell.* – 2014. – Vol. 56, № 3. – P. 400-413



178. Schmidt-Mende J. Early mitochondrial alterations in ATRA-induced cell death / J.Schmidt-Mende, V. Gogvadze, E. Hellstrom-Lindberg, B. Zhivotovsky. // *Cell Death Differ.* – 2006. – №13. – C. 119–128.
179. Schulz T. J. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited / [T. J. Schulz, R. Thierbach, A. Voigt et al.]. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – №281. – C. 977–981.
180. Semenza G. L. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. / [G. L. Semenza, B. H. Jiang, S. W. Leung et al.]. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – №271. – C. 32529–32537.
181. Semenza G. L. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1 / Semenza. // *Biochem. J.* – 2007. – №405. – C. 1–9.
182. Semenza G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy / Semenza. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2003. – №3. – C. 721–732.
183. Shi H. Dynamics of antioxidant action of ubiquinol: a reappraisal / H. Shi, N. Noguchi, E. Niki. // *BioFactors.* – 1999. – №9. – C. 141–148.
184. Sies H. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids / H. Sies, W. Stahl, A. R. Sundquist. // *Ann NY Acad Sci.* – 1992. – №669. – C. 7–2.
185. Simmonet H. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* / [H. Simmonet, N. Alazard, K.Pfeiffer et al.] // *Carcinogenesis* . -2002. –№23. – C. 759-768.
186. Singal P. K. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation / [P. K. Singal, T. Li, D. Kumar et al.]. // *Mol Cell Biochem.* – 2000. – №207. – C. 77–86.
187. Skulachev V. P. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis / Skulachev. // *Apoptosis.* – 2006. – №11. – C. 473–4738.
188. Skulachev V. P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants / Skulachev. // *Q Rev Biophys.* – 1996. – №29. – C. 169–202.

189. Slyshenkov V. S. Noxious effects of oxygen reactive species on energy coupling processes in Ehrlich ascites tumor mitochondria and the protection by pantothenic acid / V. S. Slyshenkov, A. G. Moiseenok, L. Wojtczak. // *Free Radic Biol Med.* – 1996. – №20. – C. 793–800.
190. Slyshenkov V. S. Pantothenic acid protects Jurkat cells against ultraviolet-induced apoptosis / V. S. Slyshenkov, K. Piwocka, E. Sikora, L. Wojtczak. // 2011. – №30. – C. 1303–1310.
191. Sokolove P. M. Interactions of Adriamycin aglycones with mitochondria may mediate Adriamycin cardiotoxicity / Sokolove. // *Int J Biochem.* – 1994. – №26. – C. 1341–1350.
192. Souba W.W. Glutamine and cancer // *Ann Surg.* – 1993. – Vol. 218, № 6. – P. 715-728.
193. Stock C. A. Protons make tumor cells move like clockwork./ C. Stock, A. Schwab // *Pflugers Arch.* -2009. -№ 458. -C 981–992
194. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese dismutase / S.Raha, G. E. McEachern, A. T. Myint, B. H. Robinson. // *Free Radic Biol Med.* – 2000. – №29. – C. 170–180.
195. Taylor E. J. *Dorland's Illustrated medical dictionary (29th ed.)* / Elizabeth Taylor. – Philadelphia: Saunders,. – 1038 c.
196. Thastrup O. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase / [O. Thastrup, P. J. Cullen, B. K. Drøbak et al.]. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1990. – №87. – C. 2466–2470.
197. *The Lymphoma Guide: Information for Patients and Caregivers*, 2013. – 46 c.
198. Tinari A. Mitoptosis Different Pathways for Mitochondrial Execution / [A. Tinari, T. Garofalo, M. Sorice et al.]. // *Autophagy.* – 2007. – №3. – C. 282–284.
199. Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase / F. Ursini, M. Maiorino, C. Gregolin. // *Int J Tissue React.* – 1986. – №8. – C. 99–103.

200. Vander Heiden M. G. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation / M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, C. B. Thompson. // *Science*. – 2009. – №324. – C. 1029–1033.
201. Wahrheit J. High-throughput respiration screening of single mitochondrial substrates using permeabilized CHO cells highlights control of mitochondria metabolism / [J. Wahrheit, Y. Nonnenmacher, S. Sperber et al.] // *Engineering in Life Sciences*. – 2015. – № 15. – C. 184-194.
202. Wallace D. C. Mitochondria and cancer / Wallace. // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – №12. – C. 685–698.
203. Wallace K. B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. / Wallace. // *Pharmacol Toxicol.* – 2003. – №93. – C. 105–115.
204. Wang G. L. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. / G. L. Wang, G. L. Semenza. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – №90. – C. 4304–4308.
205. Wang T. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation / T. Wang, C. Marquardt, C., J. Foker. // *Nature*. – 1976. – №261. – C. 702-705
206. Warburg O. The Prime Cause and Prevention of Cancer / Warburg. // *Triltsch*. – 1967. – C. 6–16.
207. Warburg O. Über den Stoffwechsel der Tumore / Warburg. – Berlin: Springer., 1930.
208. Waring P. Cyclosporin A rescues thymocytes from apoptosis induced by very low concentrations of thapsigargin: effects on mitochondrial function / P. Waring, J. Beaver. // *Exp Cell Res*. – 1996. – №227. – C. 264–276.
209. Waterhouse C. Lactate metabolism in patients with cancer / Waterhouse. // *Cancer*. – 1974. – №33. – C. 66–71.
210. Williams M. E. Lymphoma: Pathology, Diagnosis, and Treatment / M. E. Williams, R. Marcus, J. W. Sweetenham. – Cambridge: Cambridge University Press, 2014. – 319 c. – (Cambridge Medicine).
211. Wojtczak L. Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for

mitochondrial energetics. Further arguments for the role of  $\text{Ca}^{(2+)}$  in the mechanism of the crabtree effect. / [L. Wojtczak, V. V. Teplova, K. Bogucka et al.]. // Eur. J. Biochem. – 1999. – №263. – C. 495–501.

212. Wojtczak L. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane / L. Wojtczak, M. R. WieIckowski. // J Bioenerg Biomembr. – 1999. – №31. – C. 447–455.

213. Wolvetang E. J. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis / [E. J. Wolvetang, K. L. Johnson, K. Krauer et al.]. // FEBS Lett. – 1994. – №339. – C. 40–44.

214. Wong J. Y. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells / [J. Y. Wong, G. S. Huggins, M. Debidda et al.]. // Gynecol. Oncol. – 2008. – №109. – C. 394–402.

215. Xiao D. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells / D. Xiao, A. A. Powolny, S. V. Singh. // J. Biol. Chem. – 2008. – №283. – C. 30151–30163.

216. Xu Z. W. Targeting the  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  -ATPase alpha1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting. / [Z.W. Xu, F.M. Wang, M.J. Gao et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2010. - № 33. –C. 743–751.

217. Yu W. RRR-alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves Bax translocation to mitochondria / W. Yu, B. G. Sanders, K. Kline. // Cancer Res.. – 2003. – №63. – C. 2483–2491.

218. Zhu L. P. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in the regulation of apoptotic and necrotic cell death / [L. P. Zhu, X. D. Yu, S. Ling et al.]. // Cell Calcium. – 2000. – №28. – C. 107–117.