



УДК 576.577+577.121.7

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРІВ ДИХАННЯ ТА ОКИСНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ В МІТОХОНДРІЯХ КЛІТИН ЛІМФОМИ НЕМЕТ-КЕЛЛНЕРА ТА ПЕЧІНКИ МИШІ

**В. Гренюх<sup>1</sup>, М. Луцик<sup>2</sup>, О. Кулачковський<sup>1</sup>, Р. Стойка<sup>2</sup>, А. Бабський<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup> Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна  
e-mail: [grenuh@gmail.com](mailto:grenuh@gmail.com)

Ми досліджували параметри дихання й окисного фосфорилювання у мітохондріях печінки миші та експериментальної мишиної лімфоми NK/Ly. Суспензію мітохондрій отримували методом диференційного центрифугування. Інтенсивність дихання оцінювали за швидкістю поглинання кисню, яку реєстрували полярографічно за допомогою платинового електрода Кларка, використовуючи як субстрати  $\alpha$ -кетоглутарат і сукцинат. Встановлено, що швидкість поглинання кисню мітохондріями печінки миші в досліджуваних метаболічних станах ( $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ ) є вищою, ніж у мітохондрій клітин лімфоми NK/Ly за окиснення субстратів як ФАД, так і НАД-залежних метаболічних шляхів. За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату також виявлено нижчі показники дихального контролю і триваліший час фосфорилювання у пухлинних мітохондріях, порівняно з мітохондріями печінки. За окиснення сукцинату співвідношення АДФ/О було нижчим у мітохондріях лімфоми, що свідчить про знижену ефективність роботи АТФ-синтетази.

**Ключові слова:** мітохондрії, лімфома Немет-Келлнера, печінка миші, дихання, окисне фосфорилювання.

### ВСТУП

Ефективність впливу на пухлинні клітини залежить від скоординованих змін енергетичного метаболізму клітини, мітохондріальної стабільності й інших відповідальних за опірність до апоптозу механізмів, що може визначатись особливостями функціонування мітохондрій ракових клітин [11]. У свій час Отто Варбург припустив, що зниження енергетичного метаболізму мітохондрій може призводити до неопластичних перетворень. У 1926 р. він встановив, що пухлинні клітини продукують АТФ переважно шляхом гліколізу навіть за аеробних умов [31], а також виявив кореляцію між гліколітичним синтезом АТФ і агресивністю ракових клітин [29].

Доведено, що анаеробна утилізація глюкози шляхом гліколізу в більшості пухлин відбувається у 10 разів інтенсивніше, ніж у нормальних тканинах, що отримало назву “ефект Варбурга”. Його було виявлено в тому числі й для таких клітинних ліній як Р-493 (лімфома В-клітин), рак простати РС3 [27], для лейкоїдів NB4, Kasumi-1, ТНР-1, і HL-60 [32] і людської лімфоми Raji [33].

Лімфома NK/Ly є зручною експериментальною моделлю злоякісної пухлини для дослідження особливостей метаболізму пухлинних клітин ссавців, з огляду на короткий час росту (у середньому 24–26 днів) і прояви інтоксикації на термінальній стадії розвитку пухлини, які нагадують кахексію в разі пухлин у експериментальних тварин і людини. Цю модель використовують, зокрема, для тестування протипухлинних препаратів [18, 20] і вивчення можливості використання нанорозмірних носіїв для хіміотерапії [3]. Її зручність полягає також і в значних об'ємах клітин (100–150 млн/мл при 6–10 мл асцитів за пробу). Штам цієї пухлини отримано у Будапештському національному інституті онкології у 1960 р. Л. Неметом і Б. Келлером і запропоновано як модель для тестування протипухлинної активності нових анти-неопластичних препаратів [25, 26]. Визначена початково як лімфолейкома, після трансформації лімфома NK/Ly набуває рис лімфосаркоми. Переважна більшість робіт, проведених на моделі лімфоми NK/Ly, пов'язана із вивченням протипухлинної активності хіміопрепаратів.

Енергетичний метаболізм цієї пухлини досліджений недостатньо. До останнього часу енергетичні параметри мітохондрій, виділених із злоякісно трансформованих і нормальних клітин, порівнювали лічену кількість разів [16, 30, 31, 34], а дихання й окисне фосфорилування мітохондрій клітин лімфоми мишей порівнювано із класичним об'єктом для енергетичних досліджень – мітохондріями печінки, не досліджували зовсім.

Мета нашої роботи полягала в тому, щоби порівняти параметри інтенсивності дихання й окисного фосфорилування у мітохондріях мишиної лімфоми NK/Ly із аналогічними показниками у мітохондріях печінки миші для підтвердження гіпотези про понижено інтенсивність аеробних енергетичних процесів у пухлинних мітохондріях. Для досягнення мети було модифіковано і вдосконалено метод ізолювання мітохондрій з асцитних клітин лімфоми NK/Ly.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на мишах-самцях лінії С57В1 масою 22–27 г. Тварин утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури на змішаному раціоні. Для екстирпації печінки тварин декапітували під ефірним наркозом, після чого швидко відділяли печінку. Штам лімфоми NK/Ly одержували з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України, Київ. Асцитну форму лімфоми пасажували, інокуючи мишам  $10\text{--}15 \times 10^6$  пухлинних клітин внутрішньочеревно. Асцит отримували дренаванням черевної порожнини мишей стерильним шприцом під ефірним наркозом на 7–10-й день після інокуляції. 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).

Мітохондрії печінки мишей ізолювали методом диференційного центрифугування. Печінку після видалення зважували та відмивали від крові охолодженим

розчином А такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4,7, MgCl<sub>2</sub> – 1, глюкоза – 5, HEPES – 10; pH 7,4. Печінку протискали у металевому пресі крізь сито, додавали середовище Б у співвідношенні 8 мл середовища на 1 г тканини і руйнували клітини у гомогенізаторі Поттера-Евельгейма за 800 об/хв і трьох вертикальних ходів поршня. Склад середовища Б (для гомогенізації) (ммоль/л): сахароза – 250, ЕГТА – 1, HEPES – 10; pH 7,2. Гомогенат центрифугували 3 хв за 150 г і 5 хв за 300 г без зупинки центрифуги (модель PC-6) для осадження фрагментів тканини і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту протягом 15 хв за 4500 г і температури 0–2 °С. Отриманий осад мітохондрій ресуспензували у розчині Б з розрахунку 0,1 мл розчину на 1 г вихідної тканини печінки. Рівень білка у такій суспензії становив ~ 26,8 мг/мл.

Мітохондрії клітин NK/Ly також виділяли методом диференційного центрифугування. Клітини лімфоми осаджували із свіжоотриманого асцити центрифугуванням упродовж 5 хв за 1000 об/хв у центрифугі ОПн-ЗУХЛ4.2. Клітини промивали розчином Б і центрифугували у тому ж режимі. Осад клітин суспендували у середовищі Б, так щоб об'єм суспензії відповідав початковому об'ємові асцити, і гомогенізували у скляному гомогенізаторі (зазор між поршнем і циліндром гомогенізатора 0,075 мм) зі швидкістю 2 000 об/хв упродовж 10 хв при охолодженні у льодяній бані. Гомогенат центрифугували 10 хв за 300 г для осадження незруйнованих клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували центрифугуванням супернатанту в ультрацентрифугі Jouan MR 1812 протягом 10 хв за 8 500 г і температури 0–2 °С. Швидкість центрифугування порівняно із мітохондріями печінки з огляду на меншу кількість мітохондрій у лімфомі. Отриманий осад мітохондрій суспендували у розчині Б з розрахунку 0,1 мл розчину на 1 мл початкового асцити. Рівень білка у такій суспензії становив ~ 39,3 мг/мл.

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 за кімнатної температури у зростаючих концентраціях етанолу (в діапазоні від 70° до 100°). Зневоднені зразки переносили у чисту епоксидну смолу і поміщали у капсули для полімеризації й витримували 24 год за температури 40 °С у термостаті й 48 год за температури 60 °С. 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.

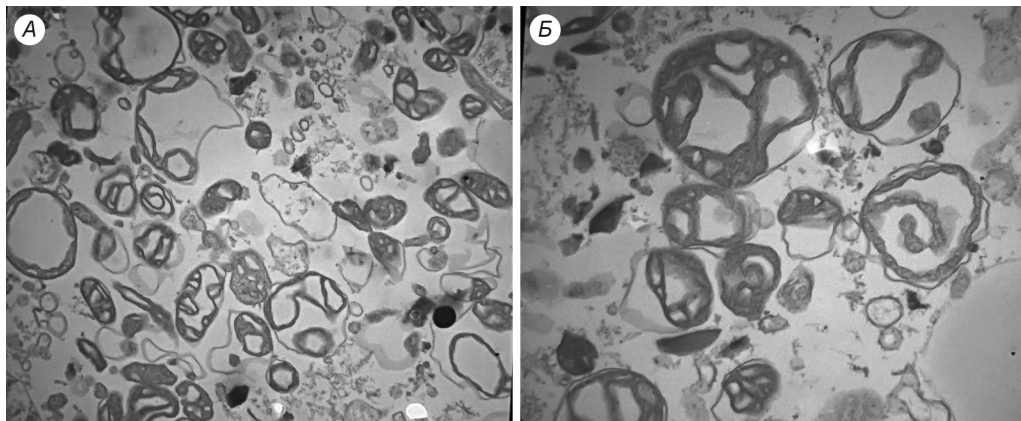
Швидкість поглинання кисню реєстрували полярографічно за температури 25 °С [9]. У полярографічну комірку послідовно вносили середовище інкубації, субстрат окиснення і суспензію мітохондрій. Склад середовища інкубації (мМ): сахароза – 250, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2, ЕГТА – 0,1, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 10; pH 7,2. Концентрація мітохондріального білка у комірі становила ~ 3,75 мг/мл (печінка) і ~ 5,50 мг/мл (лімфома). Як субстрати використовували α-кетоглутарат і сукцинат у концентраціях, близьких до K<sub>m</sub>: відповідно 1 і 0,35 мМ. Дихання мітохондрій печінки стимулювали додаванням 280 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірі об'ємом 1,4 мл становила 200 мкмоль/л), а дихання мітохондрій лімфоми – 70 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірі – 50 мкмоль/л).

За полярографічними кривими визначали швидкість поглинання кисню у трьох метаболічних станах, які були запропоновані Чансом і Вільямсом [5]. У стані 2 (“спокою”) до мітохондрій додавали екзогенний субстрат, проте без АДФ. У цьому разі швидкість дихання ( $V_2$ ) повільна, фосфорилування АДФ немає, а дихальні переносники значною мірою відновлені. У стані 3 (“активному”) мітохондрії забезпечені субстратами окиснення і АДФ. Швидкість дихання ( $V_3$ ) різко стимулюється і супроводжується фосфорилуванням АДФ, а концентрація окиснених форм дихальних переносників збільшується. У “контрольованому” стані 4 в полярографічній комірці спостерігається повне фосфорилування АДФ до АТФ, концентрація субстратів продовжує залишатися високою, а швидкість поглинання кисню ( $V_4$ ), порівняно зі станом 3, зменшується [1]. Такі метаболічні стани є зручною моделлю для характеристики функціонального стану мітохондрій за умов, що дають змогу оцінити їхню роботу в активному і контрольованому стані [9]. Також розраховували дихальний контроль (ДК,  $V_3/V_4$ ) – за Чансом, і ( $V_3/V_2$ ) – за Ларді), ефективність (АДФ/О), час ( $T_f$ ) і швидкість ( $V_f$ ) окисного фосфорилування [5, 9].

Полярографічні криві аналізували за допомогою авторської програми на базі математичного процесора MATLAB [14]. Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням пакету програм Microsoft Excel. Обчислення площі клітинних органел на електронно-мікроскопічних фотографіях здійснювали у графічному пакеті GIMP. Вірогідність різниці між порівнюваними групами визначали за критерієм Стьюдента. Статистично достовірними вважали зміни із  $P < 0,05$  [7].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 наведена електронно-мікроскопічна фотографія осаду мітохондрій NK/Ly за збільшення  $\times 4\,000$  (А) і  $\times 10\,000$  (Б). Як видно з рис. 1, А, у полі зору мітохондрії займають 35–45 % від загальної площі. Лізосоми і пероксисоми натомість займають лише 6–10 %. Отже, співвідношення мітохондрій до лізосоми/пероксисоми у лімфомі становить 4,3 до 1.



**Рис. 1.** Електронно-мікроскопічна фотографія осаду мітохондрій NK/Ly за збільшення  $\times 4000$  (А) і  $\times 10\,000$  (Б)

**Fig. 1.** Electron-microscopic image of sedimented NK/Ly mitochondria (magnification  $\times 4000$  (A) and  $\times 10\,000$  (B))

На рис. 2 наведено усереднені значення швидкості поглинання кисню мітохондріями клітин лімфоми NK/Ly і печінки миші за вищевказаних метаболічних станів. Статистичний аналіз результатів наведено у табл. 1. Виявлено, що швидкість поглинання кисню мітохондріями лімфоми у трьох досліджуваних метаболічних станах була у 5–8 разів нижчою, ніж у мітохондріях печінки ( $P < 0,05$ ), як за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, так і сукцинату. За додавання АДФ спостерігали достовірне зростання швидкості поглинання кисню мітохондріями як печінки ( $P < 0,01$ ), так і лімфоми ( $P < 0,05$ ). Швидкість дихання мітохондрій печінки за фосфорилування АДФ (у стані 3) була достовірно вищою у разі окиснення як  $\alpha$ -кетоглутарату, так і сукцинату.

Таблиця 1. Швидкість поглинання кисню мітохондріями клітини печінки миші та лімфоми NK/Ly в різних метаболічних станах за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Table 1. Rate of oxygen uptake in mitochondria of cells of mouse liver and lymphoma NK/Ly in different metabolic states using  $\alpha$ -ketoglutarate and succinate ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

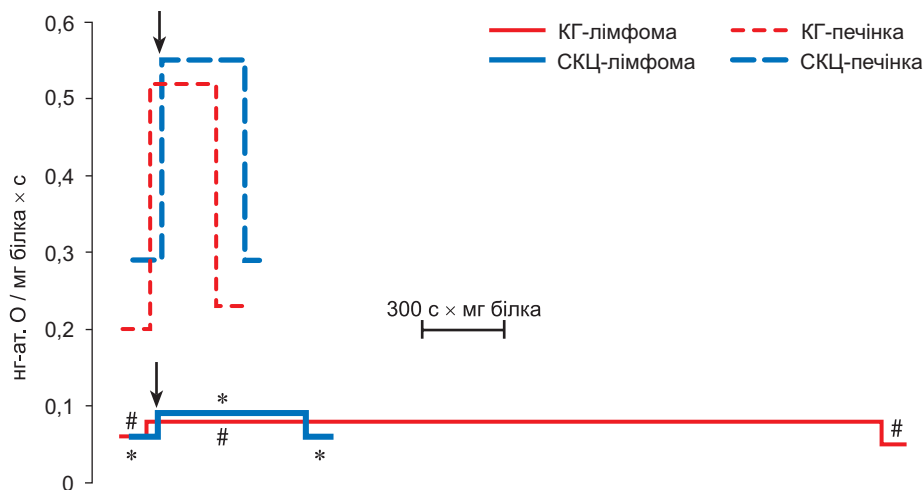
Тканина, з якої виділяли мітохондрії		Печінка	Лімфома
$V_2$	$\alpha$ -Кетоглутарат	0,20 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01*
	Сукцинат	0,29 $\pm$ 0,08	0,06 $\pm$ 0,01*
$V_3$	$\alpha$ -Кетоглутарат	0,52 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,01
	Сукцинат	0,55 $\pm$ 0,05	0,09 $\pm$ 0,01*
$V_4$	$\alpha$ -Кетоглутарат	0,23 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,01*
	Сукцинат	0,29 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,01*

**Примітки:** одиниці швидкості наведено у нг-ат. О / мг білка  $\times$  с; \* – статистично достовірна різниця порівняно з мітохондріями печінки,  $P < 0,05$ ;  $V_2$  – швидкість нефосфорилуючого дихання, перед додаванням АДФ;  $V_3$  – швидкість фосфорилуючого АДФ дихання;  $V_4$  – швидкість дихання після фосфорилування АДФ.

**Comments:** the rates are presented in ng-at O / mg protein  $\times$  s;  $V_2$  – the rate of respiration before ADP;  $V_3$  – the rate of respiration associated with ADP phosphorylation;  $V_4$  – the rate of respiration after ADP phosphorylation; \* – statistically significant difference compared to the liver mitochondria,  $P < 0.05$ .

Раніше дихання клітин NK/Ly досліджували R.O. Norbay et al. [35]. Вони встановили, що дихання пермеабілізованих клітин NK/Ly за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату становить 0,07 $\pm$ 0,01 нг-ат. О/(с $\times$ 10<sup>6</sup> клітин), за окиснення сукцинату 0,13 $\times$ 0,02 нг-ат. О/(с $\times$ 10<sup>6</sup> клітин). За додавання АДФ швидкість дихання недостовірно зростала до 0,09 $\pm$ 0,01 і 0,17 $\pm$ 0,02 нг-ат. О/(с $\times$ 10<sup>6</sup> клітин). Автори представили ці дані як дихання мітохондрій, проте мітохондрії у цих дослідях не виділялись, і вони містились *in situ* у клітинах NK/Ly.

У табл. 2 наведено показники дихального контролю в мітохондріях печінки та лімфоми NK/Ly. Дихальний контроль – це класичний термін у мітохондріології, модифіковані форми якого запропоновані Чансом, Бальчєфські та Ларді [19]. Ці метаболічні показники опосередковано характеризують спряження процесів дихання й окисного фосфорилування. Отримані результати свідчать, що показники дихального контролю у мітохондріях печінки мишей за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату достовірно не відрізнялися ( $P < 0,34$  за Ларді і  $P < 0,15$  за Чансом). Натомість, у мітохондріях лімфоми величини дихального контролю були достовірно нижчими порівняно з мітохондріями печінки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату.



**Рис. 2.** Діаграми швидкостей поглинання кисню мітохондріями печінки та лімфоми NK/Ly в мишей у різних метаболічних станах. КГ –  $\alpha$ -кетоглутарат, СКЦ – сукцинат. Стрілками позначено додавання АДФ. Статистично достовірна різниця порівняно з мітохондріями печінки позначена # (за окиснення КГ) та \* (за окиснення СКЦ),  $P < 0,05$ . Наведено усереднені дані швидкостей за  $n = 5$ . Величини стандартних похибок див. у табл. 1

**Fig. 2.** Diagrams of the oxygen uptake rates of mitochondria of cells of mouse liver and lymphoma NK/Ly at different metabolic states. Substrates of oxidation are defined as КГ ( $\alpha$ -ketoglutarate) and СКЦ (succinate). Arrows show ADP additions. Significant differences versus liver mitochondria with КГ are shown by octothorpe (#) and with СКЦ – by asterisk (\*),  $P < 0.05$ . The average of rates are presented ( $n = 5$ ). Standard errors see in table 1

**Таблиця 2. Показники дихального контролю (ДК) у мітохондріях (МХ) печінки миші та лімфоми NK/Ly ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )**

**Table 2. Indicators of respiratory controls in mitochondria of cells of mouse liver and lymphoma NK/Ly ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )**

Тканина, з якої виділяли МХ	ДК ( $V_3/V_2$ )		ДК ( $V_3/V_4$ )	
	$\alpha$ -кетоглутарат	сукцинат	$\alpha$ -кетоглутарат	сукцинат
Печінка	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 МХ печінки,  $P < 0,05$ .

**Comment.** ДК – respiratory control indices according to H. Lardy ( $V_3/V_2$ ) and to B. Chance ( $V_3/V_4$ ). For other definitions see table 1. \* – statistically significant difference compared to liver cell mitochondria,  $P < 0.05$ .

Безпосередньо про спряження дихання і фосфорилювання свідчить інший показник – співвідношення АДФ/О [5], який відображає кількість кисню, що витрачається за фосфорилювання 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. Подібну відмінність спостерігали і за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату, однак вона не підтверджена статистично через високе значення стандартної похибки показника у мітохондріях лімфоми.



Виходячи із наведених вище даних, логічно було очікувати нижчу швидкість окисного фосфорилування ( $V_{\phi}$ ) у мітохондріях лімфоми порівняно з мітохондріями печінки, що було підтверджено розрахунками цього показника (табл. 3). У мітохондріях печінки за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату швидкість становила  $0,7 \pm 0,14$  нмоль АДФ/мг білка  $\times$  с, а у мітохондріях пухлинних клітин вона була нижчою на 87,6 %. Аналогічну закономірність спостерігали і за окиснення сукцинату.

Таблиця 3. Параметри окисного фосфорилування у мітохондріях печінки миші та лімфоми NK/Ly ( $M \pm m$ ) за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату

Table 3. Parameters of oxidative phosphorylation in mitochondria of cells of mouse liver and lymphoma NK/Ly ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ )

Тканина, з якої виділяли мітохондрії		Печінка	Лімфома
АДФ/О	$\alpha$ -Кетоглутарат	$1,33 \pm 0,12$	$1,07 \pm 0,31^*$
	Сукцинат	$1,62 \pm 0,09$	$1,09 \pm 0,07$
$V_{\phi}$	$\alpha$ -Кетоглутарат	$0,70 \pm 0,14$	$0,09 \pm 0,03^*$
	Сукцинат	$0,90 \pm 0,11$	$0,10 \pm 0,01^*$
$T_{\phi}$	$\alpha$ -Кетоглутарат	$245 \pm 20,1$	$2779 \pm 363^*$
	Сукцинат	$317 \pm 72,9$	$564 \pm 92,3^*$

**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 мг білка  $\times$  с.

**Comment.** ADP/O – in nmol ADP/ng-at O, speed of phosphorylation ( $V_{\phi}$ ) – in nmol ADP/mg protein  $\times$  s, time of phosphorylation ( $T_{\phi}$ ) – in mg protein  $\times$  s. \* – statistically significant difference compared to liver cell mitochondria,  $P < 0.05$ .

Зміни часу фосфорилування ( $T_{\phi}$ ), які представлені на рис. 1 і у табл. 3, 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 не виявлено.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що швидкості дихання мітохондрій мишиної лімфоми NK/Ly достовірно нижчі порівняно з мітохондріями печінки миші. Відмінності у швидкості поглинання кисню та швидкості фосфорилування 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. Аналогічне зниження швидкості окисного фосфорилування описано у мітохондріях із клітин карциноми Ерліха порівняно з мітохондріями печінки щура [4, 13].

Швидкість дихання мітохондрій перераховували на одиницю мітохондріально-го білка. Проте цей показник для суспензій органел із обидвох тканин (39,3 мг/мл для лімфоми і 26,8 мг/мл для печінки) порівняно із різницею у швидкостях дихання (у 5–8 разів) суттєво не відрізнявся. На тлі таких значних відмінностей дихальних процесів між двома тканинами незначним виглядає і можливий вклад “забруднення” мітохондріальної суспензії лізосомами і пероксисомами. Аналіз співвідношен-

ня площі мітохондрій до площі лізосом + пероксисом на електронно-мікроскопічних фотографіях становить для лімфоми і печінки відповідно 4,3 до 1 і 6,9 до 1 (рис. 1 і [1]). Отже, нижча інтенсивність дихання мітохондрій лімфоми порівняно з мітохондріями печінки обумовлена в першу чергу особливостями метаболізму ракових мітохондрій, зокрема шляхами окиснення енергетичних субстратів, функціонуванням дихального ланцюга, величиною трансмембранного потенціалу на внутрішній мембрані й активністю їхньої АТФ-ази.

Аналіз літературних джерел виявив, що нижча інтенсивність анаеробних процесів у ракових клітинах може бути обумовлена також низкою інших причин. Зокрема, однією з основних характеристик пухлинних клітин є їхня висока швидкість проліферації. Швидкоростучі пухлини легко стають гіпоксійними внаслідок непристосованості судинної системи 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 гена p53 [22], що встановлено для клітин NK/Ly [25]. Автори виявили підвищення експресії транскрипційного фактора E2F-1/2, сигнального каскаду MAPK і c-Myc, що передбачає інтенсивну проліферацію клітин на термінальній стадії розвитку. Також було виявлено фрагментацію ДНК і нестачу експресії білка p53 та каспаз 3, 6 і 7, що вказує на каспазо-незалежний тип апоптозу цих клітин. Виявлено, що p53, який є транскрипційним активатором, може впливати на мітохондрійні процеси через синтез цитохром оксидази 2 (SCO<sub>2</sub>). Відповідно, нестача p53 може призвести до відтворення ефекту Варбурга, оскільки p53 регулює гліколітичні процеси через Akt і фосфогліцератмутаза [23].

Через нездатність мітохондрій забезпечити достатню кількість АТФ для виживання клітин за умов гіпоксії пухлинні клітини активують гліколітичний шлях. Це відбувається за підвищеної експресії фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1) [34], який зумовлює ферментативний “зсув” енергетичного метаболізму від окисного фосфорилування в бік субстратного фосфорилування гліколітичним шляхом [10]. Такий стан може бути зумовлений або низьким рівнем кисню в асцитній рідині внаслідок його обмеженого надходження і швидким використанням у процесі росту пухлини, або явищем псевдогіпоксії, спричиненої зниженням рівня супресорів пухлинного росту [16].

Стимуляція гліколізу, високий рівень якого характерний для клітин NK/Ly [25], і зниження ролі окисного фосфорилування може також відбуватися через активацію фосфоінозитидної 3-кінази (PI3K) та її подальшої мішені – Akt (також відомої як протеїнкіназа B). Активація Akt викликає збільшення розмірів клітин, підвищення активності гліколізу й обміну речовин, виживання клітин [28], і зазвичай спостерігається у злоякісно трансформованих ракових клітинах [8]. Akt регулює гліколіз через посттранскрипційні механізми, які включають посилене переміщення транспортера глюкози до клітинної поверхні та підтримку активності гексокінази, коли немає 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 [12]. З'ясовано, що сукцинат інгібує гідроксилазу HIF-1 $\alpha$ , що призводить до стабілізації й активації HIF-1 $\alpha$ . Накопичення сукцинату може відбуватись і в результаті інгібування сукцинатдегі-



дрогенази. Мутації цього ферменту беруть участь у формуванні спадкової схильності до утворення пухлин, тому сукцинатдегідрогеназу можна розглядати як класичний пухлинний супресор [2]. Аналогічний ефект стабілізації HIF-1 $\alpha$  був описаний для лактату і пірувату [21].

Зменшення показника ефективності фосфорилювання (АДФ/О) у мітохондріях лімфоми NK/Ly спостерігали за окиснення сукцинату, доданого у полярографічну комірку. Ймовірною причиною цього явища може бути зниження експресії білка, що кодує  $\beta$ -білок субодиниці F<sub>1</sub> АТФ-синтази, що виявлено для пухлинних клітин, зокрема, для людської карциноми, в результаті чого знижується відсоток функціонально активних молекул ферменту [6,17].

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 як за ФАД-, так і за НАД-залежного окиснення субстратів. Окрім того, встановлено субстрат-залежні порушення показників спряження дихання й окисного фосфорилювання (дихальний контроль і АДФ/О) у мітохондріях лімфоми порівняно з мітохондріями печінки.

\* \* \*

Автори вдячні д.б.н. О.П. Єлісеєвій за технічну допомогу під час виконання полярографічних дослідів, корисні поради та плідну дискусію.

1. *Babsky A.M.* Effect of adrenaline on oxidative phosphorylation and Ca<sup>2+</sup>-exchange in mitochondria of liver and intestine in rat: **PhD Thesis**, Lviv-Puschino, 1984, 133 p. (In Russian).
2. *Baysal B.E., Ferrell R.E., Willett-Brozick J.E.* et al. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. **Science**, 2000; 287: 848–851.
3. *Boiko N. M., Senkiv Yu. V., Shlyakhtina Ye. A.* Action of doxorubicin delivered to tumor cells *in vitro* and *in vivo* by novel nanoscale oligoelectrolytic carrier. **Biotechnology Acta**, 2013; 6(3): 53–62. (In Ukrainian).
4. *Borst P.* Preparation and Properties of Mitochondria from Ehrlich Ascites Tumor Cells. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, 1960; 7(2):381–383.
5. *Chance B., Williams G.* Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state. **The Journal of Biological Chemistry**, 1955; 217: 409–427.
6. *Cuezva J., Krajewska M., Heredia M.* et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. **Cancer Research**, 2002; 62(22): 6674–6681.
7. *Derkach M., Humetsky R., Chaban M.* **The course of variation statistics**. Kyiv: High School, 1977. 206 pp. (In Ukrainian).
8. *Elstrom R.L., Daniel B. E., Buzzai M.* et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. **Cancer Research**, 2004; 64: 3892–3899.
9. *Frank G.M.* (Ed.) **Guide to study biology oxidation by polarographic method**: Edited by G.M. Frank. Moscow: Nauka, 1973. 220 p. (In Russian).
10. *Frezza C., Gottlieb E.* Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. **Seminars in Cancer Biology**, 2009; 19: 4–11.
11. *Gao P., Tchernyshyov I., Chang T.-C.* et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. **Nature**, 2009; 458: 762–766.
12. *Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B.* Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? **Trends in Cell Biology**, 2008; 18(4): 165–173.
13. *Gottlieb E., Tomlinson I.P.* Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. **Nature Reviews Cancer**, 2005; 5: 857–866.

14. *Hawtrey A., Silk M.* Mitochondria of the Ehrlich ascites-tumour cell. Isolation and studies of oxidative phosphorylation **Biochemical Journal**, 1960; 74(1): 21–26.
15. *Horbay R.O., Manko B.O., Manko V.V.* et al. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma. **Cell Biol. Int**, 2012; 36; 71–77.
16. *Hrenyukh V.P., Babsky. A.M.* Analysis of the respiration and oxidative phosphorylation of mitochondria by using MATLAB. **Physiological Journal**, 2014; 60(3): 103. (In Ukrainian).
17. *Kielley R.T.* Oxidative phosphorylation by mitochondria of transplantable mouse hepatoma and mouse liver. **Cancer Research**, 1952; 12: 124–128.
18. *King A., Selak A., Gottlieb E.* Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. **Oncogene**, 2006; 25: 4675–4682.
19. *Lardy H.* Energetic coupling and regulation of metabolic rates. **Congr. Intern. Biochem. Report**, Brussels, 1955; p. 287–293.
20. *Lootsik M.D., Boiko N.M., Mitina N.E.* Separation of cell populations by super-paramagnetic particles with controlled surface functionality. **Biotechnologia Acta**, 2014; 7(1): 80–86. (In Ukrainian).
21. *Lootsik M.D., Lutsyk M.M., Stoika R.S.* Nemeth-Kellner Lymphoma Is a Valid Experimental Model in Testing Chemical Agents for Anti-Lymphoproliferative Activity. **Open Journal of Blood Diseases**, 2013; 3: 1–6.
22. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 1951; 193(1): 265–275.
23. *Lu H., Forbes R.A., Verma A.* Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 2002; 277: 23111–23115.
24. *Matoba S., Kang J.-G., Patino W. D.* et al. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. **Science**, 2006; 312: 1650–1655.
25. *Moll U.M., Schramm L.M.* p53 – an acrobat in tumorigenesis. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, 1998; 9: 23–37.
26. *Nemeth L., Kellner B.* A new mouse ascites tumour to be used as a screening tool. **Neoplasma**, 1961; 8: 337–343.
27. *Panchuk R.R., Boiko N.M., Lootsik M.D., Stoika R.S.* Changes in signaling pathways of cell proliferation and apoptosis during NK/Ly lymphoma aging. **Cell Biology International**, 2008; 32: 1057–1063.
28. *Pelicano H., Xu R., Du M.* et al. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism. **The Journal of Cell Biology**, 2006; 175(6): 913–923.
29. *Plas D.R., Thompson C.B.* Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. **Oncogene**, 2005; 24: 7435–7442.
30. *Sauer L.A., Martin A.P., Stotz E.* Oxidative phosphorylation in ascites tumor mitochondria. **Cancer Research**, 1962, 22: 632–636.
31. *Simonnet H., Alazard N., Pfeiffer K.* et al. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. **Carcinogenesis**, 2002, 23: 759–768.
32. *Suganuma K., Miwa H., Imai N.* et al. Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation **Leukemia & Lymphoma**, 2010; 51: 2112–2119.
33. *Thorne R.F.W., Bygrave F.L.* Energy-linked functions of tightly coupled mitochondria isolated from Ehrlich ascites tumor cells **Cancer Research**, 1973, 33: 2562–2567.
34. *Wang G.L., Semenza G.L.* General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1993; 90: 4304–4308.

35. Xu R.-H., Pelicano H., Zhou Y. et al. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Res*, 2005; 65; 613–620.

---

## COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF RESPIRATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN MITOCHONDRIA OF CELLS OF MOUSE LIVER AND LYMPHOMA NK/Ly

**V. Hreniukh<sup>1</sup>, M. Lootsik<sup>2</sup>, O. Kulachkovsky<sup>1</sup>, R. Stoika<sup>2</sup>, A. Babsky<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

<sup>2</sup> Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, 14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine  
e-mail: grenuh@gmail.com

Parameters of respiration and oxidative phosphorylation in mouse liver cell mitochondria and experimental lymphoma NK/Ly was investigated. The suspensions of mitochondria were obtained by the differential centrifugation. Oxygen uptake rate was measured using platinum polarographic Clark electrode.  $\alpha$ -Ketoglutarate and succinate were used as substrates. It was established that the rate of oxygen uptake in mitochondria of mouse liver cells is higher in all investigated metabolic states compared to the rate of oxygen uptake in mitochondria of lymphoma NK/Ly cells when both  $\alpha$ -ketoglutarate and succinate were used as substrates. Also we found lower rates of respiratory control and longer time of phosphorylation in tumor cell mitochondria compared to liver cell mitochondria for the oxidation of  $\alpha$ -ketoglutarate, while the ratio of ADP/O was lower in mitochondria of lymphoma cells for the oxidation of succinate.

**Keywords:** mitochondria, respiration, oxidative phosphorylation, liver mouse, lymphoma Nemeth-Kellner.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРАМЕТРОВ ДЫХАНИЯ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ КЛЕТОК ЛИМФОМЫ НЕМЕТ–КЕЛЛНЕРА И ПЕЧЕНИ МЫШИ

**В. Гренюх<sup>1</sup>, М. Луцик<sup>2</sup>, О. Кулачковский<sup>1</sup>, Р. Стойка<sup>2</sup>, А. Бабский<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

<sup>2</sup> Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина  
e-mail: grenuh@gmail.com

Исследовали параметры дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях печени мыши и экспериментальной мышины лимфомы NK/Ly. Суспензию митохондрий получали методом дифференциального центрифугирования. Интенсивность дыхания оценивали по скорости поглощения кислорода, которую регистрировали с помощью платинового электрода Кларка, используя в качестве субстратов  $\alpha$ -кетоглутарат и сукцинат. Исследовано, что скорость поглощения кислорода митохондриями печени мыши во всех исследуемых

метаболических состояниях выше, чем скорость поглощения кислорода митохондриями клеток лимфомы NK/Ly при окислении как ФАД-, так и НАД-зависимых субстратов. При окислении  $\alpha$ -кетоглутарата также обнаружены более низкие показатели дыхательного контроля и длительное время фосфорилирования в митохондриях опухоли по сравнению с митохондриями печени. При окислении сукцината соотношение АДФ/О было ниже в митохондриях лимфомы.

**Ключевые слова:** митохондрии, дыхание, окислительное фосфорилирование, печень мыши, лимфома Немец-Келлнера.

Одержано: 12.03.2015