

ВПЛИВ ЛАНДОМІЦИНУ А НА ДИХАННЯ ТА ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ МІТОХОНДРІЙ

В. Гренюх¹, Л. Легка², О. Єлісеєва³, Р. Панчук², Р. Стойка², А. Бабський¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

²Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

³Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна
e-mail: grenuh@gmail.com

Ландоміцин А є ефективним протираковим антибіотиком ангуциклінового ряду. Досліджували вплив ландоміцину А на дихання й окисне фосфорилювання мітохондрій печінки щура, виділених методом диференційного центрифугування. Параметри реєстрували за допомогою електрода Кларка. Як екзогенні енергетичні субстрати використовували НАД-залежний α -кетоглутарат і ФАД-залежний сукцинат. За окиснення α -кетоглутарату препарат знижував швидкість дихання у метаболічному стані 3, співвідношення АДФ/О і швидкість окисного фосфорилювання. За окиснення сукцинату спостерігали тенденцію реципрокних до α -кетоглутарату змін АДФ/О. Отримані результати дають підстави стверджувати, що ландоміцин А інгібує діяльність мітохондрій за окиснення НАД-залежних субстратів.

Ключові слова: ландоміцин А, мітохондрії печінки, дихання, окисне фосфорилювання, АДФ/О.

Резистентність ракових клітин до хіміотерапії визначається енергетичним станом мітохондрій (МХ), інтенсивністю їх дихання та спряженням дихання й окисного фосфорилювання [7, 8]. Модуляція енергетичних параметрів пухлинних клітин за допомогою антиракових препаратів може мати хороші перспективи у лікуванні раку. Важливу роль у цьому відіграють мітохондрії, залучені в апоптозні та вільнорадикальні процеси, до процесів енергозабезпечення й адаптації клітин до гіпоксії [9]. Відомо, що ракові клітини надають перевагу гліколітичному типу метаболізму, навіть за достатнього забезпечення клітин киснем [9]. На сьогодні МХ є важливою мішенню у розробці нових хіміотерапевтичних препаратів, зокрема завдяки їхньому безпосередньому зв'язку з апоптозом [5].

Антибіотики групи ландоміцинів (родина ангуциклінів) використовують як антиракові препарати з яскраво вираженими проапоптичними та прооксидативними властивостями [10, 11, 13]. Ландоміцин А має найбільшу активність порівняно з речовинами свого ряду. Проте досі невідомо, як саме цей препарат впливає на біоенергетичні параметри МХ. Тому метою даної роботи було дослідити вплив ландоміцину А на параметри дихання й окисного фосфорилювання МХ печінки щура.

Матеріали та методи

Досліди виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах виварію за постійної температури на основному раціоні. Тварин наркотизували хлороформом, після чого декапітували, робили розтин очеревини і швидко вирізали печінку. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською

конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, і Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Мітохондрії печінки щурів виділяли методом диференційного центрифугування із модифікаціями, що дає змогу зберегти нативність ізольованих органел. Для цього печінку після виділення зважували та перфузували розчином такого складу (мМ): NaCl – 140, KCl – 4,7, MgCl₂ – 1, глюкоза – 5, HEPES – 10; рН 7,4 для видалення крові. Охолоджену і відперфузовану печінку подрібнювали через металевий прес і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма зі швидкістю 800 об/хв за трьох вертикальних ходів товкачика у співвідношенні 1 г тканини до 8 мл середовища гомогенізації. Середовище гомогенізації містило (мМ): сахарозу – 250, ЕГТА – 1, HEPES – 10; рН 7,2. Гомогенат центрифугували 3 хв за 150 г і 5 хв за 300 г без зупинки центрифуги для осадження ядерної фракції. Мітохондріальну фракцію отримували з надосадової рідини центрифугуванням супернатанту впродовж 15 хв за 4500 г і температурі 0–2°C. Отриманий осад МХ ресуспензували середовищем виділення у співвідношенні 1 г тканини до 0,1 мл середовища. Отриману суспензію мітохондрій зберігали у пробірці на льоді та використовували для подальших досліджень. Концентрацію мітохондріального білка вимірювали за методом О. Лоурі [12]. Усі етапи виділення провадили за температури 0–4°C.

Швидкість поглинання кисню реєстрували полярографічним методом за температури 25°C [4]. Для цього в полярографічну комірку об'ємом 1,4 мл послідовно вносили середовище інкубації, субстрат окиснення і 140 мкл суспензії мітохондрій. Ландоміцин А додавали у комірку через ~ 20 с після МХ з розрахунку кінцевих концентрацій антибіотика 1 і 2 мкМ. Середовище інкубації містило (мМ): сахарозу – 250, K₂HPO₄ – 2, ЕГТА – 0,1, MgCl₂ – 1, HEPES – 10; рН 7,2. Концентрація мітохондріального білка у комірці становила 5–8 мг/мл. Як субстрати окиснення використовували α-кетоглутарат (1 мМ) і сукцинат (0,35 мМ). Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці становила 200 мкмоль/л).

За полярограмами визначали швидкість дихання в метаболічних станах 2 (дихання за відсутності АДФ), 3 (дихання за наявності АДФ) і 4 (дихання після додавання АДФ) [4, 6], розраховували дихальний контроль (ДК, відношення швидкості дихання у стані 3 до швидкості дихання у стані 4 – за Чансом, і відношення швидкості дихання у стані 3 до швидкості дихання у стані 2 – за Ларді), ефективність (АДФ/О), час (T_p) і швидкість (V_p) окисного фосфорилування.

Полярографічні криві аналізували за допомогою авторської програми на базі математичного процесора MATLAB [1]. Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Стьюдентом. За статистично достовірні приймали зміни з P<0,05 [2].

Препарат ландоміцину А був люб'язно наданий професором Юджином Рором (Jurgen Rohr) із Кентуккського фармацевтичного університету.

Результати і їхнє обговорення

Порівняння енергетичних параметрів контрольних МХ печінки (без ландоміцину А) за додавання у полярографічну комірку сукцинату й α-кетоглутарату підтвердило певні відмінності низки енергетичних показників за окиснення цих субстратів [3]. Як видно з табл. 1 та рис. 1 і 2, швидкості дихання контрольних МХ у метаболічних станах 2 і 4 були трохи вищими за окиснення сукцинату, натомість V₃ за окиснення обох субстратів не відрізнялися. Співвідношення АДФ/О було на 28–30% вищим за окиснення α-кетоглутарату, в той час як швидкість і час фосфорилування за окиснення обох субстратів достовірно

не відрізнялась. Оскільки швидкості дихання у метаболічних станах 2 і 4 достовірно не відрізнялися, 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 МХ дихальні контролі (2,5–3), опосередковано засвідчують повну відновлюваність переносників електронів у дихальному ланцюгу після фосфорилування доданого у комірку АДФ і функціональну цілісність мітохондріальних мембран виділених органел.

На рис. 1 і табл. 1 наведено швидкості дихання мітохондрій печінки (V_2 , V_3 і V_4) у метаболічних станах 2, 3 та 4 за окиснення α -кетоглутарату без (Контроль) і за додавання у полярографічну комірку 1 і 2 мкМ ландоміцину А. Слід зазначити, що протипухлинний препарат додавали до МХ у метаболічному стані 2: через 1–2 хв після внесення у комірку органел і за 1 хв до додавання АДФ. За цих умов ландоміцин А в обох концентраціях не змінював швидкість V_2 . Як видно з рис. 1 і табл. 1, препарат достовірно ($P < 0,05$) інгібував швидкість дихання на 40–42% в активному метаболічному стані (V_3). Цей ефект спостерігали за дії обох доз препарату. Натомість ландоміцин А достовірно не впливав на швидкість контрольованого дихання V_4 .

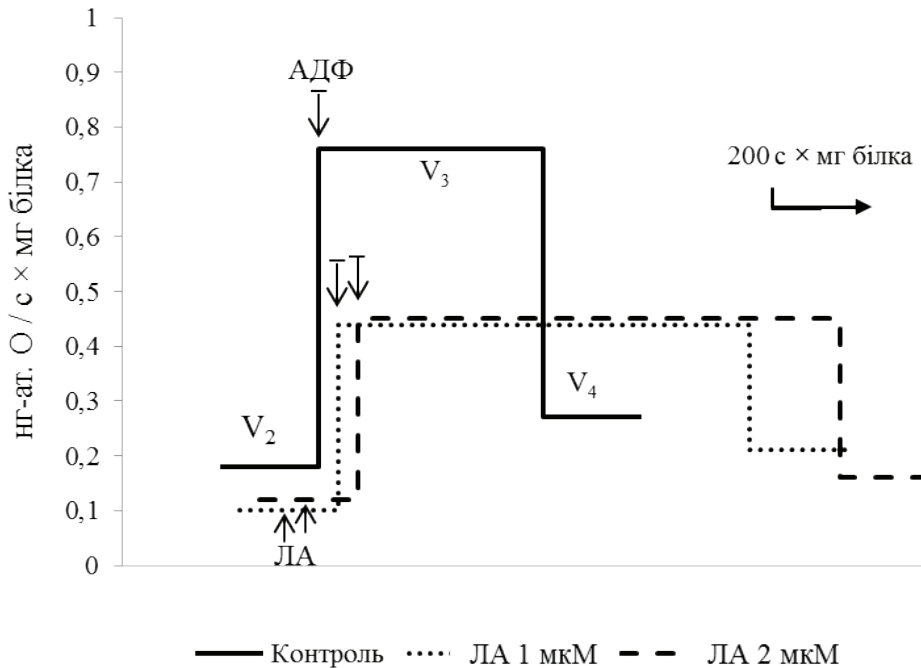


Рис. 1. Вплив ландоміцину А (ЛАН) на швидкості дихання мітохондрій печінки у різних метаболічних станах за окиснення α -кетоглутарату. Наведено усереднені дані ($n=5$). Стандартні похибки і показники достовірності див. у табл. 1.

На рис. 2 і табл. 1 наведено швидкості дихання мітохондрій печінки у метаболічних станах 2, 3 і 4 за окиснення сукцинату без (Контроль) і за додавання у полярографічну комірку ландоміцину А. Як видно, за окиснення ФАД-залежного субстрату єдиним показником, який мав тенденцію до зниження ($P < 0,12$), була швидкість V_3 після додавання 2 мкМ препарату. Усі інші швидкості дихання за окиснення сукцинату не змінювалися. Таким чином, можна припустити вибірковий інгібуючий ефект ландоміцину А на перший комплекс дихального ланцюга у МХ.

Таблиця 1

Вплив ландоміцину А (ЛА) на швидкості дихання мітохондрій печінки у різних метаболічних станах

	V ₂		V ₃		V ₄	
	α-кетоглутарат	сукцинат	α-кетоглутарат	сукцинат	α-кетоглутарат	сукцинат
Контроль	0,18±0,03	0,25±0,04	0,76±0,11	0,74±0,14	0,27±0,05	0,30±0,07
ЛА 1 мМ	0,10±0,01	0,29±0,04	0,44±0,04*	0,78±0,06	0,21±0,02	0,30±0,05
ЛА 2 мМ	0,12±0,03	0,23±0,02	0,45±0,06*	0,47±0,03	0,16±0,02	0,23±0,029

Примітки. * – статистично достовірні зміни порівняно з контролем, P<0,05 (M±m, n=5). Швидкості дихання наведені у нг-ат. О/с × мг білка.

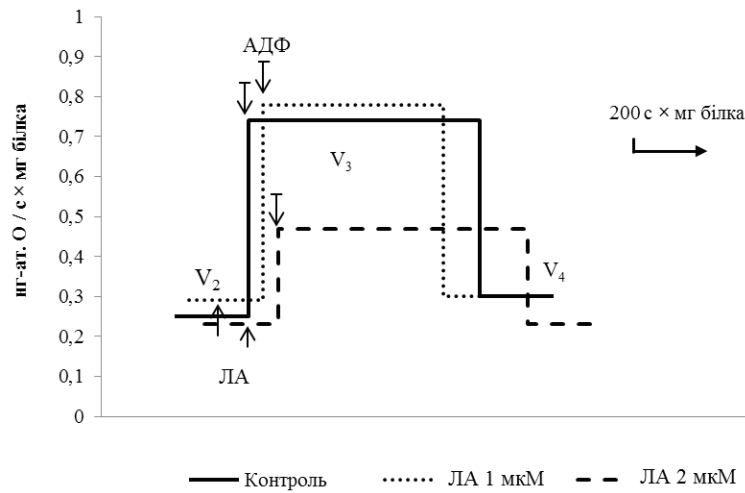


Рис. 2. Вплив ландоміцину А (ЛА) на швидкості дихання мітохондрій печінки у різних метаболічних станах за окиснення сукцинату. Наведено усереднені дані (n=5). Стандартні похибки і показники достовірності див. у табл. 1.

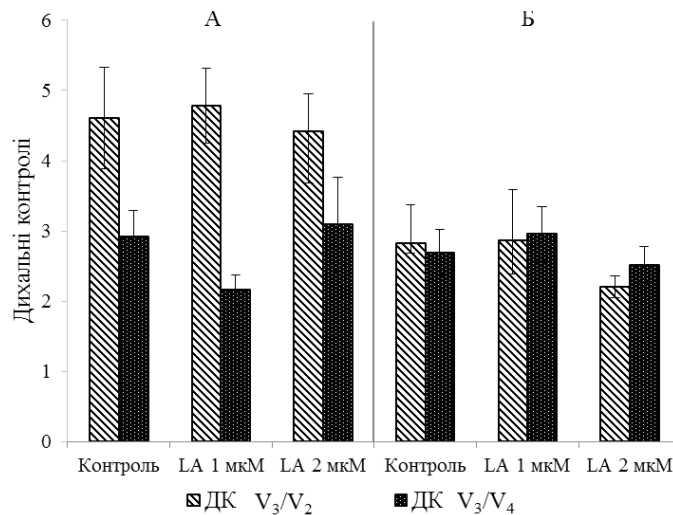


Рис. 3. Дихальні контролі (ДК) у мітохондріях печінки за окиснення α-кетоглутарату (А) і сукцинату (Б) та впливу ландоміцину А (ЛА). (M±m, n=5).

Для підтвердження цієї гіпотези слід було обчислити значення дихальних контролів, АДФ/О, швидкості й часу фосфорилування. Ці параметри дають змогу комплексно оцінити ступінь спряження процесів дихання і окисного фосфорилування. Було обчислено співвідношення дихального контролю за Ларді (V_3/V_2) і за Чансом (V_3/V_4). Як видно із рис. 3, додавання ландоміцину А не спричинило достовірних змін цих параметрів, незалежно від доданої у комірку дози препарату (1 чи 2 мкМ) і субстрату окислення (α -кетоглутарату (А) чи сукцинату (Б)).

Безпосередньо про спряження дихання і фосфорилування свідчить співвідношення АДФ/О [6]. Воно відображає кількість кисню, яка витрачається на фосфорилування доданої АДФ. Вплив ландоміцину А на цей показник наведено на рис. 4. Видно, що за окиснення α -кетоглутарату АДФ/О достовірно знижувався порівняно з контролем на 13% ($P<0,02$) за додавання ландоміцину А в концентрації 1 мкМ і на 17% за додавання 2 мкМ ландоміцину А ($P<0,05$). За окиснення сукцинату значення АДФ/О, навпаки, зростало, проте ці зміни були тільки близькі до показників достовірності ($P<0,12$), що свідчить про зниження ландоміцином ефективності фосфорилування лише за окиснення α -кетоглутарату.

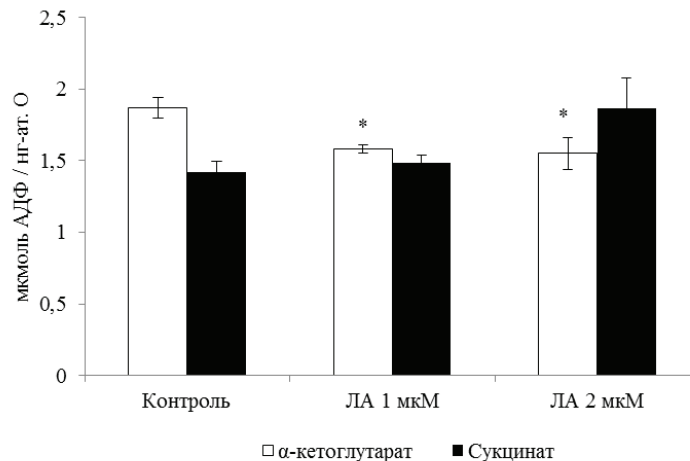


Рис. 4. Вплив ландоміцину А (ЛА) на АДФ/О у мітохондріях печінки ($M \pm m$, $n=5$). * – статистично достовірні зміни порівняно з контролем ($P<0,05$).

Вплив ландоміцину А був виявлений і за аналізу швидкості фосфорилування АДФ, яка відображає швидкість роботи АТФ-синтази у внутрішній мембрані МХ. У контрольних МХ за окиснення α -кетоглутарату швидкість становила $1,4 \pm 0,18$ нмоль АДФ/(мг білка \times с), а за додавання препарату вона сповільнювалася практично удвічі – до $0,7 \pm 0,08$ нмоль АДФ/(мг білка \times с) за 1 мкМ ландоміцину А і до $0,63 \pm 0,08$ нмоль АДФ/(мг білка \times с) за 2 мкМ досліджуваної речовини (рис. 5, А). За окиснення сукцинату швидкість фосфорилування у контролі становила $1,42 \pm 0,07$ нмоль АДФ/мг-ат.О і достовірно не змінювалася за додавання препарату.

Зміни часу фосфорилування були обернено пропорційні до змін V_f , T_f фактично відображає тривалість метаболічного стану 3 (рис. 5, Б). За окиснення НАД-залежного субстрату час фосфорилування зріс з $230 \pm 21,5$ с \times мг білка (контроль) до $417 \pm 30,2$ с \times мг білка (1 мкМ ландоміцину А) і до $490 \pm 89,7$ с \times мг білка (2 мкМ ландоміцину А). За окиснення сукцинату достовірних змін порівняно з контролем ($315 \pm 66,3$ мг білка \times с) за дії обох концентрацій ландоміцину не спостерігали. Таким чином, зміни показника часу фосфорилування підтвердили інгібуючу роль ландоміцину на інтенсивність окисного фосфорилування.

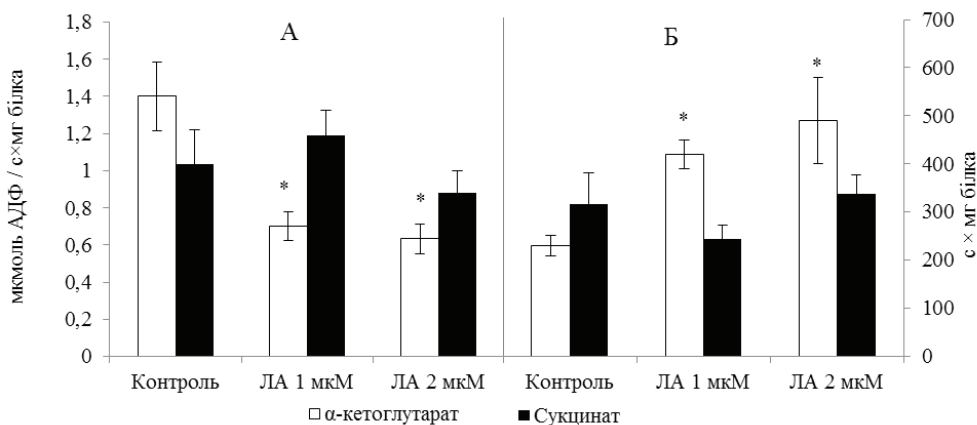


Рис. 5. Вплив ландоміцину А (ЛА) на швидкість (А) та час фосфорилування (Б) у мітохондріях печінки ($M \pm m, n=5$). * – статистично достовірні зміни порівняно з контролем ($P < 0,05$).

Отже, представлені результати свідчать, що ландоміцин А достовірно знижує швидкість дихання у метаболічному стані 3 та параметри спряження дихання й окисного фосфорилування у мітохондріях печінки за окиснення НАД-залежного субстрату α -кетоглутарату. За окиснення ФАД-залежного субстрату сукцинату ландоміцин А викликає тенденцію до змін, що були реципрокними до змін за окиснення α -кетоглутарату (найбільш виражено для АДФ/О). Однак реципрокність дії ландоміцину А за окиснення НАД- і ФАД-залежних субстратів ще потребує додаткових досліджень. Таким чином, можна зробити висновок, що ландоміцин А знижує інтенсивність енергетичних процесів і забезпеченість клітин АТФ. Цей ефект можна брати до уваги за планування хіміотерапії пухлин із цим антибіотиком. Отримані дані проливають світло на отримані раніше дані прооксидативної та проапоптичної дії ландоміцинів на функціонування МХ: зменшення внутрішньоклітинного АТФ, деполяризація мітохондріальної мембрани, активація вільнорадикальних процесів та ін. [6]. Наступним етапом нашої роботи буде вивчення впливу ландоміцинів та інших протипухлинних препаратів на енергетичні показники МХ ракових клітин, зокрема лімфоми Немет-Келнера (NK/Ly).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гренюх В. П., Бабський А. М. Аналіз параметрів дихання та окисного фосфорилування мітохондрій за використання програми MATLAB // 19-й з'їзд Укр. фізіол. тов-ва ім. П.Г. Костюка (Львів, 26–29 травня 2014 р.). Львів, 2014. 14 с.
2. Деркач М., Гумецький Р., Чабан М. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 206 с.
3. Кондрашова М. Взаимодействие процессов переаминирования и окисления карбоновых кислот при разных функциональных состояниях ткани // Биохимия. 1991. Т. 56. № 3. С. 388–405.
4. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / ред. Г.М. Франк. М.: Наука, 1973. 220 с.
5. Фільченков А. А., Стойка Р. С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. 524 с.
6. Chance B., Williams G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state // J. Biol. Chem. 1955. Vol. 217. P. 409–427.

7. *Debatin K., Poncet D., Kroemer G.* Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway // *Oncogene*. 2002. Vol. 12. N 57. P. 8786–8803.
8. *Galluzzi L., Larochette N., Zamzami N., Kroemer G.* Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy // *Oncogene*. 2006. Vol. 25. P. 4812–4830.
9. *Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B.* Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? // *Trends in Cell Biology*. 2008. Vol. 18. N 4. P. 165–173.
10. *Korynevskaya A., Heffeter P., Matselyukh B.* et al. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E // *Biochem. Pharmacol.* 2007. Vol. 74. P. 1713–1726.
11. *Korynevskaya A. V., Matselyukh B. P., Stoika R. S.* *In vitro* study of landomycin E antitumor activity // *Експеримент. онкологія*. 2003. Т. 25. С. 98–105.
12. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. Vol. 193. N 1. P. 265–275.
13. *Panchuk R., Lehka L., Heffeter P.* et al. Angucycline antibiotics of landomycin family as antineoplastic agents: role of reactive oxygen species // 5th Ukrainian-Polish Weigl Conference (Chernivtsi, Ukraine, May 23–25, 2013). Chernivtsi, 2013. P. 19.
14. *Warburg O., Posener K., Negelein E.* Ueber den stoffwechselder Tumoren // *Biochemische Zeitschrift*. 1924. Vol. 152. P. 319–344.

Стаття: надійшла до редакції 02.12.14

доопрацьована 28.01.15

прийнята до друку 29.01.15

EFFECT OF LANDOMYCIN A ON RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA

V. Hreniukh¹, L. Lehka², O. Yelisyeyeva³, R. Panchuk², R. Stoika², A. Babsky¹

¹*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

³*Danylo Halytskyj National Medical University of Lviv
69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine
e-mail: grenuh@gmail.com*

Landomycin A is an effective anticancer antibiotic of anhydrocyclin family. Effect of landomycin A in dose 1 and 2 μM on respiration and oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria has been investigated. Respiration of mitochondria was recorded using Clark electrode. NAD-dependent α -ketoglutarate and FAD-dependent succinate were used as exogenous energy substrates. Landomycin A in both doses reduced the rate of respiration in metabolic State 3, the ratio of ADP/O and the rate of oxidative phosphorylation when α -ketoglutarate was used as substrate. The high dose of landomycin A (2 μM) showed the trend to increase in ADP/O. These results distinctly show that landomycin A inhibits the NAD-dependent oxidation in liver mitochondria.

Keywords: landomycin A, liver mitochondria, respiration, oxidative phosphorylation, ADP/O.

**ВЛИЯНИЕ ЛАНДОМИЦИНА А НА ДЫХАНИЕ И
ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ****В. Гренюх¹, Л. Легка², О. Елисеєва³, Р. Панчук², Р. Стойка², А. Бабский¹**¹*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*²*Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина*³*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина
e-mail: grenuh@gmail.com*

Ландомицин А является эффективным противораковым антибиотиком ангуциклинового ряда. Исследовали влияние ландомицина А на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крысы, выделенных методом дифференциального центрифугирования. Параметры дыхания и окислительного фосфорилирования регистрировали с помощью электрода Кларка. В качестве экзогенных энергетических субстратов использовали НАД-зависимый α -кетоглутарат и ФАД-зависимый сукцинат. При окислении α -кетоглутарата препарат снижал скорость дыхания в метаболическом состоянии 3, соотношение АДФ/О и скорость окислительного фосфорилирования. При окислении сукцината наблюдалась тенденция реципрокных к α -кетоглутарату изменений АДФ/О. Полученные результаты дают основания утверждать, что ландомицин А ингибирует деятельность митохондрий при окислении НАД-зависимых субстратов.

Ключевые слова: ландомицин А, митохондрии печени, дыхание, окислительное фосфорилирование, АДФ/О.