



УДК: 57.042.5

## Мембранний потенціал мітохондрій за дії сураміну

Надія Купиняк<sup>1,3</sup>, Ірина Охай<sup>2</sup>, Володимир Манько<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

<sup>2</sup> Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна

<sup>3</sup> Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна

Адреса для листування: [nadiya.kupynyak@gmail.com](mailto:nadiya.kupynyak@gmail.com)

Отримано: 12.03.18; прийнято до друку: 20.04.18; опубліковано: 25.06.18

**Резюме.** Відомо, що сурамін є агоністом ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів ендоплазматичного ретикулуму (RyRs). Ми припустили, що він може бути агоністом і мітохондріальних ріанодинчутливих  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів (mRyRs). Для перевірки цього припущення досліджено зміни мембранного потенціалу мітохондрій гепатоцитів під впливом сураміну. Сурамін у концентрації 1 мкмоль/л додавали до середовища інкубації, після цього вносили суспензію ізольованих мітохондрій та реєстрували їхній мембранний потенціал. Вимірювання мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали з використанням метилтрифенілфосфоніум броміду (TRMP<sup>+</sup>) і чутливого до нього електрода. Для ініціації дихання вносили субстрати окиснення сукцинат, піруват або  $\alpha$ -кетоглутарат у концентраціях 5 ммоль/л, а для стимуляції окисного фосфорилування – 320 нмоль АДФ. Установлено, що ефект сураміну на мембранний потенціал мітохондрій залежить від наявності в середовищі інкубації субстратів окиснення та фосфорилування. За окиснення екзогенного сукцинату під впливом сураміну мембранний потенціал мітохондрій у стані  $S_4$  за Чансом і Вільямсом (1955) зменшився на 5,88 % відносно контролю, що, можливо, спричинено використанням енергії мембранного потенціалу мітохондрій на транспортування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій. За окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату сурамін спричиняв збільшення мембранного потенціалу мітохондрій у стані  $S_4$  на 15,2 %, а за окиснення пірувату – на 39,1 %, порівняно з контролем. Збільшення мембранного потенціалу мітохондрій у стані  $S_4$  під впливом сураміну за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату й пірувату пов'язане, мабуть, з активацією  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного чи піруватдегідрогеназного комплексів, які, на відміну від сукцинатдегідрогенази, є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними ферментами. Отже, сурамін у концентрації 1 мкмоль/л, активуючи мітохондріальні ріанодинчутливі  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів гепатоцитів щура, спричиняє збільшення надходження  $\text{Ca}^{2+}$  у матрикс мітохондрій, активацію  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних дегідрогеназ і збільшення мембранного потенціалу мітохондрій.

**Ключові слова:** RyRs, mRyRs, сурамін,  $\Delta\psi$ , субстрати окиснення.

## Effect of Suramin on Mitochondrial Membrane Potential

Nadiya Kupynyak<sup>1,3</sup>, Irina Okhai<sup>2</sup>, Volodymyr Manko<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Danylo Halytsky Lviv National Medical University Lviv, Ukraine

<sup>2</sup> Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup> Lviv National University of Ivan Franko, Lviv, Ukraine

Correspondence: [nadiya.kupynyak@gmail.com](mailto:nadiya.kupynyak@gmail.com)

**Resume.** It is known that suramin is an agonist of the ryanodine sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -channels of the endoplasmic reticulum (RyRs). We hypothesized that it may be an agonist of mitochondrial ryanodine sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -channels (mRyRs) too. The effect of suramin on mitochondrial membrane potential of hepatocytes was

investigated for the test of the hypothesis. Suramin (1  $\mu\text{M}$ ) and isolated mitochondria were added one after another and then membrane potential was recorded. Measurement of the membrane potential of mitochondria was carried out using methyltriphenylphosphonium (TPMP<sup>+</sup>) sensitive electrode. Succinate (5 mM), pyruvate (5 mM) or  $\alpha$ -ketoglutarate (5 mM) and ADP (320 nM) were added, respectively, to initiate respiration and to stimulate oxidative phosphorylation. It has been established that the effect of suramin on the mitochondrial membrane potential depends on the presence substrates for oxidation and phosphorylation in the medium of incubation. Under the influence of suramin, the membrane potential of mitochondria during oxidation of exogenous succinate in the state of  $S_4$  by Chance and Williams (1955) decreased for 5.88% relative to control. This is possibly caused by the usage of energy of the membrane potential of mitochondria for the transport of  $\text{Ca}^{2+}$  ions to the mitochondrial matrix. The suramine increased the mitochondrial membrane potential in the state  $S_4$  for 15.2% during oxidation of  $\alpha$ -ketoglutarate, and with oxidation of pyruvate - for 39.1% relative to control. These increases in the mitochondrial membrane potential are possibly associated with activation of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase or pyruvate dehydrogenase complexes, which, in contrast to succinate dehydrogenase, are  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes. Consequently, suramin at a concentration of 1  $\mu\text{M}$ , activates mitochondrial ryanodine sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -channels of rat hepatocytes and causes an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  intake to mitochondrial matrix by activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent dehydrogenases, and an increase in the membrane potential of mitochondria.

**Key words:** RyRs, mRyRs, suramin,  $\Delta\psi$ , substrates for oxidation.

## Вступ

Сурамін розроблений у 1916 р. для лікування трипаносомозу [1], а пізніше почав використовуватися як протипухлинний препарат [2]. Окрім застосування сураміну як лікарського засобу, його використовують у дослідженнях для інгібування або активації G-білків [3], пуринових рецепторів [4] чи RyRs [5]. На різних клітинах показано, що сурамін є антагоністом P2 пуринергічних рецепторів [4, 6, 7], може інгібувати  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазу ендоплазматичного ретикулуку [8] та інозитол-1,4,5-фосфат індуковане вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$  з ендоплазматичного ретикулуку й, отже, впливає на  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаз [9] та має низку інших ефектів [10].

Відомо, що сурамін є агоністом RyRs типу 1 і 2 [4, 11]. Hohenegger et al. [5] показали, що сурамін сприяє зв'язуванню [<sup>3</sup>H]-ріанодину як із білками RyRs у мембранах саркоплазматичного ретикулуку скелетних і серцевих м'язів кролика, так і з окремими очищеними білками [5]. Дослідження ефекту сураміну на очищеному RyRs зі скелетних м'язів кролика, реконструйованому в ліпідний бішар, засвідчило, що сурамін безпосередньо взаємодіє з цим рецептором і дозозалежно його активує

(50–500 мкмоль/л), не змінюючи провідності каналу [5].

RyRs експресуються в різних клітинах [12], зокрема й у гепатоцитах [13]. У гепатоцитах, окрім RyRs, ідентифіковані mRyRs [14], які, на відміну від RyRs інгібуються ріанодином уже в концентраціях 0,05–1 мкмоль/л. Інгібування mRyRs супроводжується зменшенням внутрішньомітохондріальної концентрації іонізованого  $\text{Ca}^{2+}$ , зниженням мембранного потенціалу, що відображається на енергетичних процесах гепатоцитів. Показано, що ефекти ріанодину залежать від його концентрації та екзогенних субстратів окиснення [14, 15]. Оскільки сурамін є агоністом RyRs і потенційно mRyRs, **мета роботи** – дослідити зміни мембранного потенціалу мітохондрії за його дії.

## Матеріали й методи

Досліди виконані на білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г. Тварин утримували в стаціонарних умовах віварію за постійної температури на основному раціоні. Їх наркотизували хлороформом, після чого декапітували, робили розтин черевної порожнини й швидко виділяли печінку. Ін'єкцію та декапітацію здійснювали в лабораторії, ізольовано від

інших тварин. Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин щодо дослідних й інших наукових цілей та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Мітохондрії печінки щурів виділяли методом диференційного центрифугування [16]. Для цього печінку після виділення зважували та перфузували розчином такого складу (ммоль/л): NaCl –140, KCl – 4,7, MgCl<sub>2</sub> –1, CaCl<sub>2</sub> – 0,1, глюкоза – 5, HEPES – 10, EGTA – 1; рН 7,4. Охолоджену й відперфузовану печінку подрібнювали через прес і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера-Евельгейма зі швидкістю 800 об./хв за трьох вертикальних ходів тefлонового етовкачика у співвідношенні 1 г тканини до 8 мл середовища гомогенізації. Середовище гомогенізації та виділення містило (ммоль/л): сахарозу – 250, HEPES – 10, EGTA – 1; рН 7,2. Гомогенат центрифугували 3 хв за прискорення 150 g та 5 хв за 300 g без зупинки центрифуги для осадження уламків клітин і ядер. Мітохондріальну фракцію отримували з надосадової рідини центрифугуванням супернатанту впродовж 15 хв за 4500 g і температури 0–2°C. Отриманий осад мітохондрій ресуспензували середовищем виділення у співвідношенні 1 г тканини до 0,1 мл середовища. Отриману суспензію мітохондрій використовували для подальших досліджень. Концентрацію мітохондріального білка вимірювали за методом Лоурі [17].

Визначення мембранного потенціалу мітохондрій здійснювали за методом, описаним Брандом і співавт. [18, 19], із використанням ліполітичного катіона – метилтрифенілфосфоніум броміду (triphenyl-methylphosphonium bromide, TPMP<sup>+</sup>) і чутливого до нього електрода. Мітохондрії інкубували в середовищі, що містило (ммоль/л) сахарозу – 250, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2, EGTA – 0,1, CaCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 10, 5 % знежиреного БСА; рН 7,2. У герметичну, термостатовану комірку (37°C) із

постійним перемішуванням за допомогою магнітної мішалки, обладнаною TPMP<sup>+</sup>-селективним електродом, вносили мітохондрії з розрахунку 2 мг/мл білка. Для калібрування TPMP<sup>+</sup>-селективного електрода (у кожному вимірюванні) чотириразово додавали TPMP<sup>+</sup>, збільшуючи концентрацію від 10 до 40 мкмоль/л. Для ініціації дихання вносили субстрати окиснення – сукцинат, піруват та α-кетоглутарат – у концентраціях 5 ммоль/л. Дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація у комірці 200 мкмоль/л). Споживання кисню суспензією мітохондрій контролювали за допомогою електрода Кларка. Сигнал з електродів передається через потенціометр «Sartorius» (Німеччина) і газоаналізатор BMS 3 Mk 2 Radiometer (Данія) на плату АЦП L-card і реєструється на персональному комп'ютері за допомогою програмного забезпечення. Мембранний потенціал мітохондрій ( $\Delta\psi_m$ ) розраховували в станах  $\_$  і  $\_$  (стан  $S_4$  – без АДФ, стан  $S_3$  – наявний екзогенний АДФ для стимуляції окисного фосфорилування) за Чансом та Вільямсом [20] за рівнянням Нернста:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{[TPMP^+]_{in}}{[TPMP^+]_{out}} \right),$$

де  $R$  – універсальна газова стала,  $T$  – абсолютна температура,  $z$  – валентність,  $F$  – число Фарадея,  $[TPMP^+]_{in}$  і  $[TPMP^+]_{out}$  – концентрація катіона TPMP<sup>+</sup> усередині мітохондрій та в середовищі інкубації відповідно.

Математично-статистичне опрацювання даних здійснювали, використовуючи пакет програм Microsoft Excel. Вірогідність різниці між статистичними групами визначали за Ст'юдентом. За статистично достовірні приймали зміни з  $P < 0,05$ .

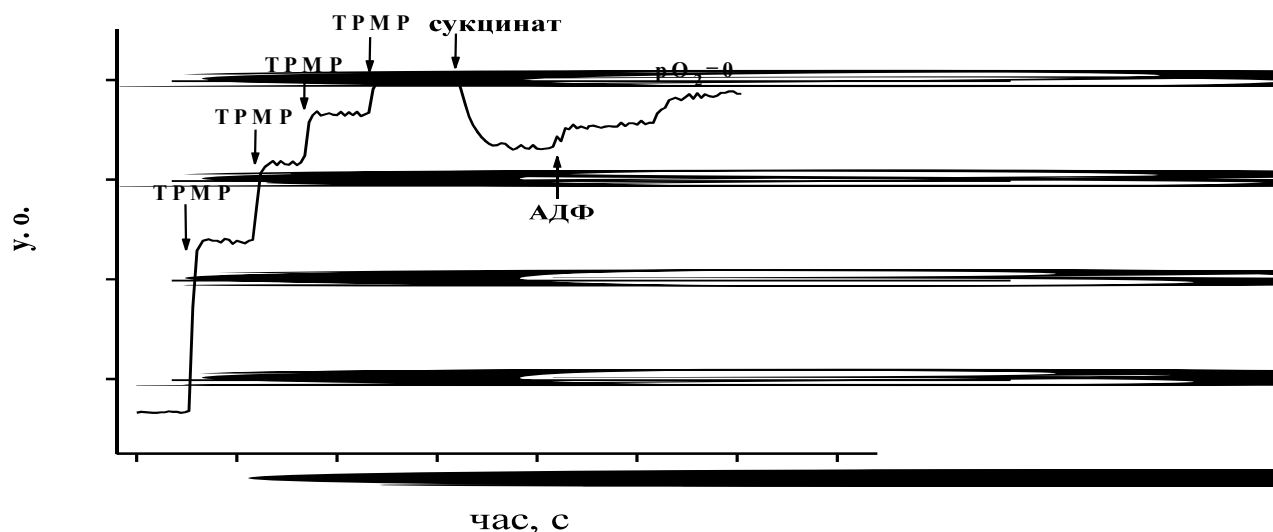
## Результати та їх обговорення

У дослідженні мембранного потенціалу мітохондрій використали як потенційний

агоніст mRyRs сурамін (1 мкмоль/л), який додавали до середовища інкубації, після чого вносили суспензію ізольованих мітохондрій та реєстрували їхній мембранний потенціал.

Як субстрат  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежної дегідрогенази використали сукцинат [21, 22], а як субстрати  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних ферментів – піруват- та  $\alpha$ -кетоглутарат [23]. Установлено, що значення мембранного потенціалу мітохондрій, які реєстрували за окиснення сукцинату, були вищими, порівняно з його значеннями за окиснення пірувату чи  $\alpha$ -кетоглутарату. Це пов'язано з тим, що за окиснення екзогенного сукцинату немає лімітуючого чинника, яким є ще один субстрат циклу Кребса – малат для окиснення пірувату чи  $\alpha$ -кетоглутарату [22, 24]. На мітохондріях печінки щурів різними іншими дослідниками теж засвідчило, що значення

мембранного потенціалу мітохондрій є вищими за окиснення сукцинату порівняно зі значеннями отриманими за окиснення інших субстратів. Зокрема, методом проточної цитометрії з використанням потенціалчутливого флуоресцентного зонда  $\text{TMRM}^+$  встановлено, що мембранний потенціал мітохондрій за окиснення сукцинату був вищий, порівняно з таким за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату на 79,0 %, а за окиснення пірувату – на 41,1 % [14]. Labajova et al. [25] підтвердили, що ротенон спричиняв дисипацію мембранного потенціалу мітохондрій унаслідок інгібування комплексу I дихального ланцюга, але після додавання сукцинату (субстрат комплексу II) мембранний потенціал збільшувався до попередніх значень або навіть вищих за ті, які були отримані за окиснення пірувату та малату.



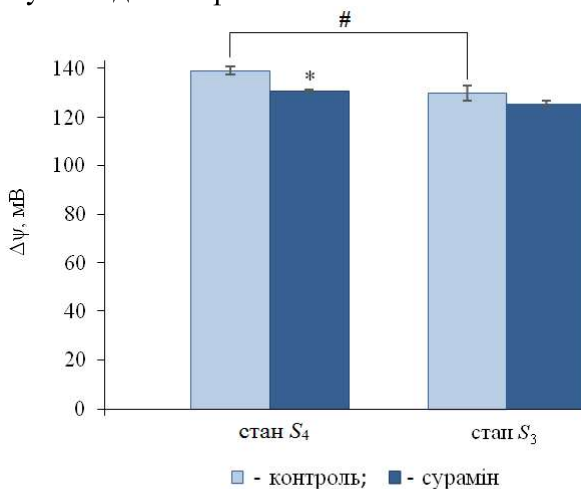
**Рис. 1.** Приклад реєстрації мембранного потенціалу мітохондрій із  $\text{TMRM}^+$ -селективним електродом за послідовного додавання  $\text{TMRM}^+$ , сукцинату та АДФ: суспензію ізольованих мітохондрій додавали до середовища інкубації, де був відсутній (контроль) чи наявний (дослід) сурамін (1 мкмоль/л), а потім чотири рази додавали  $\text{TMRM}^+$  (для досягнення концентрації 10, 20, 30 і 40 мкмоль/л); як субстрати окиснення використовували сукцинат, 5 ммоль/л; дихання стимулювали додаванням 320 нмоль АДФ (кінцева концентрація в комірці 200 мкмоль/л)

Ефект сураміну на мембранний потенціал мітохондрій залежить від наявності в середовищі інкубації

субстратів окиснення й фосфорилування. За окиснення екзогенного сукцинату сурамін знижує мембранний потенціал

мітохондрій у стані  $S_4$  за Чансом і Вільямсом (1955), – на 5,88 % відносно контролю (рис. 2). Це зниження, на нашу думку, спричинене використанням енергії мембранного потенціалу мітохондрій на транспортування іонів  $Ca^{2+}$  у матрикс мітохондрій проти їх концентраційного градієнта.

Саме по собі додавання екзогенного АДФ до середовища в контролі також призводить до зменшення мембранного потенціалу мітохондрій (приблизно на 6,51 %) – унаслідок, очевидно, активації АТФ-синтази, яка використовує протонний градієнт для синтезу АТФ (рис. 2, стан  $S_3$ ). За наявності АДФ у середовищі зниження мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну не досягає першого ступеня достовірності.



**Рис. 2.** Зменшення мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну за окиснення **сукцинату**: стан  $S_4$  – без АДФ, стан  $S_3$  – додавали екзогенний АДФ для стимуляції окисного фосфорилування;  $[сурамін] = 1$  мкмоль/л,  $[сукцинат] = 5$  ммоль/л,  $[АДФ] = 200$  мкмоль/л,  $[Ca^{2+}] = 0,1$  мкмоль/л; \* – статистично вірогідна різниця відносно контролю з  $P \leq 0,05$ , # – відносно стану  $S_4$  з  $P \leq 0,05$ ,  $n = 3$

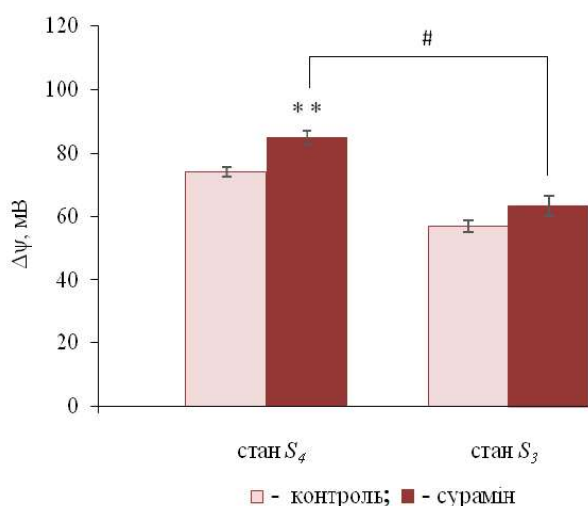
За окиснення екзогенних пірувату та  $\alpha$ -кетоглутарату сурамін спричиняв зростання мембранного потенціалу мітохондрій у стані  $S_4$ . За окиснення

$\alpha$ -кетоглутарату це збільшення становило 15,2 % відносно контролю (рис. 3), а за окиснення пірувату – 39,1 % (рис. 4). Таке збільшення мембранного потенціалу мітохондрій у стані  $S_4$  під впливом сураміну за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату і пірувату пов'язане, мабуть, з активацією  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного чи піруватдегідрогеназного комплексів, які є  $Ca^{2+}$ -залежними ферментами [23, 26]. Сурамін активує, очевидно, mRyRs, збільшується надходження  $Ca^{2+}$  у матрикс мітохондрій, активуються  $Ca^{2+}$ -залежні дегідрогенази, що й спричиняє збільшення мембранного потенціалу мітохондрій.

Зміни мембранного потенціалу мітохондрій у стані  $S_4$  під впливом сураміну за наявності в середовищі інкубації екзогенного пірувату є більш вираженими. Обидва ферменти (піруватдегідрогеназний та  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекси) активуються катіонами  $Ca^{2+}$ , але їх чутливість до катіонів  $Ca^{2+}$  та способи активації є різними. Дентон [26] встановив, що активність піруватдегідрогеназного комплексу збільшується в діапазоні концентрацій  $Ca^{2+}$  від 0,01 до 0,1 мкмоль/л; за вищих концентрацій  $Ca^{2+}$  його активність навіть трохи зменшується. Встановлено, що  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс зв'язує від 2,5 до 5 іонів  $Ca^{2+}$ /моль комплексу [27], а його активність збільшується, починаючи вже від концентрації  $Ca^{2+}$  0,001 мкмоль/л [23]. Іони  $Ca^{2+}$  активують  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназний комплекс шляхом модуляції афінності ферменту до  $\alpha$ -кетоглутарату [28]. На відміну від  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу регулювання активності піруватдегідрогеназного комплексу реалізується на двох основних рівнях: інгібування активної (дефосфорильованої форми) піруватдегідрогенази продуктами її реакції – ацетил-СоА та НАДН; унаслідок взаємоперетворення активної (дефосфорильованої) і неактивної (фосфорильованої) форми піруватдегідрогенази. Ці взаємоперетворення ката-

лізуються алостеричними, регуляторними ферментами: протеїнкіназою піруватдегідрогенази (декарбоксілюючої) та протеїнфосфатазою. Фосфатаза відновлює активність піруватдегідрогеназного комплексу унаслідок його дефосфорилування. Зв'язування фосфатази з дигідроліпоїл-трансацетилазою відбувається за участю іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , коли комплекс фосфорильований, після чого переводить піруватдегідрогеназний комплекс із неактивного в активний стан, тобто  $\text{Ca}^{2+}$  активує фосфатазу, водночас інгібує кіназу, яка інактивує комплекс. Важливо відзначити те, що чутливість  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу до іонів  $\text{Ca}^{2+}$  збільшується за рахунок зниження АТФ/АДФ співвідношення, тоді як на чутливість фосфатази піруватдегідрогенази це може не впливати, тому в деяких умовах активація  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназного комплексу може спостерігатися за нижчих концентрацій іонів  $\text{Ca}^{2+}$ , ніж у піруватдегідрогеназного [26, 29].

На тлі  $\alpha$ -кетоглутарату і АДФ сурамін не змінював мембранний потенціал мітохондрій у стані  $S_3$  (рис. 3).



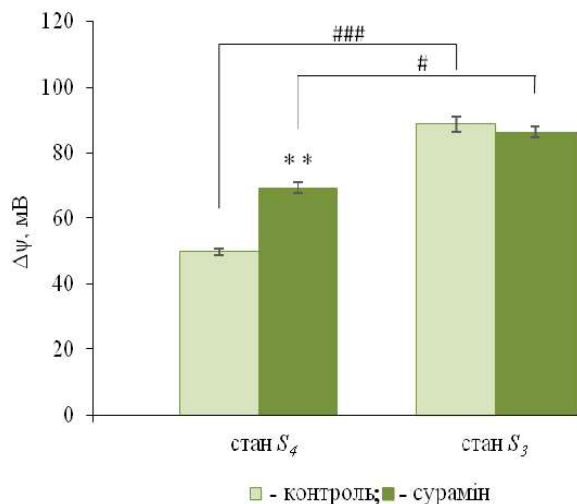
**Рис. 3.** Збільшення мембранного потенціалу мітохондрій під впливом сураміну за окиснення  $\alpha$ -кетоглутарату: стан  $S_4$  – без АДФ, стан  $S_3$  – додавали екзогенний АДФ

для стимуляції окисного фосфорилування; [сурамін] = 1 мкмоль/л, [ $\alpha$ -кетоглутарат] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, [ $\text{Ca}^{2+}$ ] = 0,1 мкмоль/л; \*\* - статистично вірогідна різниця відносно контролю -,  $P \leq 0,01$ ; відносно стану — — #,  $P \leq 0,05$ ; n = 3

За окиснення пірувату додавання АДФ у контролі спричиняє статистично вірогідне збільшення мембранного потенціалу мітохондрій на 78,5 %, а на тлі сураміну – лише на 24,7 % (рис. 4). Сам по собі сурамін не спричиняв змін мембранного потенціалу у стані  $S_3$ . Очевидно, стимуляція піруватдегідрогеназного комплексу внаслідок додавання АДФ маскує потенційну його активацію катіонами  $\text{Ca}^{2+}$ . Відомо, що АДФ інгібує кіназу піруватдегідрогенази, конкуруючи з АТФ [30]. Якщо у внутрішньомітохондріальному просторі концентрація АТФ та АДФ становить від 0,5 до 6 мкмоль/л, а  $K_m$  для кінази піруватдегідрогенази для АТФ – лише 0,02 ммоль/л, то ця кіназа була би завжди насиченою АТФ і не відбувалося б конкурентного гальмування АДФ [31].  $K_i$  кінази піруватдегідрогенази для АДФ становить від 0,03 до 0,1 моль/л і залежить від концентрації калію [31]. Оскільки гальмування АДФ є конкурентно спроможним, а рівні АДФ і АТФ, як правило, змінюються в протилежних напрямках, досить складно сказати, чи зміна у співвідношенні АДФ до АТФ спричинена підвищеним рівнем АДФ чи зниженням АТФ. В обох випадках конкуренція між нуклеотидами є важливим чинником, що визначає активність кінази піруватдегідрогенази в ізольованих мітохондріях печінки, а внутрішньомітохондріальне співвідношення АТФ/АДФ є важливим регулятором кінази піруватдегідрогенази [31]. Окрім співвідношення АТФ/АДФ, на активність кінази піруватдегідрогенази впливають також інші чинники. Зокрема, збільшення мітохондріального рівня  $\text{НАД}^+$  та

CoA стимулює інактивацію цього фермента [32].

У мітохондріях печінки щура ідентифіковані mRyRs [14]. Показано, що mRyRs інгібуються ріанодином у концентраціях 0,05–1 мкмоль/л і це супроводжується зменшення внутрішньомітохондріальної концентрації



**Рис. 4.** Вплив сураміну на мембранний потенціал мітохондрій за окиснення пірувату: стан S<sub>4</sub> – без АДФ, стан S<sub>3</sub> – додавали екзогенний АДФ для стимуляції окисного фосфорилування; [сурамін] = 1 мкмоль/л, [піруват] = 5 ммоль/л, [АДФ] = 200 мкмоль/л, [Ca<sup>2+</sup>] = 0,1 мкмоль/л; статистично вірогідна різниця відносно контролю – \*\*, P ≤ 0,01; відносно стану — # з P ≤ 0,05; і ### з P ≤ 0,001; n = 3

внутрішньомітохондріальної концентрації іонізованого Ca<sup>2+</sup> [14]. Відтак mRyRs у гепатоцитах є важливою ланкою регуляторного зв'язку між значенням мембранного потенціалу мітохондрій та інтенсивністю їхнього дихання за низьких (фізіологічних) значень позамітохондріальної концентрації Ca<sup>2+</sup>. Коли піруват є основним субстратом окиснення, mRyRs забезпечують надходження в матрикс мітохондрій Ca<sup>2+</sup>, активацію піруватдегідрогеназного комплексу й інтенсифікацію дихання, що запобігає

зменшенню мембранного потенціалу мітохондрій. Якщо ж переважає окиснення α-кетоглутарату, надходження Ca<sup>2+</sup> за допомогою mRyRs, навіть за фізіологічної їх концентрації, то призводить до пригнічення процесів дихання. За вищих концентрацій Ca<sup>2+</sup> їх акумуляція системою mRyRs негативно впливає на дихання за окиснення як пірувату, так і α-кетоглутарату [15].

Сурамін є агоністом RyRs і, mRyRs гепатоцитів. Ефект його на мембранний потенціал мітохондрій залежить від субстратів окиснення й фосфорилування наявних у середовищі інкубації, за окиснення екзогенного сукцинату сурамін знижує мембранний потенціал мітохондрій у стані S<sub>4</sub>, а за окиснення екзогенних пірувату та α-кетоглутарату – навпаки, збільшення. Очевидно, за окиснення сукцинату активація mRyRs призводить до транспортування Ca<sup>2+</sup> у матрикс мітохондрій, водночас сукцинатдегідрогенази не регулюється самими катіонами Ca<sup>2+</sup> [20], тому компенсаторної інтенсифікації дихання не відбувається. За використання α-кетоглутарату чи пірувату надходження Ca<sup>2+</sup> інтенсифікує активність ферментів, що веде до збільшення мембранного потенціалу мітохондрій, але лише в стані S<sub>4</sub>.

## Література

1. Dressel, J. The discovery of germanin by Oskar Dressel and Richard Kothe. *J. Chem. Ed.* 1961, 38 (12), pp 620–621.
2. Stein, C. A.; Larocca, It. V.; Thomas, R.; Mcame, N.; Myzas, C. E. Suramin: An anticancer drug with a unique mechanism of action. *J. Clin. Oncol.* 1989, 7 (4), pp 499–508.
3. Beindl, W.; Mitterauer, T.; Hohenegger, M.; Ijzerman, A. P.; Nanoff, C.; Freissmuth, M. Inhibition of receptor G-protein coupling by suramin analogues. *Molecular Pharmacology.* 1996, 50 (2), pp 415–423.
4. Burnstock, G. Purinergic signalling in the urinary tract in health and disease. *Purinergic Signal.* 2014, 10 (1), pp 103–155.
5. Hohenegger, M.; Mathyash, M.; Poussu, K.; Herrmann-Frank, A.; Sarközi, S.; Lehmann-Horn, F.; Freissmuth, M. Activation of the skeletal muscle

- ryanodine receptor by suramin and suramin analogs. *Mol. Pharmacol.* 1996, 50 (6), pp 1443–1453.
6. Dunn, P. M.; Blakeley, A. G. Suramin: A reversible P<sub>2</sub>-purinoceptor antagonist in the mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 1988, 93 (2), pp 243–245.
7. El-Ajouz, S.; Ray, D.; Allsopp, R. C.; Evans, R. J. Molecular basis of selective antagonism of the P2X1 receptor for ATP by NF449 and suramin: contribution of basic amino acids in the cysteine-rich loop. *Br J Pharmacol.* 2012, 165 (2), pp 390–400.
8. Layton, D.; Azzi, A. Suramin: a potent inhibitor of the calcium transport in sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974, 59 (1), pp 322–325.
9. Seewald, M. J.; Olsen, R. A.; Powis, G. Suramin blocks intracellular Ca<sup>2+</sup> release and growth factor-induced increases in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration. *Cancer Lett.* 1989, 49 (2), pp 107–113.
10. Voogd, T. E.; Vansterkenburg, E. L.; Wilting, J.; Janssen, L. H. Recent research on the biological activity of suramin. *Pharmacol. Rev.* 1993, 45(2), pp 177–203.
11. Sitsapesan, R.; Williams, A. J. Modification of the conductance and gating properties of ryanodine receptors by suramin. *J Membr Biol.* 1996, 153 (2), pp 93–103.
12. Fill, M.; Copello, J. A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 2002, 82 (4), pp 893–922.
13. Pierebon, N.; Renard-Rooney, D.; Gaspers, L. Ryanodine receptors in liver. *J. Biol. Chem.* 2006, 45, pp 34086–34095.
14. Купуныак, Н. І.; Іккерт, О. В.; Шлыков, С. Г.; Бабич, Л. Г.; Манко, В. В. Mitochondrial ryanodine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels of rat liver. *Cell Biochemistry and Function.* 2017, 35 (1), pp 42–49.
15. Купиняк, Н. І.; Іккерт, О. В.; Манько, В. В. Роль ріанодинчутливих Ca<sup>2+</sup>-каналів у регуляції дихання мітохондрій печінки щурів. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна.* 2017. Вип. 76. с. 193–205.
16. Jonson, D.; Lardy, H. *Methods in Enzymology.* New York. 1967, 10, pp 94–102.
17. Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193 (1), pp 265–275.
18. Brand, M. D.; Brown, G. C.; Cooper, C. E. *Bioenergetics: a practical approach;* Oxford. IRL Press, 1995: pp 39–62.
19. Nadtochiy, S. M.; Tompkins, A.; Brookes, P. S. Different mechanisms of mitochondrial proton leak in ischemia/reperfusion injury and precondition: implications for pathology and cardioprotection. *Biochem. J.* 2006, 395 (3), pp. 611–618.
20. Chance, B.; Williams, G. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. The steady state. *J. Biol. Chem.* 1955, 217, pp. 409–427.
21. Panov, A. V.; Scaduto, R. C. Influence of calcium on NADH and succinate oxidation by rat heart submitochondrial particles. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1995, 316 (2), pp. 815–820.
22. Rutter, J.; Winge, D. R.; Schiffman, J. D. Succinate Dehydrogenase – Assembly, Regulation and Role in Human Disease Mitochondrion. 2010, 10(4) pp. 393–401.
23. Denton, R. M. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1787 (11), 1309–1316.
24. Bookelman, H. J.; Trijbels, M. F.; Sengers, R. C.; Janssen, A.J.; Veerkamp, J. H.; Stadholjders, T A. Pyruvate oxidation in rat and human skeletal muscle mitochondria. *Biochemical Medicine.* 1978, 20 (3), pp. 395–403.
25. Labajova, A.; Vojtiskova, A.; Krivakova, P.; Kofranek, J.; Drahotka, Z.; Houstek, J. Evaluation of mitochondrial membrane potential using a computerized device with a tetraphenylphosphonium-selective electrode. *Anal Biochem.* 2006, 353 (1), pp. 37–42.
26. Denton, R. M.; McCormack, J. G.; Rut-I-Er, G. A.; Burnett, P.; Edgell, N. J.; Moule, S. K.; Diggle, T. A. The hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase complex. *Adv Enzyme Regul.* 1996, 36, pp. 183–198.
27. Rutter, G. A.; Denton R. M. The binding of Ca<sup>2+</sup> ions to pig-heart NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase and the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem. J.*, 1989, 263 (2), pp. 453–462.
28. Qi, F.; Pradhan, R. K.; Dash, R. K.; Beard, D. A. Detailed kinetics and regulation of mammalian 2-oxoglutarate dehydrogenase. *BMC Biochem.* 2011, 26, pp. 12–53.
29. Wan, B.; Lanoue, K. F.; Cheung, J. Y.; Scaduto, R. C. Regulation of citric-acid cycle by calcium. *J. Biol. Chem.* 1989, 264 (23), pp. 13430–13439.
30. Siess, E. A.; Wieland, O. H. Regulation of pyruvate dehydrogenase interconversion in isolated hepatocytes by the mitochondrial ATP/ADP. ratio. *FEBS Lett.* 1975, 52 (2), pp. 226–30.
31. Taylor, S. I.; Mukherjee, C.; Jungas, R. L. Regulation of pyruvate dehydrogenase in isolated rat liver mitochondria. Effects of octanoate, oxidation-reduction state, and adenosine triphosphate to adenosine diphosphate ratio. *J Biol Chem.* 1975, 250 (6), pp. 2028–2035.
32. Roche, T. E.; Baker, J. C.; Yan, X.; Hiromasa, Y.; Gong, X.; Peng, T.; Dong, J.; Turkan, A.; Kasten, S. A. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001, 70, pp. 33–75.