

УДК 57.017.722:577.121.7:616-006.444:577.3:581.17

МАКСИМАЛЬНА ОКИСНА ЗДАТНІСТЬ МІТОХОНДРІЙ КЛІТИН ЛІМФОМИ NK/LY ЗА ВИКОРИСТАННЯ МЕТИЛОВИХ ЕСТЕРІВ ЕНЕРГЕТИЧНИХ СУБСТРАТІВ

В. П. Гренюх¹, Б. О. Манько¹, О. О. Сідорова¹, Й. В. Царик¹,
М. І. Голубєв², А. М. Бабський¹
grenuh@gmail.com

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

² Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна

В ізольованих мітохондріях та пермеабілізованих ракових клітинах процеси дихання і окисного фосфорилування суттєво визначаються доступністю екзогенних субстратів, які за умов цілісності мембран клітин обмежено проникають у мітохондрії. Метилкові естери субстратів краще транспортуються крізь плазматичну мембрану нормальних і ракових клітин. Метою роботи було вивчення швидкості дихання клітин NK/Ly стимульованої різними концентраціями протонатора FCCP за окиснення ендogenous та екзогенних субстратів. До базового середовища в експериментах додавали екзогенні субстрати (по 2 мМ): сукцинат, α -кетоглутарат та їх метилкові естери (монометил-сукцинат і диметил- α -кетоглутарат). Після інкубації 10 млн пухлинних клітин вносили у полярографічну комірку. Швидкість споживання кисню визначали полярографічним методом за допомогою установки, зібраної на базі електрода Кларка за температури 37 °С. Максимальну окисну здатність мітохондрій клітин лімфоми NK/Ly досліджували за стимулювання дихання клітин різними концентраціями протонатора FCCP (0,25–2 мкМ).

Встановлено, що максимальну стимуляцію дихання викликали концентрації FCCP 0,5 і 1 мкМ, залежно від субстрату окиснення. Швидкість дихання і максимальна окисна здатність за окиснення екзогенних α -кетоглутарату чи сукцинату вірогідно не відрізнялися від контролю, що опосередковано свідчить про непроникність вказаних форм субстратів через мембрану. За окиснення диметил- α -кетоглутарату швидкість стимульованого FCCP дихання вірогідно зростала за концентрацій протонатора 0,5, 1 і 2 мкМ. За окиснення монометил-сукцинату зростання швидкості дихання не підтверджено методами статистики. Отже, метильована форма α -кетоглутарату може бути успішно використана як енергетичний субстрат для оцінювання максимальної окисної здатності ракових клітин без пермеабілізації плазматичної мембрани чи ізолювання мітохондрій.

Ключові слова: ПЕРМЕАБІЛІЗОВАНІ КЛІТИНИ, NK/LY, СУБСТРАТИ ОКИСНЕННЯ, МАКСИМАЛЬНА ОКИСНА ЗДАТНІСТЬ

MAXIMAL OXIDATIVE CAPACITY OF MITOCHONDRIA IN LYMPHOMA NK/LY WITH METHYL ESTERS OF ENERGETIC SUBSTRATES

V. Hreniukh¹, B. Manko¹, O. Sidorova¹, M. Holubyev², J. Tsaryk¹, A. Babsky¹
grenuh@gmail.com

¹ Ivan Franko National University of Lviv,
4 Hrushevsky Str., Lviv 79005, Ukraine

² National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
15 Heroiv Oborony str., Kyiv 03041, Ukraine

The processes of respiration and oxidative phosphorylation in mitochondria are significantly determined by the transport of exogenous substrates through the plasma membrane. Methyl esters of the substrates of Krebs cycle better enter through the plasma membrane in normal and cancer cells. In polarographic chamber various substrates (2 mM) such as succinate, monomethyl-succinate, α -ketoglutarate, and dimethyl- α -ketoglutarate were added to 10 million NK/Ly cells. Rate of oxygen consumption was determined using polarographic method with Clark electrode at 37 °C. The maximum of oxidative capacity in lymphoma NK/Ly mitochondria was investigated by stimulation of oxygen uptake with different concentrations of protonophor FCCP (0.25–2 μ M).

The maximum stimulation of respiration was caused by 0.5 and 1 μ M FCCP depending on the substrate oxidation. Basal oxygen uptake rate (without FCCP) and maximum oxidative capacity with exogenous α -ketoglutarate or succinate did not differ significantly from control levels with energetic substrates indirectly indicating limited permeability of them through membrane. For the oxidation of dimethyl- α -ketoglutarate rate of FCCP-stimulated respiration significantly increased by 51 % and 132 % with 0.5 and 1 μ M FCCP, respectively, compared to the non-methylated form. For the oxidation of monomethyl-succinate an increase in FCCP-stimulated respiration was not confirmed with parametric methods of statistics. Therefore, a methylated form of α -ketoglutarate can be successfully used as a substrate for evaluation of the maximum oxidative capacity in cancer cells without their permeabilization or mitochondria isolation.

Keywords: PERMEABILIZED CELLS, NK/LY, OXIDATION SUBSTRATES, THE MAXIMAL OXIDATIVE CAPACITY

МАКСИМАЛЬНАЯ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ КЛЕТОК ЛИМФОМЫ NK/LY ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МЕТИЛОВЫХ ЭФИРОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ

В. П. Гренюх¹, Б. А. Манько¹, О. О. Сидорова¹, М. И. Голубев², И. В. Царик¹, А. М. Бабский¹
grenuh@gmail.com

¹ Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, г. Львов, 79005, Украина

² Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборон, 15, г. Киев, 03041, Украина

Процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в изолированных митохондриях и пермеабилizованных раковых клетках существенно определяются доступом экзогенных субстратов, которые в условиях целостности клеток в митохондрии проникают ограничено. Метилловые эфиры субстратов лучше транспортируются через плазматическую мембрану нормальных и раковых клеток. В базовую среду в экспериментах добавляли различные субстраты (по 2 мМ): сукцинат, монометил-сукцинат, α -кетоглутарат и диметил- α -кетоглутарат. После инкубации 10 млн клеток вносили в полярнографическую ячейку. Расход кислорода определяли полярнографическим методом с помощью установки, собранной на базе электрода Кларка при температуре 37 °С. Максимальную окислительную способность митохондрий лимфомных клеток NK/Ly исследовали, стимулируя использование кислорода в клетках различными концентрациями протонофора FCCP (0,25–2 мкМ).

Установлено, что максимальную стимуляцию дыхания вызвали концентрации FCCP 0,5 и 1 мкМ, в зависимости от субстрата окисления. Базальная скорость дыхания и максимальная окислительная способность при окислении экзогенных α -кетоглутарата или сукцината достоверно не отличались от контроля, что косвенно свидетельствует о непроницаемости этих форм субстратов через мембрану. При окислении диметил- α -кетоглутарата скорость дыхания, стимулированного FCCP, достоверно и существенно возрастала при концентрациях протонофора 0,5, 1 и 2 мкМ. При окислении монометил-сукцината рост скорости дыхания не был подтвержден параметрическими методами статистики. Таким образом, метилловый эфир α -кетоглутарата может быть успешно использован как энергетический субстрат для исследования максимальной окислительной способности в раковых клетках без пермеабилизации плазматической мембраны или изолирования митохондрий.

Ключевые слова: ПЕРМЕАБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ, NK/LY, СУБСТРАТЫ ОКИСЛЕНИЯ, МАКСИМАЛЬНАЯ ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ

Забезпечення мітохондрій субстратами окиснення є критично важливим процесом для підтримання необхідного рівня синтезу АТФ. Транспортування дво- і трикарбоксилатних субстратів циклу Кребса через плазматичну мембрану, поряд з транспортом

глюкози і амінокислот, може бути важливим механізмом посилення катаболічних процесів у мітохондріях. Перенесення дикарбоксилатних субстратів циклу здійснюється переважно натрій-дикарбоксилатними котранспортерами (NaDC) низької і високої спорідне-

ності до субстрату. Встановлено, що сукцинат (СК) переноситься за допомогою NaDC-1 з K_m 0,9 мМ у щітковій облямівці кролів, проксимальних трубочках нирок і тонкому кишечнику людини [1–2]. Високоспоріднений ко-транспортер NaDC-3 з K_m для СК 20–102 мкМ виявлений в активній формі у плаценті, мозку, печінці, нирках і підшлунковій залозі людини та щурів [3]. У печінці виявлені натрій-залежні і незалежні транспортні системи для таких дикарбоксилатів, як α -кетоглутарат (КГ) і малат [6–8]. Для ракових клітин існують тільки поодинокі повідомлення стосовно транспортних шляхів субстратів циклу Кребса. Wahrheit et al. [5] встановили, що у клітинах людської гепатоми Нер G2 транспорт СК і цитрату здійснюють разом високоафінний hNaDC-3 та натрій-цитратний (hNaCT) ко-транспортери.

Аналіз субстрат-залежного дихання мітохондрій дозволяє отримати цінну інформацію про енергетичні процеси, які відіграють важливу роль у метаболізмі ракових клітин [1, 4, 9]. Перспективним напрямком дослідження функціонального стану мітохондрій у нормі і при патологіях є вивчення максимальної окисної здатності органел, які розміщені у клітині *in situ* [10, 11]. За цих умов можна краще зберегти природне оточення мітохондрій у клітині. Norbay et al. [12] встановили, що пермеабілізовані клітини лімфоми NK/Ly демонстрували значне зростання швидкості дихання за присутності КГ та СК. У цій роботі автори використовували пермеабілізацію клітин дигітоніном для полегшення проникнення енергетичних субстратів через плазматичну мембрану. На сьогодні достеменно не встановлено специфічні транспортні механізми, за допомогою яких енергетичні субстрати циклу Кребса можуть потрапляти у цитоплазму нативних (не пермеабілізованих) клітин лімфоми NK/Ly. За експериментальних умов *in vitro* для покращення транспорту крізь мембрану доступні метилові естери субстратів циклу Кребса, зокрема диметил- α -кетоглутарат (ДМКГ) та монометил-сукцинат (МСК). Встановлено, що метилювання СК дозволяє цьому субстрату проникати крізь плазматичну мембрану [13, 14].

Лімфома NK/Ly є зручною експериментальною моделлю злоякісної пухлини для дослідження особливостей метаболізму клітин пухлин ссавців, з огляду на короткий час росту (в середньому 24–26 діб) і прояви інтоксикації на термінальній стадії розвитку пухлини, які нагадують кахексію. Ця модель використовується, зокрема, для тестування протипухлинних препаратів [15–17] та вивчення можливості використання нанорозмірних носіїв для хіміотерапії [18]. Її зручність полягає також і в короткому часі росту та досить значних кількостях клітин (100–150 млн на 1 мл асциту). Визначена початково як лімфолейкома, після трансформації лімфома NK/Ly набуває ознак лімфосаркоми. Більшість досліджень, проведених на моделі лімфоми NK/Ly, пов'язані з вивченням протипухлинної активності хіміопрепаратів [12, 16, 17], однак енергетичний метаболізм цієї пухлини і транспорт субстратів циклу Кребса досліджений недостатньо.

Метою роботи було вивчення швидкості дихання клітин NK/Ly стимульованої різними концентраціями протонофора FCCP (0,25–2 мкМ) за окиснення ендогенних субстратів, кетоглутарату, сукцинату і їх метилових естерів.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на білих нелінійних самцях мишей масою 20–30 г. 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). Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури і змішаного раціону. Асцитну форму лімфоми перевивали методом внутрішньочеревної інокуляції мишам 10–15 млн клітин. Асцит відбирали дренажним шприцом під етерним наркозом на 7–10 доби після інокуляції. В отриманій суспензії підраховували кількість клітин у камері Горяєва (млн/мл). Для оцінки цілісності плаз-

матичної мембрани клітини фарбували трипановим синім (0,1 % розчин, <99 % трипан-негативних клітин). Суспензію клітин зберігали за кімнатної температури у стерильних умовах.

Клітини інкубували 15 хв у базовому середовищі (контроль), що містило, ммоль/л: NaCl — 140,0; KCl — 4,7; CaCl₂ — 1,3; MgCl₂ — 1,0; HEPES — 10,0; pH 7,4 за стерильних умов і температури 37 °С. До середовища у експериментах додавали субстрати (по 2 мМ): сукцинат (СК), МСК, α -кетоглутарат (КГ) і ДМКГ. Після інкубування 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. Для оцінювання максимальної окисної здатності клітин NK/Ly застосовували протонофор FCCP, який «розсіює» мембранний потенціал мітохондрій і стимулює їхнє дихання [19–21]. Перемішування суспензії у полярографічній комірці здійснювали за допомогою пропелерної мішалки [20]. Швидкість дихання розраховували, вважаючи, що в 1 мл розчинено 200 нмоль O₂ [21]. Кожен експеримент повторювали на п'яти окремих препаратах клітин, отриманих від різних тварин (n=5). Статистичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютера з використанням пакету програм *Microsoft Office Excel*. Цифрові результати подані як $M \pm m$. Вірогідність різниці середніх арифметичних двох вибірок (P) визначали за t-тестом Стьюдента і непараметричним критерієм Вілкоксона [23].

Результати й обговорення

На *Рисунку 1* наведено типовий експериментальний запис дихання клітин лімфоми за окиснення екзогенного КГ. Для оцінювання максимальної окисної здатності клітин дихання стимулювали послідовними додаваннями протонофора FCCP у полярографічну комірку в кінцевих концентраціях

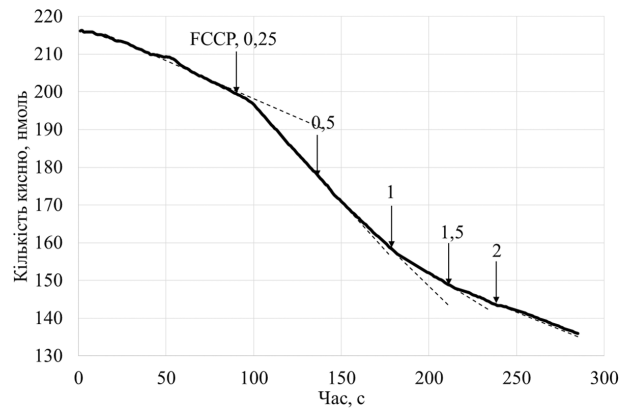


Рис. 1. Приклад запису дихання клітин NK/Ly за окиснення α -кетоглутарату (2 мМ). Пунктирними лініями наведено лінеаризовані та екстрапольовані швидкості дихання, стрілками відзначено додавання FCCP та його концентрацію в комірці в мкМ

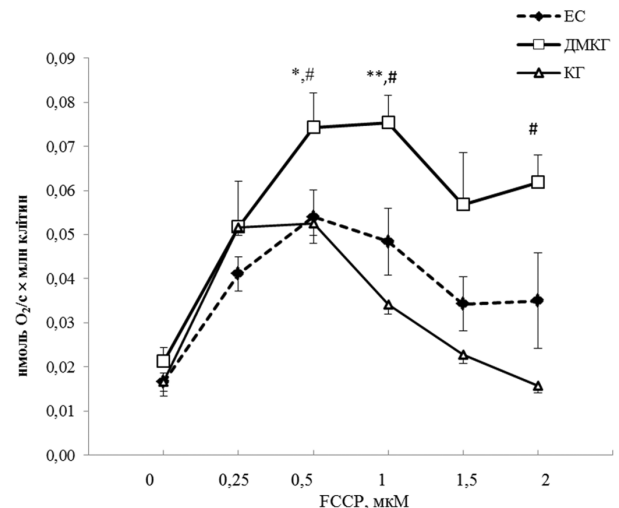


Рис. 2. Вплив протонофора FCCP на швидкості дихання клітин NK/Ly за окиснення ендogenous субстратів (ЕС) та додавання КГ і ДМКГ. Вірогідні зміни: * — $P < 0,05$ порівняно з контролем (ЕС), ** — $P < 0,01$; # — $P < 0,05$ порівняно з КГ

0,25, 0,5, 1, 1,5 і 2 мкМ. Зазвичай FCCP використовують для зниження мембранного потенціалу мітохондрій, що супроводжується інтенсивним зростанням поглинання кисню [21, 25].

На *Рисунку 2* наведено вплив FCCP на швидкості дихання лімфомних клітин у трьох експериментальних групах: без екзогенних субстратів (ендогенні субстрати, ЕС), з КГ і ДМКГ. Як видно, FCCP у концентраціях 0,25 і 0,5 мкМ стимулював дихання у всіх групах.

Однак, 1 мкМ FCCP стимулював дихання тільки за окиснення ДМКГ та інгібував за окиснення ЕС і КГ. Вищі концентрації FCCP (1,5 і 2 мкМ) інгібували дихання вже у всіх експериментальних групах. Вірогідної різниці між швидкістю дихання клітин контрольної групи та з додаванням КГ не було виявлено за жодної концентрації FCCP. Це підтверджує робочу гіпотезу про те, що активність специфічного транспортера КГ є низькою у мітохондріях клітин NK/Ly. Проте встановлено, що за таких доз протонофора, як 0,5 і 1 мкМ, швидкість дихання клітин, інкубованих з диметил- α -кетоглутаратом, статистично вірогідно вища порівняно як з клітинами з α -кетоглутаратом, так і контрольної проби, а за дози 2 мкМ — тільки з клітинами, інкубованими з α -кетоглутаратом.

На *Рисунку 3* наведено вплив FCCP на швидкості дихання лімфомних клітин у трьох експериментальних групах: без субстратів (ЕС), з СК і МСК. Як видно, дихання лімфомних клітин вірогідно не відрізнялося від контрольних значень (ЕС) як за використання СК, так і за метил-сукцинату. (Єдиним винятком була вища швидкість дихання за концентрації FCCP 0,5 мкМ, однак вірогідність цього ефекту була підтверджена тільки за допомогою непараметричного критерію Вілкоксона і ефект потребує додаткового підтвердження).

Отже, максимальна стимуляція дихання лімфомних клітин NK/Ly відбувалась за дії 0,5 мкМ FCCP у всіх досліджуваних пробах, за винятком використання ДМКГ (1 мкМ FCCP). FCCP-стимульовані швидкості дихання за окиснення ендogenous субстратів, КГ та СК вірогідно не відрізнялися, що опосередковано свідчить про недостатню проникність плазматичної мембрани лімфомних клітин для цих дикарбоксилатів або про наявність високих запасів ендogenous субстратів у клітинах, які «насичують» дихальний ланцюг відновлювальними еквівалентами. У переабілізованих лімфомних клітинах [12] чи в їх ізольованих мітохондріях [9], де доступ СК і КГ до мітохондрій вільний, ці сполуки активно окиснюються.

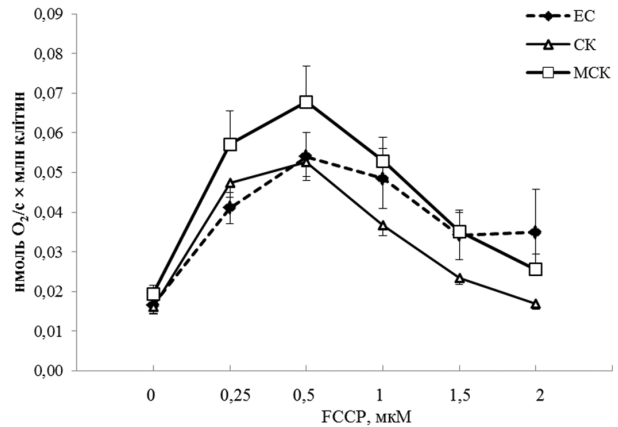


Рис. 3. Вплив протонофора FCCP на швидкості дихання клітин NK/Ly за окиснення ендogenous субстратів (ЕС) та додавання сукцинату і МСК

За окиснення ДМКГ швидкість стимульованого FCCP дихання вірогідно зростала за концентрацій протонофора 0,5, 1 і 2 мкМ порівняно з контролем чи дослідом з КГ, що, на нашу думку, свідчить про кращу проникність плазматичної мембрани для ДМКГ. Вважають, що частково ліпофільні естери субстратів можуть вільно дифундувати крізь плазматичну мембрану клітин ссавців [13, 14], після чого розщеплюються естеразами у цитоплазмі та окиснюються у мітохондріях. З іншого боку, ці форми субстратів можуть бути більш спорідненими з дикарбоксилатними транспортерами, даних про наявність яких у плазматичній мембрані NK/Ly поки що немає.

Відсутність вірогідної різниці між клітинним диханням за використання метильованої і неметильованої форм СК може бути пояснена тим, що поглинання СК через NaDC-3 спряжене з активністю Na⁺/K⁺-АТФази [5], яка мала би відновлювати натрієвий градієнт, використаний як джерело енергії для ко-транспорту субстрату. Також цей ефект можна було б пояснити недостатньо високою активністю сукцинатдегідрогенази, що не може забезпечити ще вищу окисну здатність навіть за наявності доступного СК.

Чи впливають метильні групи на афінність і/чи активність дикарбоксилатних транспортерів, чи вони полегшують перенесення субстратів шляхом дифузії через ліпідний бішар, ще належить дослідити. Проте

вже сьогодні відомо, що у мітохондріях лімфоми інтенсивність дихання за окиснення КГ є вищою порівняно із СК [9]. З іншого боку, також відомо, що ефективність окисного фосфорилування за окиснення НАД-залежного субстрату КГ (АДФ/О=2,5) переважає ефективність ФАД-залежного СК (АДФ/О=1,5) [26]. Це може свідчити про низьку, порівняно з α -кетоглутаратом, афінність до СК. Наші попередні дослідження показали, що протипухлинні препарати, а також препарати, що обмежують ацидифікацію клітин (бафіломіцин), краще проявляють свою дію у мітохондріях НК/Лу за окиснення КГ, ніж за окиснення СК [24]. Економне використання кисню є важливим для зазвичай гіпоксійних ракових клітин, тому використання більш ефективних субстратів є енергетично виправданим.

Висновки

1. Максимальну окисну здатність мітохондрій лімфомних клітин НК/Лу можна досліджувати за стимуляції дихання ракових клітин різними концентраціями протонофора FCCP.

2. Швидкість дихання і максимальна окисна здатність за окиснення екзогенних α -кетоглутарату чи сукцинату вірогідно не відрізнялись від контролю, що опосередковано свідчить про непроникність цих субстратів через непошкоджену мембрану клітин.

3. За окиснення диметил- α -кетоглутарату швидкість стимульованого FCCP дихання вірогідно ($P < 0,05$) зростала за концентрацій протонофора 0,5, 1 і 2 мкМ. За окиснення монометил-сукцинату зростання швидкості дихання не було підтверджено параметричними методами статистики.

4. Метильована форма α -кетоглутарату може бути успішно використана як енергетичний субстрат для дослідження максимальної окисної здатності у ракових клітинах без пермеабілізації плазматичної мембрани чи ізолювання мітохондрій.

Перспективи подальших досліджень.

Доцільно дослідити максимальну окисну здатність трансформованих ракових клітин

для оцінювання можливих біоенергетичних механізмів резистентності до хіміотерапевтичних препаратів.

Дослідження виконані в рамках проекту для молодих учених Львівського національного університету ім. Івана Франка завдяки фінансовій підтримці компанії «Material Phases Data System» (Швейцарія).

1. Fogg V. C., Lanning N. J., MacKeigan J. P. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer*, 2012, 30, (8), pp. 526–539.

2. Modica-Napolitano J. S., Singh K. K. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*, 2004, 4, (5–6), pp. 755–762.

3. Martin-Requero A., Ayuso M. S., Parrilla R. Rate-limiting steps for hepatic gluconeogenesis. Mechanism of oxamate inhibition of mitochondrial pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, (30), pp. 13973–13978.

4. Wallace D. C., Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12, (10), pp. 685–698.

5. Wahrheit J., Nonnenmacher Y., Sperber S., Heinzle E. High-throughput respiration screening of single mitochondrial substrates using permeabilized CHO cells highlights control of mitochondria metabolism. *Engineering in Life Sciences*, 2015 15, (2), pp. 184–194. doi: 10.1002/elsc.201400175.

6. Srisawang P., Chatsudthipong A., Chatsudthipong V. Modulation of succinate transport in Hep G2 cell line by PKC. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, 2007, 1768, (6), pp. 1378–1388.

7. Chen X. Z., Shayakul C., Berger U. V., Tian W., Hediger M. A. Characterization of a rat Na^+ -dicarboxylate cotransporter. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, pp. 20972–20981.

8. Stoll B., Hussinger D. Eur. Functional hepatocyte heterogeneity. Vascular 2-oxoglutarate is almost exclusively taken up by perivenous, glutamine-synthetase-containing hepatocytes. *J. Biochem.*, 1989, 181, pp. 709–716.

9. Hreniukh V., Lootsik M., Stoika R., Babsky A. Comparative characteristics of respiration and oxidative phosphorylation in the mitochondria of mouse liver and lymphoma

NK/Ly. *Studia Biologica*, 2015, 9, (2), in print. (in Ukrainian)

10. Schulz H. U., Pross M., Meyer F. et al. Acinar cell respiration in experimental acute pancreatitis. *Shock*, 1995, 3, pp. 184–188.

11. Brand M. D., Nicholls D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.*, 2011, 435, pp. 297–312.

12. Horbay R. O., Manko B. O., Manko V. V., Lootsik M. D., Stoika R. S. Respiration characteristics of mitochondria in parental and giant transformed cells of the murine Nemeth-Kellner lymphoma. *Cell Biol Int.*, 2012, 36, (1), pp. 71–77.

13. MacDonald M. J., Fahien L. A. Insulin release in pancreatic islets by a glycolytic and a Krebs cycle intermediate: contrasting patterns of glyceraldehyde phosphate and succinate. *Arch Biochem Biophys.*, 1990, 279, (1), pp. 104–108.

14. Rognstad R. Gluconeogenesis in rat hepatocytes from monomethyl succinate and other esters. *Arch Biochem Biophys.* 1984, 230, (2), pp. 605–609.

15. Hreniukh V., Lehka L., Yelisyeyeva O., Panchuk R., Stoika R., Babsky A. Effect of landomycin a on respiration and oxidative phosphorylation in mitochondria. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, 2015, 69, pp. 49–56. (in Ukrainian)

16. 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, pp. 1–6.

17. 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), pp. 80–86. (in Ukrainian)

18. 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. *Biotechnologia Acta*, 2013, 6 (3), p. 53–62. (in Ukrainian)

19. Nicholls D. G., Ferguson S. Bioenergetics (Fourth Edition). 2013. Academic Press. 434 p.

20. Paul S., O'Shea P. S., Chappell B. J. The relationship between the rate of respiration and the protonmotive force. *Biochem. J.*, 1984, 219, pp. 401–404.

21. Manko B., Voloshyn D., Manko V. Respiration of isolated acini of rat pancreas. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*, 2013, 61, pp. 172–179. (in Ukrainian)

22. Carpenter J. H. New measurements of oxygen solubility in pure and natural water. *Limnol. Oceanogr.*, 1966, 11, pp. 264–277.

23. Derkach M., Humetsky R., Chaban M. The course of variation statistics. Kyiv, High School, 1977, 206 p. (in Ukrainian)

24. Bychkova S., Hreniuh V. ATPase activity in microsomal fraction of lymphoma NK/Ly cells under bafilomycin and NAADP presence. *Studia Biologica*, 2015, 9, (2), in print. (in Ukrainian)

25. Heytler P. G. A new class of uncoupling agents — Carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1962, 7, (4), pp. 272–275.

26. Hinkle P. C. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1706, pp. 1–11.