ფლავონოიდი ნობილეტინის გავლენა მიტოქონდრიების ენერგეტიკულ ცვლაზე

ნინო შარიქაძე

სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და საინჟინრო ფაკულტეტზე სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნების შესაბამისად

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ელენე ჟურავლიოვა, ასოცირებული პროფესორი, დოქტორი ბიოლოგიაში

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი 2018

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის (ფლავონოიდი ნობილეტინის გავლენა მიტოქონდრიების ენერგეტიკულ ცვლაზე) ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

ნინო შარიქაძე

თარიღი 05.02.2018

აბსტრაქტი

მიტოქონდრიული დისფუნქციების პრევენცია და მკურნალობა თანამედროვე მოლეკულური მედიცინის ერთ-ერთ ყველაზე აქტუალურ პრობლემას წარმოადგენს. მიტოქონდრიულ დისფუნქციებთან ასოცირებულია მრავალი ტიპის, მათ შორის ნეიროდეგენერაციული დაავადებები, როგორიცაა პარკინსონის და ალცჰაიმერის დაავადებები. ამ კუთხით განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს მცენარეული წარმოშობის პოლიფენოლური ნაერთების მიტოქონდრიაში მიმდინარე პროცესებზე ზემოქმედების შესწავლა, რაც განპირობებულია ამ ნაერთების მაღალი ბიოლოგიური შეღწევადობით და ეკონომიკური ხელმისაწვდომობით საზოგადოების ფართო მასებისათვის. ეს ნაერთები შესაძლებელია იყვნენ პოტენციური კანდიდატები როგორც სიმსივნური დაავადებების პროფილაქტიკასა და მკურნალობისსთვის, ასევე ნეიროდეგენერაციული და ზოგადად მიტოქონდრიული დისფუნქციით მიმდინარე დარღვევების ახალი თერაპიული სტრატეგიისათვის.

ნობილეტინი წარმოადგენს ციტრუსის O-მეთილირებულ ფლავონოიდს, რომელიც ხასიათდება ანტისიმსივნური, ანტივირუსული, ნეიროპროტექტორული, ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებით და უჯრედის ტიპიდან გამომდინარე აქვს როგორც პრო- ასევე ანტიაპოპტოზური მოქმედება. აქედან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ნობილეტინის ზეგავლენის შესწავლა მიტოქონდრიაში მიმდინარე ენერგეტიკული პროცესების ინტენსივობაზე.

ჩვენი მონაცემების მიხედვით ნობილეტინი ამცირებს ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებულ მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარებას გლუტამატისა და მალატის თანაობისას, ხოლო სუქცინატის თანაობისას ზრდის. პარალელურად, ნობილეტინი ზრდის NADH-ის დაჟანგვასა და α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზის აქტივობას, ასევე სუბსტრატული ფოსფორილირების გზით აძლიერებს α-კეტოგლუტარატ-დამოკიდებულ ატფ-ის პროდუქციას. ამის გარდა, გაირკვა, რომ ნობილეტინი ამცირებს პეროქსიდების წარმოქმნას სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის სუბსტრატების თანაობისას და მცირედით ზრდის სუქცინატ-დამოკიდებულ H_2O_2-ის პროდუქციას. ამავდროულად, ნობილეტინი ტრანზიტორულად იწვევს

მიტოქონდრიების მემბრანულ პოტენციალის ცვლილებებს, რასაც თან სდევს დეპოლარიზაცია. აფინური ქრომატოგრაფიის გზით გასუფთავებულმა ნობილეტინ-დამაკავშირებელი ფრაქციის ცილების ანალიზმა გამოავლინა ანტი-NDUFV1 პოზიტიური, 52kD-ის მქონე ცილა NADH: უბიქინონ ოქსიდორეტუქტაზული აქტივობით. ამ ფრაქციას შეუძლია თავისუფალი რადიკალების (პეროქსიდები) წარმოქმნა, რომელსაც აინჰიბირებს ნობილეტინი. ჩვენი ვარაუდით, ნობილეტინი მოქმედებს როგორც ერთგვარი შეუღლების „დამთიშველი“, რომელიც α-კეტოგლუტარატ დეჰიდროგენაზის აქტივობისა (α-KGDH-კომპლექსის) და მატრიქსის სუბსტრატული ფოსფორილირების გაზრდით ხელს უწყობს მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის შენარჩუნებას ნორმალურ დონეზე. მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის ამ ტიპის გადართვამ შესაძლებელია გაზარდოს სუქცინატით გამოწვეული ჟანგბადის მოხმარება, რაც საფუძვლად უდევს ნობილეტინის როგორც პრო ასევე ანტი - აპოპტოზურ ეფექტს. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ნობილეტინმა შესაძლებელია დადებითად იმოქმედოს თავის ტვინის იშემიურ-რეპერფუზიულ დარღვევებზე.

NDUFV1, რომელიც ნობილეტინის მოქმედების ერთ-ერთ სავარაუდო სამიზნედ გვევლინება, წარმოადგენს NADH:უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზის შვიდი მნიშვნელოვანი სუბერთეულიდან, ე.წ. ერთ-ერთს, რომელიც აკატალიზებს NADH-ის დაჟანგვას და ელექტრონთა გადაცემას. მრავალი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების დროს ნანახია მნიშვნელოვან სუბერთეულებში (“core subunits”) მომხდარი დეფექტები. ეს კომპლექსი მოიცავს როტენონ-არამგრძნობიარე NADH-ის დაჟანგვის საიტს, რომელიც წარმოქმნის ROS-ებს და შესაძლებელია წარმოადგენდეს სხვადასხვა ფლავონოიდების მოქმედების სამიზნეს. აქედან გამომდინარე შევისწავლეთ ნობილეტინის გავლენა საფუარის ორი განსხვავებული შტამის (Yeast foam and Candida utilis) ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე.

საფუარის უჯრედულ ხაზზე ჩატარებულმა ექსპერიმენტულმა კვლევებმა გვაჩვენა რომ, ნობილეტინის არარსებობისას საფუარის ინტაქტურ უჯრედებზე უჯრედული სუნთქვა იყო სტაბილური, ნობილეტინის დამატებისას კი ორივე საფუარის შტამში სპონტანური უჯრედული სუნთქვა მცირდებოდა. იზოლირებული მიტოქონდრიების შემთხვევაში კი ნობილეტინით გამოწვეული სუნთქვის

ინჰიბირება ვერ მივიღეთ, ასევე არანაირი ნობილეტინის ეფექტი არ მოგვცა პერმეაბილიზებულ და არაპერმეაბილიზებულ სფეროპლასტებზე ჩატარებულმა მიტოქონდრიული ჟანგბადის მოხმარების გაზომვამ.

ჩვენი შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ნობილეტინით გამოწვეული სუნთქვითი ჯაჭვის ინჰიბირება საფუარის უჯრედებში მოითხოვს ნობილეტინის შიდაუჯრედულ მეტაბოლიზმს. ნობილეტინის ეფექტი მიტოქონდრიაზე შესაძლებელია ასევე აიხსნას საფუარის შიდაუჯრედული სარეგულაციო სისტემების ჩართულობით.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: მიტოქონდრია, საფუარი, ნეიროდეგენერაციული დაავადებები, მიტოქონდრიის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი, ფლავონოიდები, ნობილეტინი.

Abstract

Prevention and treatment of mitochondrial dysfunctions is one of the most actual problem of modern molecular medicine. Mitochondrial dysfunctions, induced by various factors, are associated with pathophysiology of many diseases, such as neurodegenerative: Alzheimer and Parkinson diseases. In this regard, a lot of attention attracts the study of some plant derived polyphenolic compounds effect on mitochondrial bioenergetical processes and their neuroprotective potential. The wide range of positive actions and high hydrophobicity of these compounds give us the possibility to suggest that certain polyphenols easily penetrate tissue barriers and could directly affect mitochondrial bioenergetics. These compounds can be potential candidates for the prevention and treatment of cancer, as well as for the new therapeutic strategy of neurodegenerative and mitochondrial dysfunction caused disorders.

Nobiletin is an O-methylated flavonoid found in citrus peels that has anticancer, antiviral, neuroprotective, anti-inflammatory activities and depending on the cell types exhibits both pro- or anti-apoptotic properties. According to this, the aim of our study was to investigate the effect of nobiletin on intensity of mitochondrial bioenergetics.

We have found that nobiletin decreases oxygen consumption by bovine brain isolated mitochondria in the presence of glutamate and malate and increases in the presence of succinate. In parallel, nobiletin increases NADH oxidation, α-ketoglutaratedehydrogenase activities and through matrix substrate-level phosphorylation elevates the α-ketoglutarate-dependent production of ATP. In addition, nobiletin reduces the production of peroxides in the presence of complex I substrates and slightly enhances succinate-driven H_2O_2 formation. Besides, nobiletin induces transient elevation of membrane potential followed by mild depolarization. Affinity purified nobiletin binding proteins revealed one major anti-NDUFV1 positive protein with 52kD and NADH: ubiquinone oxidoreductase activity. This fraction can produce peroxide that is inhibited by nobiletin. We propose that nobiletin may act as a mild "uncoupler", which through activation of α-ketoglutarate dehydrogenase (α-KGDH)-

complex and acceleration of matrix substrate level phosphorylation maintains membrane potential at an abnormal level. This switch in mitochondrial metabolism could elevate succinate-driven oxygen consumption that may underlay in both pro- and anti-apoptotic effects of nobiletin. It is suggested that nobelitin can have a positive effect on the ischemic-reperfussive disorders of the brain.

NDUFV1 is one of the possible target of nobiletin's action, it represents one of the main subunits from seven NADH:ubiqinon oxidoreductase so called "core subunits" which catalyses NADH oxidation and electron transfer. Mutations occurred in "core subunits" was associated in many neurodegenerative disorders. This complex includes a receptor-sensitive NADH oxidation site that produces ROSs and can be the target of various flavonoids. Therefore, we investigated the influence of nobiletin on cellular energetic metabolism in two distinct yeast strains: Yeast foam and Candida utilis.

Here we show that nobiletin inhibits mitochondrial respiratory chain on whole cells in a similar fashion for Yeast foam and Candida utilis. Studies on isolated mitochondria show no effect of this compound on mitochondrial respiratory chain. Studies on unpermeabilized and permeabilized spheroplasts show no effect of this compound on mitochondrial respiratory chain. We show that the observed inhibition of mitochondrial respiratory chain requires cellular incubation and intracellular metabolism of nobiletin.

Key Words: Mitochondria, neurodegenerative diseases, mitochondrial energy metabolism, flavonoids, nobiletin.

მადლობა

წარმოდგენილი სადისერტაციო კვლევა შესრულებულია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის, ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტში. დისერტაციაზე მუშაობის პერიოდში თითოეული ინსტიტუტის თანამშრომელისაგან ვგრძნობდი ძალიან დიდ თანადგომას, ყურადღებას და პროფესიულ მხარდაჭერას, რისთვისაც უდიდესი მადლობა მინდა გადავუხადო მათ. ჩემს მიერ შესრულებული სადისერტაციო კვლევა ვერ შესრულდებოდა მათი თანადგომისა და მხარდაჭერის გარეშე.

განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემს ხელმძღვანელს ასოც. პროფ. ელენე ჟურავლიოვას. მადლობას ვუხდი მის მიერ გაწეული უდიდესი შრომისა და დაუღალავი სწავლებისათვის, საკუთარი ენერგიისა და გამოცდილების გაზიარებისათვის. ქნ. ელენემ შემძინა როგორც თეორიული, ასევე ლაბრატორიაში მუშაობის პრაქტიკული უნარ ჩვევები. ასევე, გასაკუთრებულ მადლობას ვუხდი ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტის დირექტორს, აკადემიკოს ბნ. დავით მიქელაძეს. ჩემი სადისერტაციო კვლევა მისი უშუალო მეთვალყურეობით და ხელმძღვანელობით განხორციელდა.

მინდა მადლობა გადავუხადო ჩემს ფრანგ ხელმძღვანელს, ბორდოს უნივერსიტეტის, ბიოქიმიისა და უჯრედული გენეტიკის ინსტიტუტის დოქტორ ქნ. ან დევინს, რომლის ხელმძღვანელობით შევასრულე დისერტაციაში წარმოდგენილი, საფუარის მოდელზე ჩატარებული ექსპერიმენტები.

მადლობას ვუხდი ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის ბიოქიმიის დეპარტამენტის თანამშრომლებს, რომლებიც მეხმარებოდნენ ხარის თავის ტვინიდან მიტოქონდრიების იზოლაციაში.

ასევე მადლობას ვუხდი შოთა რუსთაველის ეროვნულ სამეცნიერო ფონდს. ფონდისგან მიღებულმა დაფინანსებამ, დოქტორანტურის საგანმანათლებლო პროგრამების გრანტისა და ფუნდამენტური კვლევების გრანტის სახით, დიდად შეუწყო ხელი ჩემი კვლევის წარმატებით განხორციელებას. დიდი მადლობა ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტს სამეცნიერო კონფერენციაში მონაწილეობის მხარდაჭერისათვის.

სარჩევი

სარჩევი ---------- viii

სურათების და ცხრილების ჩამონათვალი ---------- xii

აბრევიატურების ჩამონათვალი ---------- xvi

შესავალი ---------- 1

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა---------- 4

თავი 1. მიტოქონდრია---------- 4

1.1. *მიტოქონდრიის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი* ---------- 4

1.1.1.მიტოქონდრიების აგებულება ---------- 4

1.1.2.მიტოქონდრიების ბიოენერგეტიკა და მისი რეგულაცია ---------- 6

1.1.3.ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვი ---------- 12

1.1.4.სუნთქვითი ჯაჭვის პირველი კომპლექსი, მისი სტუქტურა და მისი ზოგადი არქიტექტურა ---------- 16

1.2. ნერვული უჯრედების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურებები --- 18

1.2.1.ასტროციტის მეტაბოლური პროფილი ---------- 21

1.2.2.ასტროციტ-ნეირონის ლაქტატის შატლი ---------- 21

1.2.3.სუბსტრატული ფოსფორილირების თავისებურება ნერვულ ქსოვილში ---- 22

1.2.4.მიტოქონდრიის დისფუნქციები და მასთან ასოცირებული დაავადებები --- 23

1.2.5.პარკინსონის დაავადება ---------- 24

1.2.6.ალცჰაიმერი ---------- 29

1.2.7.ჰორმეზისი და ნეიროპროტექცია ---------- 33

თავი 2. საფუარი და მისი ბიოენერგეტიკა ---------- 40

2.1. საფუარის ზოგადი მიმოხილვა ---------- 40

2.2. საფუარის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი ---------- 41

2.2.1. პასტერის ეფექტი ---------- 41

2.2.3. კრაბტრის ეფექტი (Crabtree Effect) ---------- 42

2.2.4. კუსტერის ეფექტი (Custer Effect) ---------- 43

2.2.5. პირუვატიდან აცეტილ-CoA-მდე ---------- 43

2.2.6. ტრიკარბონის მჟავების გზა ---------- 44

2.2.7. ჟანგვითი ფოსფორილირება ---------- 45
2.2.8. რედოქს ბალანსი ---------- 47
2.2.9. ნივთიერებათა ფაკულტატური ან ობლიგატურ-ფერმენტული ანაერობული მეტაბოლიზმი ---------- 50
2.2.10. საფუარების ზრდის შესაძლებლობა ანაერობულ პირობებში ---------- 52
2.2.11. საფუარის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურებები ---------- 55
თავი 3. ფლავონოიდები ---------- 57
3.1. ფლავონოიდების ზოგადი დახასიათება ---------- 57
3.2. ნობილეტინი -ციტრუსის ფლავონოიდი ---------- 60
მასალა და მეთოდები ---------- 67
თავი 1. ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე ჩატარებული ექსპერიმენტული მეთოდები ---------- 67
1.1. ხარის თავის ტვინიდან მიტოქოდრიების მიღება ---------- 67
1.2. მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მომხმარების დადგენა ---------- 67
1.3. მიტოქონდრიების მიერ ატფ-ის პროდუქციის განსაზღვრა ---------- 68
1.4. α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას მიერ ატფ-ის სინთეზის განსაზღვრა ხდებოდა ---------- 69
1.5. სუქცინილ-CoA-ლიგაზის განსაზღვრა ---------- 69
1.6. α-კეტოგლუტარატ დეჰიდროგენაზის აქტივობის განსაზღვრა ---------- 69
1.7. მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის განსაზღვრა ---------- 70
1.8. მიტოქონდრიების მიერ წყალბადის ზეჟანგის გენერაციის განსაზღვრა-------70
1.9. მიტოქონდრიული ცილების სოლუბილიზაცია ---------- 71
1.10. სოლუბილიზირებული მიტოქონდრიის აფინური ქრომატოგრაფია---------- 71
1.11. ვესტერნ ბლოტის ანალიზი ---------- 72
1.12. ჰექსოკინაზის აქტივობის განსაზღვრა ---------- 73
1.13. სუქცინატდეჰიდროგენაზური აქტივობის განსაზღვრა ---------- 73
1.14. NADH-დეჰიდროგენაზული აქტივობის განსაზღვრა ---------- 74
1.15. ნობილეტინის ფხვნილის სისუფთავის ანალიზი ---------- 75
1.16. ნობილეტინის მეტაბოლიტების განსაზღვრა ---------- 75
1.17. ნობილეტინის დაჟანგულობის განსაზღვრა ---------- 76

1.18. სინჯებში ცილის საერთო რაოდენობის განსაზღვრა ---------- 76

1.19. შედეგების სტატისტიკური დამუშავება ---------- 76

თავი 2. საფუარის მოდელზე ჩატარებული ექსპერიმენტული მეთოდები ---------- 77

2.1. საფუარის ხაზები, კულტურის ზრდის მედიუმი და ზრდის პირობები ------- 77

2.2. მიტოქონდრიის იზოლირება საფუარის ინტაქტური უჯრედებიდან ---------- 77

2.3. საფუარის იზოლირებული მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარება --- 78

2.4. სფეროპლასტების გამოყოფა საფუარის უჯრედებიდან ---------- 78

2.5. საფუარის მიერ ჟანგბადის მოხმარების განსაზღვრა ---------- 80

2.6. ციტოქრომების რაოდენობრივი განსაზღვრა ---------- 81

2.7. ვესტერნ ბლოტინგი ---------- 82

მიღებული შედეგები ---------- 83

თავი 1. ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე მიღებული შედეგები ---------- 83

1.1. ნობილეტინის პრეპარატის სისუფთავის დადგენა ---------- 83

1.2. იზოლირებული მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარების გაზომვა ნობილეტინის თანაობისას ---------- 84

1.3. მიტოქონდრიების მიერ ატფ-ის პროდუქციის განსაზღვრა ---------- 86

1.4. ნობილეტინის მოქმედება α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზაზე ---------- 88

1.5. ნობილეტინის გავლენა ჰექსოკინაზის აქტივობაზე ---------- 91

1.6. ნობილეტინის გავლენა მიტოქონდრიების მიერ წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნაზე Ca2+ - ის თანაობისას ---------- 92

1.7. ზეჟანგის პროდუქციის და მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის ცვლილება ---------- 94

1.8. NADH:უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობა ---------- 96

1.9. აფინური ქრომატოგრაფია და ვესტერნ ბლოტინგი ---------- 97

თავი 2. საფუარის ორ სხვადასხვა შტამზე მიღებული შედეგები ---------- 100

2.1. ჟანგბადის მოხმარების გაზომვა საფუარის ინტაქტურ უჯრედებში --------- 101

2.2. საფუარიდან იზოლირებული მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარება ნობილეტინის თანაობისას ---------- 108

2.3. საფუარის უჯრედებიდან გამოყოფილ სფეროპლასტებზე ჩატარებული ექსპერიმენტები ---------- 111
2.4. საფუარის უჯრედებში ციტოქრომების რაოდენობის განსაზღვრა ---------- 115
2.5. Hap4 ცილის ვესტერნ ბლოტინგი ---------- 116
შედეგების განხილვა ---------- 118
დასკვნები ---------- 124
გამოყენებული ლიტერატურა ---------- 126

ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1. ფლავონოიდების კლასები და მათი წყაროები საკვებ პროდუქტებში ---- 58

სურათების ჩამონათვალი

სურათი 1: ეუკარიოტული უჯრედის მიტოქონდრია ---------- 4

სურათი 2: ეუკარიოტული უჯრედი, მასში არსებული მიტოქონდრია და სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსები ---------- 7

სურათი 3: მიტოქნდრიაში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესები ---------- 12

სურათი 4: ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვის მოდელი მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაში ---------- 14

სურათი 5: ნერვულ უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესები ---------- 19

სურათი 6: საფუარის ტრიკარბოქსილმჟავას ციკლი ---------- 44

სურათი 7: საფუარის ჟანგვითი ფოსფორილირება (აერობული სუნთქვა) და ლაქტატის ფერმენტაცია ---------- 46

სურათი 8: რედოქს ბალანსის სქემა Saccharomyces cerevisiae-ის საფუარის უჯრედებში---------- 49

სურათი 9: საფუარის ორ სხვადასხვა შტამში არსებული სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსები

(A) საფუარის შტამები რომელთაც გააჩნიათ ხითივე, სრულყოფილი სუნთქვითი ჯაჭვი (მაგ. Candida Utilis) ---------- 55

(B) საფუარის იმ შტამების სუნთქვითი ჯაჭვი (Saccharomyces cerevisiae), რომელთაც პირველი კომპლექსის ნაცვლად გააჩნიათ NADH:უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზა (Ndi1p) ---------- 55

სურათი 10: ნობილეტინის ქიმიური სტრუქტურა (2D და 3D) ---------- 61

სურათი 11: მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიული სტანდარტული სურათი, ნობილეტინის პრეპარატის ქრომატოგრამა ---------- 83
სურათი 12: თავის ტვინის მიტოქონდრიებში 10 μM ნობილეტინის ეფექტი ჟანგბადის მოხმარებაზე
(A) 10mM გლუტამატისა და 5 mM მალატის თანაობისას ---------- 85
(B) 5 mM სუქცინატის ---------- 85
სურათი 13: 10 μM ნობილეტინის ეფექტი ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებული მიტოქონდრიების ატფ-ის პროდუქციაზე
(A) 10 mM გლუტამატის, 5 mM მალატის ---------- 86
(B) 5 mM სუქცინატის თანაობისას ---------- 86
(C) ატფ-ის პროდუქციის დოზა ნობილეტინის დამოკიდებული ცვლილება- 87
სურათი 14: ნობილეტინის მოქმედება α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზაზე
(A) 10 μM ნობილეინის ეფექტი SCS-ზე ---------- 89
(B) α-KGDH-ის აქტივობაზე თავის ტვინის მიტოქონდრიებში ---------- 89
(C) α-KG დამოკიდებული ატფ-ის პროდუქცია ---------- 89
სურათი 15: 10 μM ნობილეტინის გავლენა ჰექსოკინაზის აქტივობაზე ---------- 91
სურათი 16: თავის ტვინის მიტოქონდრიებზე ნობილეტინის 10μM ეფექტი Ca-ით გამოწვეულ პეროქსიდების პროდუქციაზე
(A) სუნთქვითი ჯაჭვის პირველი კომპლექსის სუბსტრატების გლუტამატი + მალატისა ---------- 92
(B) მეორე კომპლექსის სუბსტრატის, სუქცინატის თანაობისას ---------- 93
სურათი 17: ნობილეტინთან ინკუბაციის ხანგრძლივობის გავლენა
(A) წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნაზე ---------- 94
(B) მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალი 10 μM ნობილეტინთან ინკუბაციის შემდგომ ---------- 95
სურათი 18: NADH: უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობა 10 μM ნობილეტინის 5 წთ და 10 წთ-იანი პრე-ინკუბაციის შემდეგ ---------- 96
სურათი 19: ცილების შემადგენლობა და ნობილეტინ დამაკავშირებელი ცილის NADH: უბიქინონ რედუქტაზული აქტივობა

(A) მიტოქონდრიული ცილის ფრაქცია, რომელიც გასუფთავებულია 3-ჰიდროქსინობილეტინით - სეფაროზის აფინურ სვეტზე და განსაზღვრული იყო SDS PAGE გელზე ---------- 98

(B) აფინურად გასუფთავებული ცილის NADH: უბიქინონ რედუქტაზული აქტივობის ცვლილება დროში როგორც ნობილეტინის თანაობისას ასევე მის გარეშე ---------- 98

სურათი 20: მიტოქონდრიული ნობილეტინ დამაკავშირებელი ცილის პეროქსიდების პროდუქცია ---------- 99

სურათი 21: ნობილეტინის გავლენა Yeast foam-ისა და Candida utilis-ის უჯრედულ სუნთქვაზე

(A) Yeast foam ---------- 102

(B) Candida utilis ---------- 102

სურათი 22: ნობილეტინის გავლენა საფუარის Yeast Foam-ისა და Candida Utilis-ის ჟანგბადის მოხმარებაზე ატფ-აზის ინჰიბიტორ TET-ისა და შეუღლების გამთიშავის CCCP-ის თანაობისას

(A) Yeast foam-ის მიერ ჟანგბადის მოხმარება შეუღლების გამთიშავის თანაობისას ---------- 102

(B) Yeast foam-ის არაფოსფორილირებადი სუნთქვის სიხშირე (TET) --------- 102

(C) Candida utilis-ის -ის მიერ ჟანგბადის მოხმარება შეუღლების გამთიშავის თანაობისას ---------- 103

(D) Candida Utilis-ის არაფოსფორილირებადი სუნთქვის სიხშირე (TET) ----- 103

სურათი 23: ინტაქტური უდრედების რაოდენობა (OD) 5 საათის განმავლობაში

(A) Yeast Foam-ის ინტაქტური უჯრედების რაოდენობა ---------- 104

(B) Candida Utilis-ის ინტაქტური უჯრედების რაოდენობა ---------- 104

სურათი 24: ნობილეტინის გავლენა საფუარის Candida Utilis-ისა და Yeast Foam-ის უჯრედების ჟანგბადის მოხმარებაზე და უჯრედების რაოდენობაზე 1 საათის განმავლობაში, გაზომილი ყოველ 10 წუთში

(A) Candida Utilis-ის უჯრედების კონტროლი ---------- 105

(B) Candida Utilis-ის უჯრედები 250μM ნობილეტინის თანაობისას ---------- 105

(C) Candida Utilis-ის უჯრედების რაოდენობა (OD) ---------- 106

(D) Yeast Foam-ის უჯრედების კონტროლი ---------- 106
(E) Yeast Foam-ის უჯრედები 250μM ნობილეტინის თანაობისას ---------- 106
(F) Yeast Foam-ის უჯრედების რაოდენობა (OD) ---------- 106
სურათი 25: პეროქსიდების პროდუქციის განსაზღვრა ანტიოქსიდანტ NAC-ის და 250 μM ნობილეტინის თანაობისას
(A) Candida Utilis ---------- 108
(B) YeastFoam ---------- 108
სურათი 26: საფუარის ორივე შტამიდან (Candida Utilis, Yeast Foam) იზოლირებული მიტოქონდრიების ჟანგბადის მოხმარება
(A და B) Candida Utilis-ის მიტოქონდრია ნობილეტინთან 5 და 10 წუთიანი ინკუბაციის პირობებში ---------- 109
(C და D) Yeast Foam-ის მიტოქონდრიების ნობილეტინთან 5 და 10 წუთიანი პრეინკუბაცია ---------- 109
(E) 5 წუთიანი ინკუბაცია პირველი კომპლექსის სხვა სუბსტრატებთან (პირუვატი 10mM + მალატი 5mM) ---------- 110
სურათი 27: Candida Utilis-ის ინტაქტური უჯრედებიდან გამოყოფილი სფეროპლასტები
(A) 250μM ნობილეტინის თანაობისას სფეროპლასტების სუნთქვითი აქტივობა სუნთქვითი ჯაჭვის სხავდასხვა სუბსტრატების დამატებით ---------- 112
(B) 250μM ნობილეტინის თანაობისას სფეროპლასტების სუნთქვითი აქტივობა სუნთქვითი ჯაჭვის IV კომპლექსის სუბსტრატით ---------- 113
(C) არაპერმეაბილიზებული სფეროპლასტების ჟანგბადის მოხმარება 250μM ნობილეტინთან 5 და 10 წუთიანი პრეინკუბაციის პირობებში----------113
სურათი 28: ციტოქრომების (C/B/AA3) განსაზღვრა ორივე საფუარის ხაზში -------- 115
სურათი 29: ნობილეტინის (250 μM) გავლენა HAP4 ცილის ექსპრესიაზე
(A) ვესტერნ ბლოტინგის ტიპიური სურათი ---------- 117
(B) Hap 4 ცილის კონცენტრაციის ცვლილება ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით---------- 117

აბრევიატურების ჩამონათვალი

AD - ალცაიმერის დაავადება

APP - ამილოიდის პრეკურსორი ცილა

Aβ - ბეტა ამილოიდი

cAMP - ციკლური ადენოზინ მონოფოსფატი

CoQ - კოენზიმ Q

COX - ციტოქრომ ოქსიდაზა (ციკლოოქსიგენაზა)

CREB - ციკლურ ამფ-ზე მოპასუხე ელემენტის დამაკავშირებელი ცილა

Cyt c - ციტოქრომ c

DNP - 2,4-დინიტროფენოლი (შეუღლების გამთიშავი (ანქაფლერი) ნაერთი)

GLUTs - გლუკოზას სპეციფიური ტრანსპორტერი

GPDH - გლიცეროლ-3-ფოსფატ დეჰიდროგენაზა

LBs - ლევის სხეულაკები

MCI (mild cognitive impairment) - სუსტი კოგნიტური გაუარესება

MPP+ - 1-მეთილ-4-ფენილპირიდინიუმის

MPTP - 1-მეთილ-4-ფენილ-1,2,5,6,-ტეტრაჰიდროპირიდინი

mtDNA - მიტოქონდრიული დნმ-ი

NFT (intracellular neurofibrillary tangles) - შიდაუჯრედული ნეიროფიბლირალური გროვები

NOB - ნობილეტინი

OS - ოქსიდაციური სტრესი

OXPHOS - ჟანგვითი (ოქსიდაციური) ფოსფორილირება

PD - პდ - პარკინსონის დაავადება

PDHC - პირუვატ დეჰიდროგენაზული კომპლექსი

PI3K - ფოსფოინოზიტოლ 3 კინაზა

PKA - პროტეინ კინაზა A

PPP - პენტოზოფოსფატური გზა

ROS - ჟანგბადის აქტიური ფორმები

SCL - სუქცინილ-CoA-ლიგაზა

SNpc - სუბსტანცია ნიგრა პარა კომპაქტა

TCA ციკლი – სამნახშირბადიან მჟავათა (ლიმონჟავა) ციკლი

TIMP-1 - ქსოვილის ზრდის ინჰიბიტორი მეტალოპროტეინაზა-1

UCP - შეუღლების გამთიშავი (ანქაფლერი) ცილა

UPS - უბიქვიტინ-პროტეოსომულ სისტემა

VDAK - ვოლტაჟ დაჭიშკრული ანიონური არხი (voltage-depandent anion channel)

α-KGDHC - ალფა-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზული კომპლექსი

α-syn - ალფა-სინუკლეინი

შესავალი

თანამედროვე მედიცინის და ბიოლოგიის უმნიშვნელოვანეს პრობლემას წარმოადგენს დაავადებების პათფიზიოლოგიის ზუსტი მოლეკულური და ბიოქიმიური მექანიზმების დადგენა. ამ ამოცანის წარმატებით შესრულების შემთხვევაში იხსნება ახალი პერსპექტივები ფარმაკოთერაპიისათვის, რათა მოხდეს მრავალი დაავადების არა მხოლოდ სიმპტომატური, არამედ გამომწვევ მიზეზზე მიმართული მკურნალობა. ამ თვალთაზრისით, განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს უჯრედის მეტაბოლიზმის, მათ შორის ენერგეტიკული პროცესების ცვლილება პათოლოგიური პროცესების დროს. ამ მიზნით უკანასკნელ წლებში ინტენსიურად მიმდინარეობს მიტოქონდრიის ბიოენერგეტიკული პროცესების შესწავლა.

მიტოქონდრია წარმოადგენს უმნიშვნელოვანეს ორგანელას უჯრედში, რომელიც მონაწილეობას ღებულობს ენერგეტიკულ პროცესებში. მიტოქონდრიის გამართული და სწორი მუშაობა გადამწყვეტ როლს თამაშობს უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობაში. მიტოქონდრიულ დისფუნქციებთან ასოცირებულია მრავალი ტიპის სხვადასხვა დაავადება, რომლებიც დღესდღეობით დიდ ინტერესს იწვევს მთელი მსოფლიოს მასშტაბით.

რამდენადაც თავის ტვინი წარმოადგენს ენერგიის ყველაზე დიდ მომხმარებელს ადამიანის ორგანიზმში და ნეირონების განვითარება და ფუნქციონირება ძლიერ არის დამოკიდებული ატფ-ის პროდუქციაზე, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის უმნიშვნელო დარღვევასაც კი ძლიერი გავლენა აქვს თავის ტვინზე (Khatri and Man 2013). დაბალი გლიკოლიზური აქტივობის გამო ნეირონების ენერგიით უზრუნველყოფა უმთავრესად მიტოქონდრიების საშუალებით ხდება (Herrero-Mendez et al. 2009). მიტოქონდრიების ძირითად ფუნქციას სწორედ ატფ-ის სინთეზი წარმოადგენს, რაც ელექტრონების გადატანისა და ჟანგვითი ფოსფორილების შეუღლებით ხორციელდება. აქედან გამომდინარე, ვარაუდობენ, რომ მიტოქონდრიული დეფექტები წარმოადგენენ მექანიზმს, რომელიც საფუძვლად უდევს ქრონიკულ ნეირონულ დისფუნქციებს და აღნიშნული ჰიპოთეზის დამადასტურებელი მონაცემები დღითიდღე იზრდება (Khatri and Man 2013).

თავის ტვინის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი წარმოადგენს სამიზნეს, რომელსაც დიდი პოტენციალი გააჩნია ეფექტური მკურნალობის მეთოდების შემუშავებისათვის თავის ტვინის დაავადებების მკურნალობისა და ნორმალური კოგნიტური ფუნქციების გასაძლიერებლად. თუ გავითვალისწინებთ თანამედროვე მზარდ სამეცნიერო მონაცემებს ამ მიმართულებით, მიტოქონდრიულ რესპირატორულ ფუნქციებზე მიმართული მანიპულაციები, როგორც ჩანს, წარმოადგენს მომდევნო ლოგიკურ საფეხურს ნეიროდეგენერაციის წინააღმდეგ ეფექტური თერაპიული საშუალებების შემუშავებისათვის (Gonzalez-Lima, Barksdale, and Rojas 2014).

უახლესმა გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ ზოგიერთი სამკურნალო მცენარის გამოყენება მიტოქონდრიული დისფუნქციებით გამწვეული დაავადებების კომბინირებულ თერაპიაში მნიშვნელოვნად ზრდის მის ეფექტურობას, ამ მცენარეული წარმოშობის აგენტებს შორის განსაკუთებულ პოტენციალს ფლავონოიდების ჯგუფს მიაწერენ. ფლავონოიდები წარმოადგენენ მცენარეთა მეტაბოლიტების ჯგუფს, რომელშიც დღეისათვის აღმოჩენილი, 10 000-ზე მეტი ნაერთია გაერთიანებული, თუმცა მათგან მხოლოდ რამდენიმეა დეტალურად შესწავლილი (Pollastri and Tattini 2011). ფლავონოიდების ეფექტურობას მნიშვნელოვნად ზრდის მათი ლიპოფილურობა და ქსოვილებსა და უჯრედებში გაადვილებული შეღწევადობა.

ლაბორატორიული კვლევების, ეპიდემიოლოგიური გამოკვლევებისა და ადამიანებზე ჩატარებული კლინიკური ცდების შედაგად მიღებული მონაცემები მიუთითებენ, რომ ფლავონოიდები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ კიბოს ქიმიოპრევენციასა და ქიმიოთერაპიაზე. იდენტიფიცირებული იქნა ფლავონოიდების მოქმედების მრავალი მექანიზმი, მათ შორის კარცინოგენების ინაქტივაცია, პროლიფერაციის დათრგუნვა, უჯრედული ციკლის შეჩერება, აპოპტოზისა და დიფერენციაციის გამოწვევა, ანგიოგენეზის ინჰიბირება, ანტიოქსიდანტური მოქმედება და წამლების მულტირეზისტენტობის შეცვლა ან აღნიშნული მექანიზმების კომბინაციები (Ren et al. 2003).

უკანასკნელ წლებში ლიტერატურაში დაგროვდა მონაცემები ციტრუსის ფლავონოიდების ნეიროპროტექტორული, სიმსივნისსაწინააღმდეგო და

ანთებისსაწინააღმდეგო თვისებების შესახებ (WALLE 2007; Mazzio, Close, and Soliman 2011). ერთ-ერთი ყველაზე ფართოდ გავრცელებული ციტრუსის ფლავონოიდი არის ნობილეტინი (NOB) (R. W. Li et al. 2006; S. Li, Lo, and Ho 2006). არსებობს მრავალრიცხოვანი სამეცნიერო მონაცემები ნობილეტინის დადებითი ბიოლოგიური მოქმედებების შესახებ, იგი დადებით გავლენას ახდენს თავის ტვინის ფუნქციურ აქტივობაზე.

ნობილეტინის მოქმედების ასეთი ფართო სპექტრი საფუძველს გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ ეს ფლავონოიდი მოქმედებს უჯრედის მეტაბოლურ გზებზე. მიუხედავად ლიტერატურაში არსებული გარკვეული ექსპერიმენტული მონაცემებისა, ნობილეტინის მოქმედების ზუსტი მოლეკულური მექანიზმი მიტოქონდრიულ ბიოენერგეტიკაზე უცნობია.

ყოველივე ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, აქტუალური ხდება ნობილეტინის მოქმედების ზუსტი მოლეკულური მექანიზმის განსაზღვრა, რაც მისი, როგორც თერაპიული აგენტის გამოყენების პერსპექტივებს ხსნის.

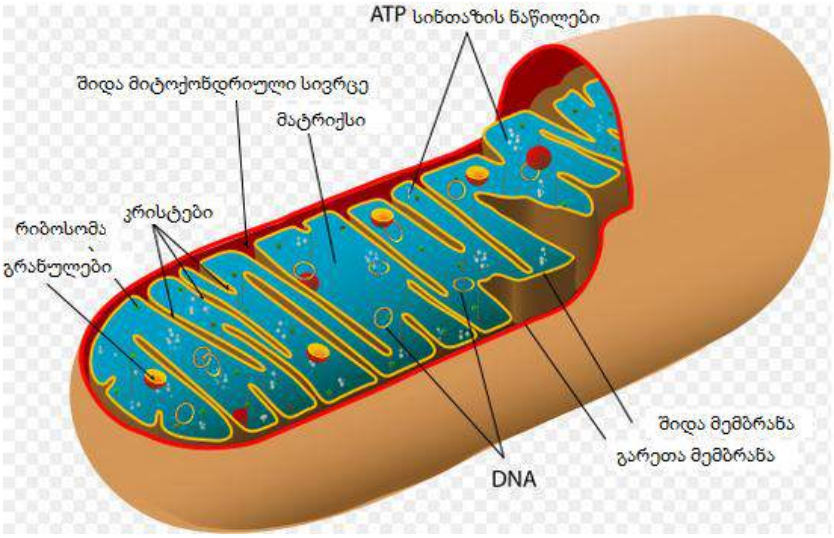
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. მიტოქონდრია

1.1. მიტოქონდრიის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი

1.1.1. მიტოქონდრიების აგებულება

მიტოქონდრია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ეუკარიოტული უჯრედის სიცოცხლის უნარიანობაში. ნათელია, რომ მიტოქონდრიის ბიოლოგია ეუკარიოტული უჯრედების ფუნქციონირების განუყოფელი ნაწილია, მათში ხდება ჟანგვითი ფოსფორილირების შედეგად გამოთავისუფლებული ენერგიის გარდაქმნა ატფ-ად, რის გამოც მათ ხშირად უჯრედის ძალსადგურებსაც უწოდებენ. ისინი შეიძლება იყოს სფერული ან მოგრძო ცილინდრული ფორმის, რაც დამოკიდებულია უჯრედის ტიპზე. ქსოვილის ტიპის მიხედვთ მერყეობს უჯრედში მიტოქონდრიების რაოდენობა და მათი აქტივობა. რაც უფრო აქტიურია ქსოვილი და საჭიროებს მეტ ენერგიას მიტოქონდრიების მით უფრო მეტი რაოდენობაა აღნიშნული ქსოვილის უჯრედებში.



სურათი 1. ეუკარიოტული უჯრედის მიტოქონდრია.

მიტოქონდრია შედგება გარეთა და შიდა, სტრუქტურულად და ფუნქციურად განსხვავებული მემბრანისაგან, რომელთა შორის მოთავსებულია ინტერმემბრანული სივრცე. გარეთა მემბრანა შედგება 30-40 % ცხიმის და 60- 70% ცილისაგან, რომელთაგან აღსანიშნავია ინტეგრალური ცილა ე.წ. პორინი ანუ VDAK (ვოლტაჟ დაჭიშკრული ანიონური არხი) რომელიც შედგება β შრეებისაგან და მემბრანაში წარმოქმნის არხებს 10kDa-მდე ნაწილაკების, იონების და მოლეკულებისათვის, რომლებიც თავისუფლად მოძრაობენ ტრანსმემბრანულ ჯაჭვში. მემბრანის გარეთა მხარეს ლოკალიზებული არიან მონოამინოქსიდაზა და კინურენინჰიდროქსილაზა, რომლებიც განაპირობებენ ნერვულ ქსოვილში ნეიროტრანსმიტერების დაშლას. ასევე მემბრანაში გვხვდება ნუკლეოზიდდიფოსფატკინაზა, ფოსფოლიპაზა A, აცილ-CoA სინთეტაზები, როტენონის მიმართ არამგრძნობიარე NADH ციტოქრომ-c რედუქტაზა.

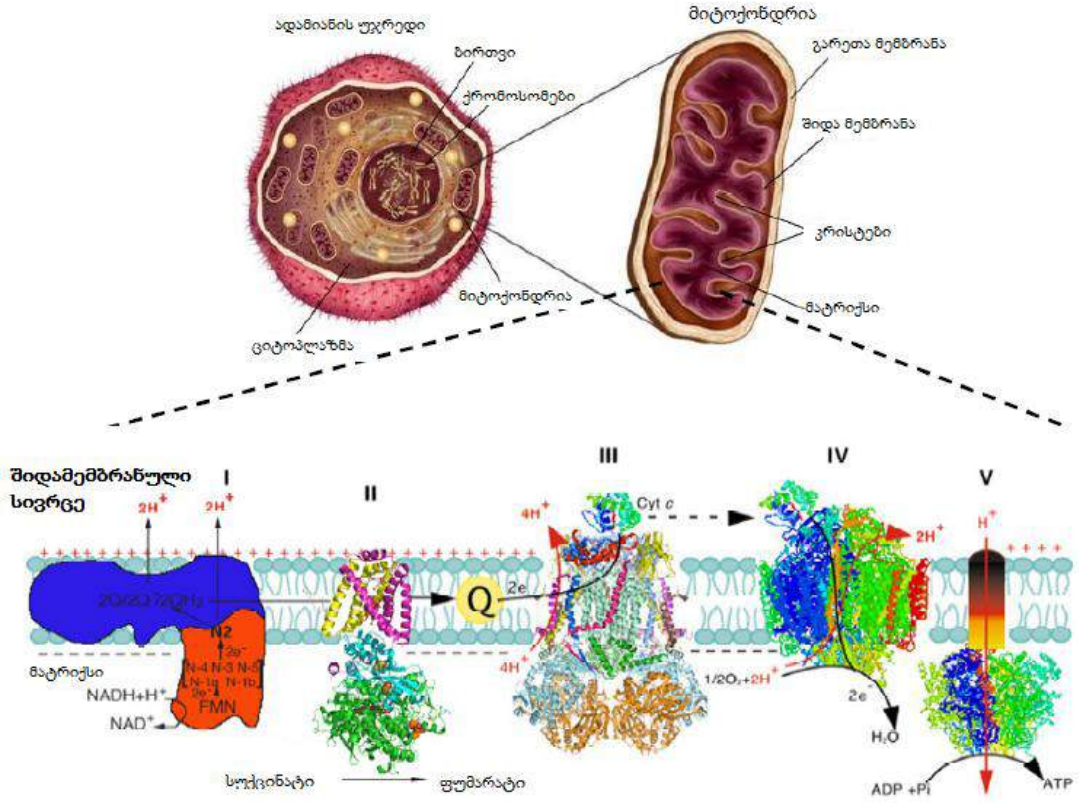
ინტერმემბრანულ სივრცეში მოთავსებულია ფერმენტები: ადენილატკინაზა, ნუკლეოზიდდიფოსფატკინაზა, კრეატინკინაზა. ჟანგვითი ფოსფორილირების დროს გამოთავისუფლებული ენერგია გამოიყენება პროტონების ტრანსმემბრანული გადატანისათვის შიდა მემბრანაში და ქმნის ელექტროქიმიურ გრადიენტს, რაც განაპირობებს ინტერმემბრანულ სივრცეში მჟავა და მატრიქსის სივრცეში შედარებით ტუტე გარემოს. ამავდროულად მემბრანის გარეთა ზედაპირი ხდება უფრო დადებითად დამუხტული და მატრიქსისაკენ მიმართული ზედაპირი უფრო უარყოფითად დამუხტული (Scheffler 1999).

შიდა მემბრანა შეიცავს 80% ცილას და მდიდარია უჯერი ცხიმოვანი მჟავებით. შიგნითა მემბრანა გაუმტარია ძალიან პატარა მოლეკულებისა და იონებისთვისაც კი, ცილების ჩათვლით. მხოლოდ განსაკუთრებული ტიპის იონები და ცილები გაივლიან შიგნითა მემბრანას ტრანსპორტერების საშუალებით. მასში ლოკალიზებულია ელექტრონების გადამტანი და ჟანგვითი ფოსფორილირების ფერმენტული კომპლექსები, სხვადასხვა სახის დეჰიდროგენაზები და სუბსტრატების, მეტაბოლური ინტერმედიატების და ადენინნუკლეოტიდების ციტოზოლსა და მატრიქსს შორის გადამტანი სატრანსპორტო სისტემები. კერძოდ კი: სუქცინატდეჰიდროგენაზა, F1, F0 ატფ-სინთაზა, NADH დეჰიდროგენაზა, β –ჰიდროქსიბუტირატდე-ჰიდროგენაზა, ციტოქრომებ b, c1, c, a, a3, კარნიტინ აცილ-

CoA ტრანსფერაზა. ადენინ-ნუკლეოტიდ ტრანსლოკაზა, მონო, დი და ტრიკარბოქსილატების ტრანსპორტერები, გლუტამატ-ასპარტატ ტრანსპორტერები და გლიცეროლ-3-ფოსფატდეჰიდროგენაზა. შიდა მემბრანაზე შეიმჩნევა ინვაგინაციები რომელთაც კრისტები ეწოდებათ, კრისტები განაპირობებენ ზედაპირის ფართობის გაზრდას. შიდა მემბრანის შიგნით მოთავსებულია მატრიქსი რომელიც შეიცავს: პირუვატდეჰიდროგენაზულ კომპლექსს, ციტრატსინთაზას, იზოციტრატდეჰიდროგენაზას, α -კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზულ კომპლექსს, აკონიტაზას, ფუმარაზას, სუქცინილ-CoA სინთეტაზას, მალატდეჰიდროგენაზას, ცხიმოვანი მჟავების β-ოქსიდაციის სისტემას, გლუტამატდეჰიდროგენაზას, გლუტამატ-ოქსალოაცეტატტრანსამინაზას, ორნითინ-ტრანსკარბამოილაზას, კარბამოილფოსფატსინთეტაზა 1-ს და ჰემის სინთეზის ფერმენტებს. მატრიქსში ასევე ლოკალიზებულია მიტოქონდრიული დნმ, რიბოსომები და მ-დნმ ტრანსკრიფციის და მ-რნმ ტრანსლაციისათვის საჭირო ფერმენტები.

1.1.2. მიტოქონდრიების ბიოენერგეტიკა და მისი რეგულაცია

მიტოქონდრია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ეუკარიოტული უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობაში. ნათელია, რომ მიტოქონდრიის ბიოლოგია ეუკარიოტული უჯრედების ფუნქციონირების განუყოფელი ნაწილია. უკანასკნელ წლებში დიდ ინტერესს იწვევს მიტოქონდრიის როლი უჯრედის სიცოცხლიუნარიანობის განსაზღვრაში და გარკვეული პათოლოგიების (მათ შორის გულსისხლძარღვთა დაავადებების, ნეიროდეგენერაციული დაავადებების და ავთვისებიანი სიმსივნეების) განვითარებაში (Cassis et al. 2010; de Cavanagh et al. 2009; Dikalova et al. 2010). მიტოქონდრიის ძირითად ფუნქციას ატფ-ის სინთეზი წარმოადგენს, რომელიც ჟანგვითი ფოსფორილების შედეგად წარმოიქმნება. უზრუნველყოფენ რა უჯრედისათვის საჭირო ენერგიის გენერაციას, მიტოქონდრიები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ უჯრედში სიგნალის გადაცემასა და უჯრედის გადარჩენაში.



სურათი 2. ეუკარიოტული უჯრედი, მასში არსებული მიტოქონდრია და სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსები.

მიტოქონდრიაში მიმდინარე აერობული პროცესებიდან აღსანიშნავია კრებსის ციკლი, იგივე ლიმონმჟავას ციკლი. კრებსის ციკლი წარმოადგენს ქიმიური რეაქციების სერიას, რომელიც მიმდინარეობს აერობულ ორგანიზმებში, რომლის შედეგად წარმოიქმნება ენერგია აცეტატის ოქსიდაციით და გამოიყოფა ნახშირორჟანგი. ლიმონმჟავას ციკლი, გლიკოლიზისაგან განსხვავებით, დახურულ ციკლს წარმოადგენს. იგი პირველად 1937 წელს იყო აღწერილი კრებსის მიერ და ამიტომ მას ხშირად კრებსის ციკლსაც უწოდებენ. მისი რეაქციები მიტოქონდრიების შიდა მემბრანებზე მიმდინარეობენ და მათი მსვლელობა 8 სტადიაში ხდება. I სტადიას წარმოადგენს აცეტილ-CoA-ს კონდენსაცია (დაკავშირება) ოქსალოაცეტატთან (მჟაუნძმარმჟავასთან), რომელსაც ფერმენტი ციტრატსინთაზა აკატალიზირებს, იგი რთულ ალოსტერულ ფერმენტს წარმოადგენს, რეგულირდება სხვადასხვა მეტაბოლიტებით და კონტროლს უწევს მთელი კრებსის ციკლის მიმდინარეობას (ასეთი ტიპის ფერმენტებს მალიმიტირებელი ფერმენტები ეწოდებათ). II სტადიას შეადგენს იზომერიზაციის რეაქცია, რომელსაც წარმართავს

ფერმენტი აკონიტაზა, და რომლის დროსაც ლიმონის მჟავა (ციტრატი) გარდაიქმნება იზო-ლიმონის მჟავად (იზოციტრატად). III სტადიაზე ხდება წარმოქმნილი იზოციტრატის დეჰიდრირება და მიიღება α-კეტოგლუტარის მჟავა. ამ რეაქციას ატარებს ფერმენტი - იზოციტრატდეჰიდროგენაზა. IV სტადიაზე α-კეტოგლუტარატის ჟანგვითი დეკარბოქსილირება მიმდინარეობს, რომელსაც α-კეტოგლუტარატდეჰოდროგენაზული კომპლექსი აწარმოებს. ამ დროს წარმოიქმნება ქარვის მჟავა (სუქცინატი), რომლის კარბოქსილის ჯგუფი CoA-თი არის აქტივირებული. ეს რეაქცია ჰგავს ზემოთ აღწერილ პირუვატდეჰიდროგენაზულ რეაქციას, რომლის დროსაც წარმოიქმნებოდა აცეტილ-CoA. α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზა ასევე სამი ფერმენტისაგან შედგება, რომლებიც შესაბამის კოფერმენტებთან ერთად მონაწილეობენ რეაქციაში. რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი სუქცინილ-CoA, აცეტილ-CoA-ს მსგავსად მაღალენერგეტიკულ ნაერთს წარმოადგენს. V სტადია წარმოდგენილია სუქცინილ-CoA-სინთეტაზური რეაქციით, რომლის დროსაც სუქცინილ-CoA-ს ენერგია გადადის ნუკლეოზიდტრიფოსფატის, კერძოდ GTP-ს ფოსფოდიეთერულ ბმაში. ამ დროს ხდება GDP-ს აღდგენა GTP-მდე. რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი GTP-ს ბოლოკიდურა ფოსფატი გადაისროლება ADP-ზე ფერმენტ ნუკლეოზიდდიფოსფატკინაზას მეშვეობით: GTP + ADP → GDP + ATP და საბოლოოდ ატფ მიიღება. VI სტადიაზე სუქცინატის დეჰიდრირება წარმოებს, რომლის შედეგადაც წარმოიქმნება ფუმარის მჟავა (ფუმარატი). ამ რეაქციას ფერმენტი სუქცინატდეჰიდროგენაზა ასრულებს. მის პროსტეტულ ჯგუფს FAD-ი წარმოადგენს, რომელიც რეაქციის მსვლელობისას იკავშირებს ორ წყალბადის ატომს და აღდგება $FADH_2$-მდე. FAD-ის გარდა სუქცინატდეჰიდროგენაზა შეიცავს რკინის ატომებს, რომლებიც რეაქციის შედეგად ვალენტობას იცვლიან, Fe (II) გადადის Fe (III)-ში.

VII სტადიაზე წარმოებს ფუმარატის ჰიდრატირება და წარმოიქმნება ვაშლის მჟავა (მალატი). რეაქციას ფერმენტი ფუმარატჰიდრატაზა აკატალიზირებს. VIII, ციკლის უკანასკნელ სტადიაზე ვაშლის მჟავიდან წარმოიქმნება მჟაუნძმარმჟავა (ოქსალოაცეტატი), რომელსაც ფერმენტი მალატდეჰიდროგენაზა ატარებს. ამ დროს ხდება NAD+-ის აღდგენა NADH-მდე. ამ რეაქციით მთავრდება ლიმონმჟავას ციკლის ერთი წრე. ამრიგად, ლიმონმჟავას ციკლში თავდაპირველად შედის

ორნახშირბადიანი ნაერთი - აცეტატი, რომელიც გააქტივებულია CoA-თი. ძმარმჟავას ნაშთი უკავშირდება მჟაუნძმარმჟავას ლიმონის მჟავის წარმოქმნით. ციკლის მსვლელობისას ორივე ნახშირბადი თავისუფლდება ორი მოლეკულა ნახშიროორჟანგის სახით და ციკლის ბოლოში ოქსალოაცეტატი რეგენერირებულია.

ციკლში მონაწილეობას იღებს 4 დეჰიდროგენაზა, რომელთა რეაქციების შედეგად ხდება 4 წყვილი წყალბადის ატომის ჩამოცილება მეტაბოლიტებიდან. აქედან სამი წყვილი ხმარდება NAD^+-ის აღდგენას NADH-მდე, ხოლო ერთი - FAD-ის აღდგენას $FADH_2$-მდე. 4 წყვილი ელექტრონებისა, რომლებიც პროტონის კოფერმენტებთან მიერთების შემდეგ რჩებიან, გადაეცემიან ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვს. ამ ჯაჭვის საშუალებით, ისინი აღადგენენ ჟანგბადის მოლეკულას (O_2) ორ მოლეკულა წყლამდე. ციკლის პროცესში წარმოებს ერთი მოლეკულა მაკროერგული ნივთიერების (GTP) სინთეზი.

ლიმონმჟავას ციკლის (სუნთქვის ჯაჭვთან ერთად) საბოლოო განტოლება შესაძლებელია შემდეგნაირად გამოისახოს:

$CH_3\text{-}COOH + 3O_2$ ---------- $2CO_2 + 2H_2O$

მიტოქონდრია შეიცავს ნახევრად-ავტონომიურ გენომს, რომელსაც მიტოქონდრიული დნმ-ი ეწოდება (mtDNA), იგი აკოდირებს 13 სუბდომენს ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვის კომპლექსებისას, 2 rRNA-სა და 22 tRNA-ს. დანარჩენი ლიმონმჟავა ციკლისა და დაახლოებით 1500 სხვა მიტოქონდრიული ცილები კოდირდება ბირთვული დნმ-ით (Wallace and Fan 2009). აქედან გამომდინარე, მიტოქონდრიული დომენების აწყობა, მიტოქონდრიის მეტაბოლური სიხშირე და თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის დონე, რომლებიც ფიზიოლოგიურად წარმოიქმნებიან და წარმოადგენენ OXPHOS-ის პროდუქტებს კონტროლირდებიან ორმაგი გენეტიკური კონტროლით. იზრდება მტკიცებულებები, იმის შესახებ, რომ დაბერების პროცესებსა და დაბერებასთან ასოცირებულ ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებს თან სდევს მიტოქონდრიული დისფუნქციები.

ჟანგვითი (ოქსიდაციური) ფოსფორილირება წარმოადგენს აერობული ორგანიზმების ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმის კულმინაციას. ნახშირწყლების, ამინომჟავების და ცხიმოვანი მჟავების დაშლის პროდუქტები საბოლოოდ

სუნთქვით ჯაჭვში კატაბოლიზდებიან. ამ პროცესში ელექტრონები ორგანული სუბსტრატებიდან ჟანგბადზე გადაიტანებიან და გამოთავისუფლებული ენერგია გამოიყენება ატფ– ის სინთეზისათვის. ჟანგვითი ფოსფოლირილების დროს ხდება O_2-ის შებოჭვა H_2O – ში NADH და $FADH_2$ მოლეკულებიდან ელექტრონის გადაცემის ხარჯზე.

მიტოქონდრიას, მსგავსად გრამ-ნეგატიური ბაქტერიისა გააჩნია ორმაგი მემბრანა. როგორც უკვე ითქვა, გარეთა მიტოქონდრიული მემბრანა გამტარია მცირე მოლეკულებისათვის და იონებისათვის, რომლებიც თავისუფლად მოძრაობენ ტრანსმემბრანულ ჯაჭვში, შიგნითა მემბრანა კი გაუმტარია ძალიან პატარა მოლეკულებისა და იონებისთვისაც კი, ცილების ჩათვლით. მხოლოდ განსაკუთრებული ტიპის იონები და ცილები გაივლიან შიგნითა მემბრანას ტრანსპორტერების საშუალებით. შიგნითა მემბრანაში განარჩევენ სუნთქვითი ჯაჭვის და ატფ სინთაზას კომპონენტებს, ის გამოყოფს მიტოქონდრიულ მატრიქსს, რომელიც შეიცავს პირუვატდეჰიდროგენაზის კომპლექსს და ფერმენტებს, რომლებიც მონაწილეობენ ამინომჟავების და β-დაჟანგვის მექანიზმებში, ყველა იმ პროცესისგან, რომელიც ემსახურება გლიკოლიზს და მიმდინარეობს ციტოზოლში (სურ. 3).

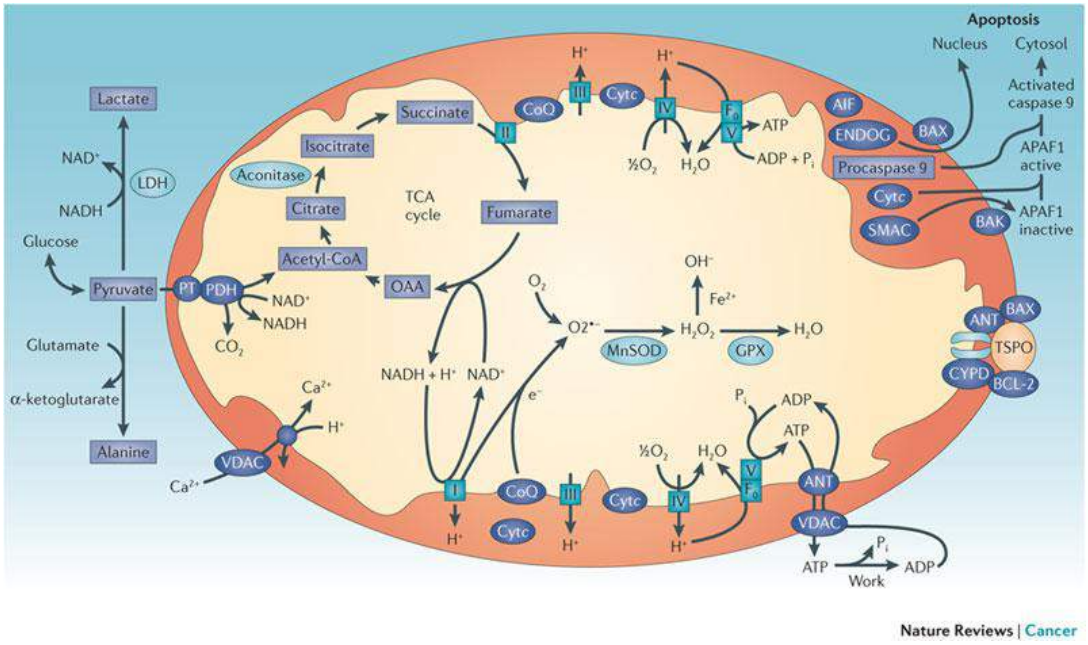
ჟანგვითი ფოსფორილირება იწყება ელექტრონების გადატანით სუნთქვით ჯაჭვში. ამ ელექტრონების უმრავლესობა კატაბოლურ პროცესებში ჩართული დეჰიდროგენაზული ფერმენტების აქტივობის შედეგად არის მიღებული და ელექტრონთა უნივერსალურ აქცეპტორებზე - ნიკოტინამიდ ნუკლეოტიდებზე (NAD და NADP) ან ფლავინნუკლეოტიდებზე (FMN და FAD) გადატანილია.

დაჟანგულ ფლავონუკლეოტიდს შეუძლია მიიღოს ერთი (FADH და FMNH) ან ორი ელექტრონი ($FADH_2$ და $FMNH_2$). ელექტრონების გადაცემის პროცესის მამოძრავებელ ძალას წარმოადგენს ის გარემოება, რომ ფლავონოპროტეინებს დაჟანგულ მდგომარეობაში აქვთ მაღალი პოტენციალი.

ნიკოტინამიდ ნუკლეოტიდებზე (NAD და NADP) ან ფლავინნუკლეოტიდებზე წყალბადის იონებისა და ელექტრონების გადატანას ადგილი აქვს ლიმონმჟავა ციკლის პროცესების მიმდინარეობისას (სურ. 3). ლიმონმჟავა ციკლის ერთი ბრუნვისას სპეციალური დეჰიდროგენაზებით ხდება ერთი წყვილი წყალბადის

ატომების ამოვარდნა სუბტრატებიდან: იზოციტრატიდან, ალფა-კეტოგლუტარის მჟავიდან, სუქცინატიდან და მალატიდან. წყალბადის ატომები ელექტრონებს გადასცემს ე.წ. ელექტრონთა გადაცემის ჯაჭვს, ხოლო დარჩენილი პროტონები (H+) შიდა მიტოქონდრიულ სივრცეში უერთდება ჟანგბადს, რომელიც აერობულ უჯრედებში ელექტრონების ძირითად მიმღებს – აქცეპტორს წარმოადგენს. ჟანგბადი, იკავშირებს რა პროტონებს, იერთებს ასევე ელექტრონებსაც, რის შედეგადაც საბოლოოდ წყლის მოლეკულა წარმოიქმნება.

ელექტრონებისა და წყალბადის პროტონების ტრანსპორტირება საკმაოდ რთულ, ჯაჭვურ პროცესს წარმოადგენს. ეს ჯაჭვი მთელი რიგი ცილოვანი ბუნების მოლეკულებისაგან შედგება, რომლებიც მიტოქონდრიის შიდა მემბრანასთანაა მჭიდროდ დაკავშირებული და წარმოქმნის ერთ მთლიან ანსამბლს, რომელსაც სუნთქვის ჯაჭვი ეწოდება. ამ ჯაჭვის ცილოვანი კომპონენტების მოლეკულაში არსებული პროსთეტული ჯგუფების საშუალებით ხორციელდება სუბსტრატიდან ჩამოცილებული წყალბადის ატომების (პროტონებისა და ელექტრონების) ჟანგბადზე გადატანის პროცესი. სუნთქვით ჯაჭვში ეს ცილები გარკვეული თანმიმდევრობით არის განლაგებულები, ყოველი მათგანი ელექტრონებს იღებს წინამორბედი ცილისაგან და გადასცემს მას მომდევნო ცილას. საწყის ეტაპზე ელექტრონების თავისუფალი ენერგია საკმაოდ დიდია, ხოლო ჯაჭვში მოძრაობისას ეს ენერგია თანდათანობით მცირდება, ვინაიდან ენერგიის მნიშვნელოვანი ნაწილი ხმარდება ატფ-ის სინთეზს. ყოველი ორი ელექტრონის ტრანსპორტირებისას სუნთქვით ჯაჭვში სინთეზირდება 3 მოლეკულა ატფ.



სურათი 3. მიტოქნდრიაში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესები.

ამგვარად, მიტოქონდრია წარმოადგენს რთულ ბიოქიმიურ მანქანას, რომელიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ეუკარიოტული უჯრედის ბიოლოგიაში. როგორც აღმოჩნდა, მისი ბიოენერგეტიკა (სუნთქვის ჯაჭვში ელექტრონთა გადატანის ინტენსივობა, ატფ-ის სინთეზის სიჩქარე და სხვა) იცვლება გარკვეული ფაქტორების (ჰორმონარული დისბალანსის, სტრესის, ტოქსიკანტების და ა.შ) ზემოქმედებით. ასე მაგალითად, ავთვისებიან უჯრედებში ადგილი აქვს ე.წ. "ვარბურგის ეფექტს" - აეროზული გლიკოლიზის ინტენსივობის მატებას შემცირებული ჟანგვითი ფოსფორილების ფონზე (Kondoh 2008).

1.1.3. ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვი

მიტოქონდრია, რომელსაც მეორენაირად „უჯრედის ძალოვან სადგურს" უწოდებენ, ჟანგვითი ფოსფორილირების გზით წარმოქმნის ეუკარიოტული უჯრედისათვის აუცილებელი ენერგიის 90%-ს (სურ. 2). ეს პროცესი მიმდინარეობს მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსების საშუალებით. ეს კომპლექსებია: I კომპლექსი (NADH-Q ოქსიდორედუქტაზა), II კომპლექსი (სუქცინატ-Q ოქსიდორედუქტაზა), III კომპლექსი (უბიქინოლ -Cyt c

ოქსიდორედუქტაზა), IV კომპლექსი (ციტოქრომ c ოქსიდაზა), V კომპლექსი (ატფ-სინთაზა) (სურ. 4). პირველი ოთხი კომპლექსი წარმოადგენს ელექტრონების გადატანის კომპლექსებს. ისინი თანმიმდევრულად აკატალიზებენ ელექტრონთა გადატანას NADH-დან ან სუქცინატიდან უბიქინონზე, შემდგომ უბიქინოლიდან ციტოქრომ *c*-ზე (cyt *c*) და საბოლოოდ ციტოქრომ *c*-დან - ჟანგბადის მოლეკულაზე.

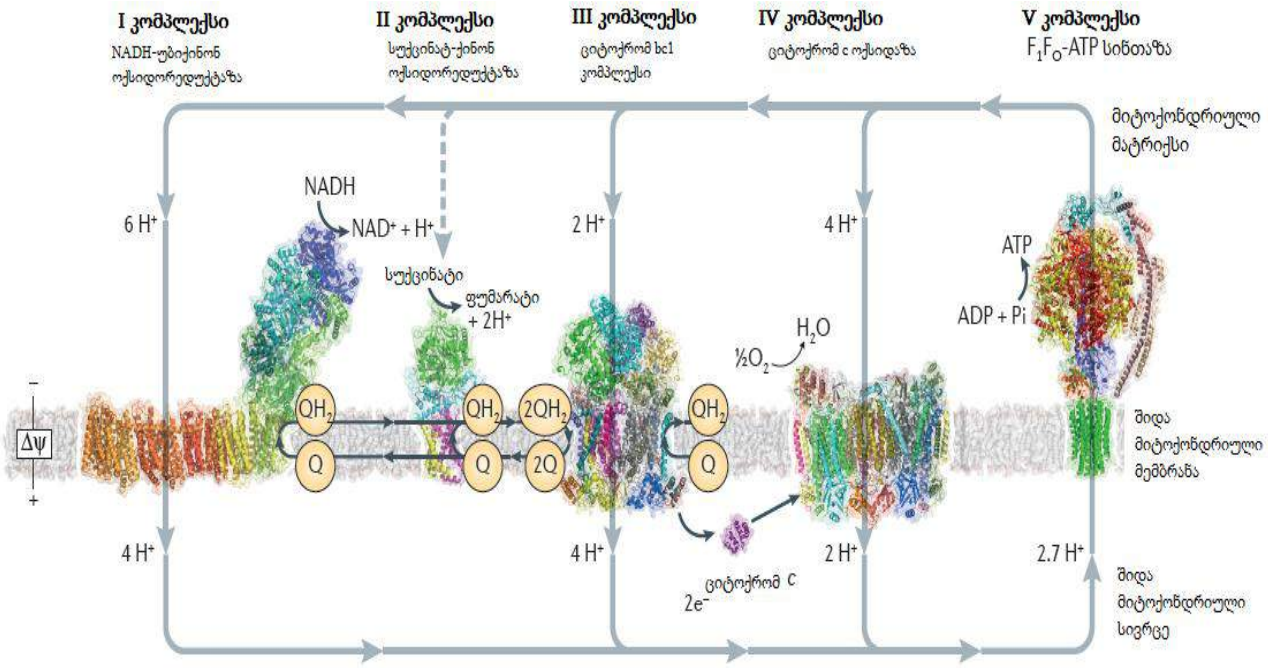
სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსები შეიცავენ მრავალ რედოქს კოფაქტორებს უშუალოდ კომპლექსის შიგნით ელექტრონთა გადატანის შესასრულებლად, მაშინ როდესაც კომპლექსებს შორის ელექტრონთა გადატანა ხდება მემბრანაში ჩაშენებული უბიქინონითა და ციტოქრომ c-თი. სუნთქვითი ჯაჭვის თითოეულ ეტაპზე გამონთავისუფლდება თავისუფალი ენერგია, რომელიც იწვევს ელექტრონთა დონორებისა და აქცეპტორების რედოქს პოტენციალის თანდათანობით გაზრდას. I კომპლექსი წარმოადგენს საწყის წერტილს ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვში სადაც NADH-დან მოსული დაბალი პოტენციის („მაღალი ენერგიის“) ელექტრონები იწყებენ შემოსვლას (საწყისი რედოქს პოტენციალით (Em) pH 7-ზე (Em,7) – 320 mV ტოლია), რომლებიც შემდგომში უბიქინონის (Em,7 = +100 mV) უბიქინოლამდე აღსადგენად გამოიყენება. შიდამემბრანულ სივრცეში უბიქინოლი საბოლოოდ III კომპლექსში ციტოქრომ c-ის აღსადგენად გამოიყენება (Em,7 = +260 mV), ხოლო IV კომპლექსში ციტოქრომ c აღდგება მოლეკულურ ჟანგბადამდე და წყლამდე, ეს უკანასკნელი წარმოადგენს ელექტრონების საბოლოო აქცეპტორს (Em,7 = +820 mV) (სურ. 4).

სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსების მიერ კატალიზებული რეაქციები შესაძლებელია გამოისახოს შემდეგნაირად:

I კომპლექსი: $NADH + H^+ + Q + 4H^+_{in} \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_{out}$

III კომპლექსი: $QH_2 + 2\ cyt\ c3^+ + 2H^+_{in} \rightarrow Q + 2\ cyt\ c2^+ + 4H^+_{out}$

IV კომპლექსი: $O_2 + 4\ cyt\ c2^+ + 8H^+_{in} \rightarrow 2\ H_2O + 4\ cyt\ c3^+ + 4H^+_{out}$ (სადაც Q აღნიშნავს უბიქინონს და QH_2 უბიქინოლს, cyt c აღნიშნავს ციტოქრომ c-ს, ‘in’ აღნიშნავს მიტოქონდრიულ მატრიქსს და ‘out’ შიდამემბრანულ სივრცეს).



სურათი 4. ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვის მოდელი მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაში.

საერთო ჯამში, თითოეული დაჟანგული NADH-ის მოლეკულა რთავს სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსებს, რომლის დროსაც მემბრანიდან ხდება 10 პროტონის ტრანსლოკაცია მიტოქონდრიის შიდამემბრანულ სივრცეში. II კომპლექსი უზრუნველყოფს 'დაბალენერგეტიკული' (~0 mV) ელექტრონების ჯაჭვში შესვლას (სუქცინატ-ქინონ ოქსიდორედუქტაზა), როგორებიცაა ელექტრონების გადატანა ფლავონპროტეინ-უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზიდან (ETF–QO), გლიცეროლ-3-ფოსფატ დეჰიდროგენაზიდან (GPDH) და დიჰიდროროტატ დეჰიდროგენაზიდან. ამ ცილებიდან არც ერთი არ გადატუმბავს პროტონებს, თითოელი უბიქინოლიდან წარმოშობილი ერთვება ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვის III კომპლექსში. სუქცინატიდან ფუმარატის წარმოქმნა ლიმონმჟავა ციკლში კონტროლირდება უბიქინოლ/უბიქინონის შეფარდებით, ამგვარად სუნთქვითი ჯაჭვის II კომპლექსი ერთგვარად არეგულირებს ლიმონმჟავა ციკლის ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს საფეხურს და ამით უზრუნველყოფს ლიმონმჟავა ციკლისა და ჟანგვითი ფოსფორილირების უკუკავშირის მექანიზმს (F. Sun et al. 2005). ასევე მეორე უკუკავშირის მექანიზმი, რომელიც უშუალოდ პროტონულ ძალას უკავშირდება შესაძლებელია უზრუნველყოფილი იყოს ნიკოტინამიდ ნუკლეოტიდის ტრანსჰიდროგენაზის საშუალებით, რომელიც აკატალიზებს წყალბადის გადატანას

NADPH დან $NADP^+$-ზე, გაწყვილებულია შიდა პროტონულ ტრანსლოკაციასთან (Jackson 2012). იმის გარდა, რომ ეს ფერმენტი უზრუნველყოფს აღდგენილ ექვივალენტებს ოქსიდაციური დაზიანების შესამცირებლად, იგი აგრეთვე არეგულირებს ლიმონმჟავა ციკლის აქტივობას NAD- და NADP-სთან დაკავშირებულ იზოციტრატ დეჰიდროგენაზას დონეზე (Comte et al. 2002; L.A. Sazanov and Jackson 1994).

ნანახია, რომ I კომპლექსი მემბრანულ დომენში არ შეიცვას რედოქს ცენტრებს, რაც მესამე და მეოთხე კომპლექსის შემთხვევაში პირიქითაა, ელექტრონთა გადაცემა და პროტონების ტრანსლოკაციის გზა სივრცულად დაშორებულია. აგრეთვე დისტალურად განლაგებულმა ანტიპორტერების მსგავსი დომენების არსებობამ საშუალება მისცა მკვლევარებს ევარაუდათ, რომ შესაძლებელია სუნთქვითი ჯაჭვის პირველმა კომპლექსმა იფუნქციონიროს კონფორმაციული ცვლილებების პირობებშიც კი (Baranova, Morgan, and Sazanov 2007; Holt, Morgan, and Sazanov 2003; L A Sazanov et al. 2000; Leonid A Sazanov and Walker 2000). სუნთვითი ჯაჭვის I, III და IV კომპლექსებში ელექტრონების ტრანსპორტთან ერთად ხდება პროტონების გადატანა მიტოქონდრიის მემბრანათა შორის სივრცეში, რისი საშუალებითაც წარმოიქმნება პროტონული გრადიენტი და მემბრანული პოტენციალი, რაც აუცილებელია ატფ-ის სინთეზისათვის V კომპლექსის საშუალებით.

ხუთივე კომპლექსი საკმაოდ კარგადაა შესწავლილი, აგრეთვე გამოყოფილია და გასუფთავებულია სუბმიტოქონდრიული ფრაქციები (Acín-Pérez et al. 2008). გამოყოფილი I კომპლექსი შეიცავს 45 ცილოვან სუბერთეულს 10 რედოქს-ცენტრით: 1 FMN და რკინა-გოგირდოვან 9 კლასტერს. II კომპლექსი შეიცავს 4 ცილოვან სუბერთეულს, 1 FAD-ს, 3 FeS კლასტერებს და 1 ჰემს b_{560}. III კომპლექსი შეიცავს 11 ცილოვან სუბერთეულს ორი b-ტიპის ჰემით (b_H და b_L) , ერთი c-ტიპის ჰემს *(c1),* და ერთი [2Fe2S] კლასტერით. IV კომპლექსი შეიცავს 12 ცილოვან სუბერთეულს a-ტიპის ჰემით (a და a_3) და სპილენძის შემცველ ორ ცენტრს (Cu_A და Cu_B). V კომპლექსი, ანუ იგივე ატფ-სინთაზა, შეიცავს 16 ცილოვან სუბერთეულს, მაგრამ მას არ გააჩნია არც ერთი რედოქს-ცენტრი.

1.1.4. სუნთქვითი ჯაჭვის პირველი კომპლექსი, მისი სტუქტურა და მისი ზოგადი არქიტექტურა

პირველი კომპლექსი წარმოადგენს ძალიან დიდ ფერმენტს, რომელიც აკატალიზებს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის პირველ საფეხურს (Saraste 1999; Schultz and Chan 2001). ფერმენტი ჟანგავს NADH-ს და გადააქვს ელექტრონი უბიქინონზე (კოენზიმ Q, CoQ), ცხიმში ხსნად ელექტრონების გადამტანზე, რომელიც შიდა მიტოქონდრიული მემბრანის ლიპიდურ ბიშრეშია მოთავსებული. ხარში არსებული პირველი კომპლექსის სრული დომენების რიცხვია 46 (Carroll et al. 2003). შვიდი დომენი მიტოქონრიული გენომით კოდირდება (Attardi et al. 1986; Chomyn et al. 1986), რომელიც პიდროფობული კომპონენტებითაა ცნობილი ND1–ND6 და ND4L. დომენები ერთნაირადაა გადანაწილებული მიტოქონდრიის პერიფერიულ და მემბრანულ მხარში, რომლებიც ერთნაწილაკიანი ელექტრონული მიკროსკოპის სურათში ერთობლივად ქმნიან L-ფორმის მოლეკულას (Morgan and Sazanov 2008; Grigorieff 1998; Guénebaut et al. 1998; Yip et al. 2011). მინიმალური ვარიანტი, რომელიც აუცილებელია მიტოქონდრიის გამართული და სწორი მუშაობისათვის ნანახია ბაქტერიაში, რომელიც შედგება 14 მნიშვნელოვანი დომენებისაგან და საკუთარი მიტოქონდრიული დომენების ჰომოლოგებს წარმოადგენენ, დანარჩენი სხა დომენები იწოდებიან როგორც „დამატებითი დომენები“ და მათი როლი მიტოქონდრიულ I კომპლექსში უცნობია (Lenaz et al. 2006).

სტრუქტურული და ფილოგენეტიკური შესწავლის შედეგად გაირკვა, რომ პირველი კომპლექსი შეიცავს სამ განსხვავებულ სექტორს: დეჰიდროგენაზების დომენს, ჰიდროგენაზას მსგავს დომენს (იგი მოიცავს პერიფერულ მხარს რომელიც აგრეთვე გადასულია მატრიქსში) და ტრანსპორტერის დომენს, რომელიც ღრმად ჩაძირულია მემბრანაში (Friedrich and Scheide 2000; Mathiesen and Hägerhäll 2002). კომპლექსი მოიცავს რამოდენიმე პროსტეთულ ჯგუფს: FMN – იგი NADH-დან წამოსული ელექტრონების შესასვლელი წერტილია, რომლებიც შემდგომში გადადიან რკინა-გოგირდოვან კლასტერებზე (Ohnishi et al. 1998).

პერიფერიული მხარი მოიცავს NADH-დამჟანგველ დეჰიდროგენაზის მოდულს (N-მოდული), რომელიც უზრუნველყოფს ელექტრონების ჯაჭვში შეყვანას Fe–S კლასტერით, დამაკავშირებელი Q-მოდული კი ახდენს ელექტრონების გადაცემას ქინონ-დამაკავშირებელ საიტზე. მემბრანაში არსებული მხარი (რომელიც აგრეთვე ცნობილია როგორც მემბრანული დომენი) მოიცავს პროტონების ტრანსლოკაციის P-მოდულს NuoH დომენს. NuoH დომენი არ არის დაკავშირებული რომელიმე სხვა ცნობილ ცილებთან, შესაბამისად ევოლუციურად არ მიეკუთვნება არც ერთ სხვა მოდულს, იგი ძირითადად აფორმირებს პერიფერიული მხრის შიდა ზედაპირს. სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის ორი მხარი ფუნქციურად და ევოლუციურად დამოუკიდებელია: პერიფერიული მხარი აკატალიზებს ჟანგვა-აღდგენით რეაქციებს, მაშინ როდესაც მემბრანული მხარი აკატალიზებს პროტონების ტრანსპორტს.

სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი ინჰიბირდება 60-ზე მეტი სხვადასხვა წარმოშობის ნაერთებით (Degli Esposti 1998), დაწყებული როტენონიდან დამთავებული მთელი რიგი სინთეზური ინსექტიციდები/აკარიციდებით. ეს ინჰიბიტორები მათი მოქმედების ეფექტის მიხედვით იყოფა სამ დიდ ჯგუფად: I/A კლასი (პიერიციდინ A-ს პროტოტიპები, მისი მსგავსი ნაერთები), II/B კლასი (როტენონის პროტოტიპები) და C კლასი (კაპსაიცინის პროტოტიპები). მიუხედავად ამისა, კინეტიკური შესწავლებით ვერ დადგინდა ამ სამი ჯგუფის იჰიბიტორების ზუსტი დამაკავშირებელი საიტები/დომენები სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსში: ფართოდ ცნობილია, რომ ისინი პირველ კომპლექსში იზიარებენ საერთო დამაკავშირებელ დიდ ჰიდროფობულ „ჯიბეს“ (Okun, Lümmen, and Brandt 1999).

სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი ასევე ჩართულია ტრანსმემბრანული პროტონული გრადიენტის ფორმირებაში სტიქიომეტრიით - 4 H+/2e–. ამის გარდა, საკმაოდ ფართოდ ცნობილია მისი რედოქს როლი ელექტრონების გადატანაში, პირველი კომპლექსი აგრეთვე წარმოადგენს თავისუფალი რადიკალების (ROS)-ების ძირითად წყაროს.

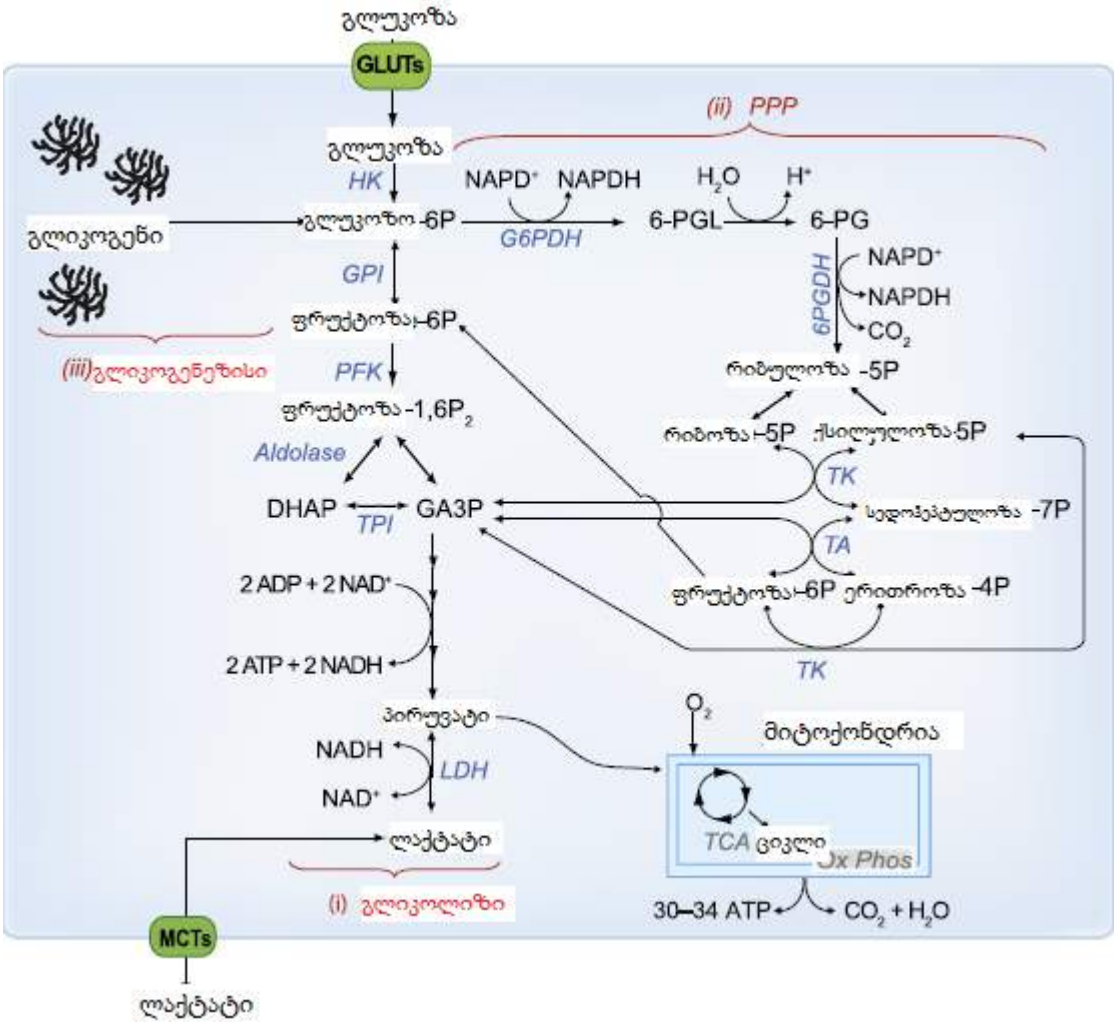
პროტონების და ელექტრონების გადატანასთან შეუღლებული ატფ-ის სინთეზის ეს მექანიზმი ზრდის კატაბოლიზმის ენერგეტიკულ ეფექტურობას, რაც მნიშვნელოვანია უჯრედისათვის განსაკუთრებით კი ენერგიის მაღალი მოხმარების პირობებში. ასეთი ტიპის უჯრედებს ძუძუმწოვრების ორგანიზმში ნერვული უჯრედები მიეკუთვნება.

1.2. ნერვული უჯრედების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურებები

ნერვული სისტემა უზრუნველყოფს კომუნიკაციის ქსელის წარმოქმნას შეგრძნებებს, გარემოსა და სხეულის ყველა ნაწილს შორის. თავის ტვინი განმკარგველ ცენტრს წარმოადგენს ორგანიზმში. იგი მუდმივად ფუნქციონირებს და საჭიროებს დიდი რაოდენობით ენერგიას, რომ შეინარჩუნოს ფუნქციური მდგომარეობა. ტვინის ღეროვან უჯრედებს შეუძლიათ წარმოქმნან უჯრედების 3 ტიპი: ნეირონები; ასტროციტები და ოლიგოდენდროციტები. ზრდასრული ორგანიზმის წონის დაახლოებით 2,4%-ს წარმოადგენს ნერვული ქსოვილი, რომლის 83%-ს შეადგენს თავის ტვინი. ადამიანის თავის ტვინი ენერგიის მისაღებად ყოველდღიურად იყენებს დაახლოებით 120 გრ. გლუკოზას. თავის ტვინის ფუნქციებისათვის იხარჯება მთლიანი ორგანიზმის მიერ მოხმარებული ჟანგბადის 20% და გლუკოზის 25%, მაშინ როცა ის წარმოადგენს მთლიანი სხეულის მხოლოდ 2%. თავის ტვინი ენერგიას გლუკოზის მეტაბოლიზმის გზით იღებს, თუმცა შიმშილის დროს კეტოსხეულებს შეუძლიათ ჰემატოენცეფალური ბარიერის გადალახვა და თავის ტვინის ქსოვილის მიერ მეტაბოლიზება, მაგრამ ისინი ვერ ჩაანაცვლებენ გლუკოზის საჭიროებას. ასევე თავის ტვინის ბიოენერგეტიკაში არსებობს ენერგიის მოპოვების ალტერნატიული გზა, რომელიც ჩაირთვება ინტენსიური ფიზიკური დატვირთვის დროს და მდგომარეობს ლაქტატის კატაბოლიზმში.

თავის ტვინის ენერგიის ძირითადი წყარო - გლუკოზა აღწევს უჯრედებში გლუკოზას სპეციფიური ტრანსპორტერის საშუალებით (GLUTs) და ფოსფორილირდება ჰექსოკინაზას საშუალებით გლუკოზო-6-ფოსფატის წარმოქმნით.

სხვა ორგანოებში გლუკოზო-6-ფოსფატი მოიხმარება სხვადასხვა მეტაბოლური გზებისთვის, უმთავრეს გზას წარმოადგენს: (1) გლიკოლიზი - საბოლოო პროდუქტია ლაქტატი, რომელიც შემდგომ ირთვება მიტოქონდრიულ მეტაბოლიზმში, (2) პენტოზოფოსფატური გზა (PPP), და (3) გლიკოგენეზი (მხოლოდ ასტროციტებში) (სურ. 5). ჟანგვითი ფოსფორილების მაღალი ინტენსივობის შედეგად გლუკოზა თავის ტვინში სრულად იჟანგება CO_2-მდე და წყლამდე (Clarke and Sokoloff 1999).



სურათი 5. ნერვულ უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესები.

ნეირონის მთავარი ფუნქციიდან (პოსტსინაპსურ მემბრანაზე პოტენციალის აღმოცენება და გავრცელება) გამომდინარე აუცილებელია, რომ ამ უჯრედმა მუდმივად შეინარჩუნოს და განაახლოს იონური გრადიენტი, ასევე უზრუნველყოს ნეიროტრანსმიტერების დაბრუნება პრესინაპსში და მათი ცირკულაცია, რაც საჭიროებს დიდი რაოდენობით ენერგიის ხარჯვას (Attwell and Laughlin 2001; Alle,

Roth, and Geiger 2009). მოსვენების სინაფსური პოტენციალი მოითხოვს გაცილებით მეტი ენერგიის ხარჯვას, ვიდრე მოქმედების პოტენციალი (Alle, Roth, and Geiger 2009). ამაგზნებელი სინაფსები ძირითადად გვხვდება თავის ტვინის რუხ ნივთიერებაში, გლუტამატერგული სინაფსები ძირითადი კორტიკალური სინაფსების 80% წარმოადგენს. მიჩნეულია, რომ ამაგზნებელი ნეიროგადაცემა გაცილებით უფრო მეტ ენერგიას მოითხოვს კორტიკალურ დონეზე. ნანახია, რომ გლუტამატით გაშუალებული ნეიროგადაცემის ენერგიის მოხმარების წილი რუხ ზონაში დაახლოებით 80%-ს შეადგენს (Sibson et al. 1998; Hyder et al. 2006; Shulman et al. 2004; Attwell and Laughlin 2001). გარკვეულ პირობებში ნეირონებს შეუძლიათ ეფექტურად გამოიყენონ ლაქტატი, როგორც ენერგიის წყარო. ფერმენტი 6-ფოსფოფრუქტოზა-2-კინაზა/ფრუქტოზა-2,6-ბიფოსფატაზა-3 (Pfkfb3) ნეირონებში არ გვხვდება, რაც განპირობებულია მისი პროტეოლიზური დეგრადაციით, აღნიშნული ფერმენტი კი ასტროციტებში ჭარბადაა წამოდგენილი. ეს ფერმენტი პასუხისმგებელია ფრუქტოზა-2,6-P2-ის წარმოქმნაზე, პოტენციურ გლიკოლიზის ფერმენტ ფოსფოფრუქტოკინაზა-1-ის (PFK) აქტივაციაზე. ნეირონებში ფრუქტოზა-2,6-P2-ის სუსტი სინთეზის გამო, ასტროციტებისაგან განსხვავებით, შედარებით დაბალია გლიკოლიზური აქტივობა, და არ ხდება მისი აფრეგულაცია NO-ით გამოწვეული უჯრედული სტრესის საპასუხოდ. ამასთანავე აღსანიშნავია, რომ ნეირონული გლიკოლიზის გააქტივება Pfkfb3-ის საშუალებით იწვევს ოქსიდაციურ სტრესს და აპოპტოზს. გლუკოზის მომატებული დონე აძლიერებს მეტაბოლიზმს PPP (პენტოზო ფოსფატური) გზით - რომელიც მნიშვნელოვანია NADPH-ის პროდუქციისთვის და უჯრედული ანტიოქსიდანტური პოტენციალის შენარჩუნებისთვის. ნანახია, რომ PPP და გლიკოლიზის ბალანსის ერთმანეთთან კორელაცია აუცილებელია ნეირონის ნორმალური ფუნქციონირებისათვის და ანტიოქსიდანტური პოტენციალის შესანარჩუნებლად, ეს ორივე პროცესი მნიშვნელოვანია უჯრედის გადარჩენისათვის. საწვავის სახით ლაქტატის გამოყენება მოსახერხებელია ნეირონისთვის, რადგანაც ენერგეტიკულად უფრო მომგებიანია, ვიდრე გლიკოლიზი და ამავდროულად გლუკოზის მარაგი იზოგება PPP-სთვის.

1.2.1. ასტროციტის მეტაბოლური პროფილი

ნეირონებთან შედარებით ასტროციტებს ახასიათებთ მაღალი გლიკოლიზური აქტივობა, რაც იწვევს დიდი რაოდენობით ლაქტატის გამონთავისუფლებას უჯრედგარე სივრცეში. მიტოქონდრიულ დონეზე ამ უჯრედებს ახასიათებთ ასპარტატ/გლუტამატის გადამტანების, ასევე მალატ/ასპარტატის მაქოსებური მექანიზმის (შატლის) კომპონენტების ექსპრესიის დაბალი დონე. აღნიშნული მოლეკულები ჩართულია NADH-ის გადატანაში ციტოზოლიდან მიტოქონდრიაში. გლიკოლიზის შედეგად მიღებული პირუვატის გადასვლა ლაქტატში, ციტოზოლში უზრუნველყოფს NAD+/NADH-ის დონის შენარჩუნებას, რომელიც აუცილებელია გლიკოლიზური აქტივობისათვის. მიღებული პირუვატის საბოლოო მეტაბოლიზმი მიმდინარეობს ნეირონების TCA ციკლში.

1.2.2. ასტროციტ-ნეირონის ლაქტატის შატლი

ასტროციტები ძირითადად მოიხმარენ თავის ტვინის ენერგეტიკულ პოტენციალის 5%-15%. ნეირონის აქტივაციის შედეგად იზრდება გლუტამატის კონცენტრაცია უჯრედგარე სივრცეში, რომლის მოცილება ხორციელდება Na+ დამოკიდებული მექანიზმით გლიური უჯრედების სპეციფიური ტრანსპორტერებით. ასევე ამ დროს გაზრდილია Na+/K+ ატფ-აზების აქტივობა, იზრდება ატფ მოხმარება, რის გამოც კომპენსატორულად იზრდება გლუკოზის შთანთქმა და გლიკოლიზი ასტროციტებში. შედეგად გამონთავისუფლდება დიდი რაოდენობით ლაქტატი უჯრედგარე სივრცეში, რომელსაც შემდგომ ნეირონი იყენებს ატფ- ის პროდუქციისათვის. ნეირონებისაგან განსხვავებით ასტროციტები ხასიათდებიან ანტიოქსიდანტური დაცვის მაღალი პოტენციალით. ნანახია, რომ ასტროციტები იცავენ მათ მეზობლად მყოფ ნერვულ უჯრედებს ოქსიდაციური სტრესისგან. გლუტათიონის (GSH) პრეკურსორების ტრანსპორტი ასტროციტებიდან ნეირონებში წარმოადგენს ნეიროპროტექციის ერთ-ერთ მექანიზმს. GSH მოქმედებს როგორც ROS-ის სკავენჯერი ან შესაძლებელია იყოს სუბსტრატი გლუტათიონ S-ტრანსფერაზისთვის ან გლუტათიონ პეროქსიდაზასთვის.

1.2.3. სუბსტრატული ფოსფორილირების თავისებურება ნერვულ ქსოვილში

ნერვული სისტემის მიტოქონდრიების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ზუსტი მექანიზმების შესწავლას უფრო მნიშვნელოვანს ხდის ის ფაქტი, რომ მრავალი ტიპის ნეიროდეგენერაციული დაავადება ასოცირებულია ენერგეტიკული პოტენციალის, მათ შორის სუნთქვითი ჯაჭვის პირველი კომპლექსის დისფუნქციასთან. ამ დაავადებებს შორის არის პარკინსონის და ალცჰეიმერის დაავადება. პირველი კომპლექსის შემადგენელი ნაწილი - ალფა-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზული კომპლექსი (α-KGDHC) წარმოადგენს რეაქტიული ჟანგბადის ფორმების (ROS) მიმართ ერთ-ერთ ყველაზე მგრძნობიარე ფერმენტს. მრავალი ექსპერიმენტის შედეგად დადგინდა, რომ KGDHC-ის ოქსიდაციური მოდიფიკაცია იწვევს ნეირონის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და როგორც შედეგი, კოგნიტური ფუნქციების გაუარესებას მრავალი ნეიროფსიქიატრული დაავადებების დროს (Gary E. Gibson et al. 2010). KGDHC-ის აქტივობის გაუარესება იწვევს სუქცინილ- CoA-ს პროდუქციის შემცირებას რაც თავის მხრივ, ასევე იწვევს მატრიქსში სუბსტრატული ფოსფორილირების შემცირებას. ამ პროცესების განსაკუთრებული მნიშვნელობა გამომდინარეობს იქიდან, რომ სხვა უჯრედებისაგან განსხვავებით ნერვულ უჯრედს შეუძლია დამატებითი ენერგიის მიღება ლიმონმჟავას ციკლში სუბსტრატული ფოსფორილირების გზით. ამ გზით სინთეზირებული ატფ შეიძლება განიხილოს, როგორც კომპენსაცია გლიკოლიზისა და ჟანგვითი ფოსფორილირების (Phillips et al. 2009) დათრგუნვის დროს. ამ გზით მიღებული ატფ აუცილებელია მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის შესანარჩუნებლად და აპოპტოზის პრევენციისათვის (Chinopoulos et al. 2010). მსგავსი მექანიზმით მოქმედებს მიტოქონდრიის გარეთ არსებული NADH-უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზები, რომლებიც ნაწილობრივ იღებენ თავის თავზე პირველი კომპლექსის ფუნქციებს. ამ ტიპის ფერმენტები სხვადასხვა ფორმით აღმოჩენილია ზოგიერთ ეუკარიოტსა და მცენარეში (Avéret et al. 2015).

1.2.4. მიტოქონდრიის დისფუნქციები და მასთან ასოცირებული დაავადებები

მიტოქონდრია წარმოადგენს მაღალ დინამიურ ორგანელას, რომელიც ასრულებს მრავალ უჯრედულ ფუნქციებს. მისი მთავარი და გამორჩეული ფუნქცია უჯრედში წარმოადგენს ენერგიის მეტაბოლიზმს, ამის გარდა მიტოქონდრია ჩართულია უჯრედისათვის უმნიშვნელოვანეს პროცესებში, როგორებიცა კალციუმის რეგულაცია და ჰომეოსტაზი, სტრესის საპასუხო და უჯრედის პროგრამირებული სიკვდილის სარეგულაციო გზები. აქედან გამომდინარე, გასაკვირი არ არის, რომ მიტოქონდრიული ფუნქციების გაუარესება დაკავშირებულია უჯრედის დაზიანების, დაბერების პროცესებსა და ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებთან. მრავალი მტკიცებულება მომწობს, რომ მიტოქნოდრიული დისფუნქციები თამაშობს მთავარ როლს პარკინსონის დაავადების (PD) პათოგენეზში. 1980 წლიდან დაწყებული დაკვირვება იმის შესახებ რომ, სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის ინჰიბირებამ შესაძლებელია გამოიწვიოს პარკინსონის დაავადება. აღსანიშნავია, რომ უახლესმა კვლევებმა გვაჩვენა, რომ რამოდენიმე პდ-სთან ასოცირებული გენები ურთიერთქმედებენ მიტოქნოდრიული ფუნქციების მარეგულირებელ გზასთან, მორფოლოგიასთან და დინამიკასთან. ფაქტიურად, შემთხვევითი და მემკვიდრული პარკინსონის დაავადების ფორმა, მიტოქონდრიული მთლიანობის დონეზე გადის (Winklhofer and Haass 2010).

ლიმიტირებული გლიკოლიზური შესაძლებლობებიდან გამომდინარე ნეირონები ძალზედ სენსიტიურად არიან დამოკიდებულნი OXPHOS-იზე, როგორც ენერგიის მთავარ წყაროზე. ნეირონებში მიტოქონდრიები უმთავრესად განლაგებულნი არიან სინაფსებში და თამაშობენ უმნიშვნელოვანეს როლს მათ ნორმალურ ფუნქციობაში, აგრეთვე ისინი ენერგიით (ატფ-ით) ამარაგებენ ნეირონებს ნეიროგადაცემების შესასრულებლად და მონაწილეობას ღებულობენ კალციუმის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში (Chang and Reynolds 2006). მიტოქონდრიული დისფუნქციები თანდათანობით ცვლიან მიტოქონდრიების რაოდენობას და დინამიკას, უარესდება მიტოქონდრიების ტრანსპორტი ნეირონული სხეულიდან სინაფსებში, რაც თავის მხრივ აუარესებს სინაფსების ფიზიოლოგიას და საბოლოო

ჯამში იწვევს ნეირონული პლასტიურობის გაუარესებას. (Anandatheerthavarada and Devi 2007; Atamna and Frey 2007; Z. Li et al. 2004).

1.2.5. პარკინსონის დაავადება

პარკინსონის დაავადება (PD), წარმოადგენს ყველაზე ხშირ მოძრაობის შეფერხების დაავადებას და მსოფლიოში მეორე ყველაზე გავრცელებულ ნეიროდეგენერაციულ დაავადებას ალცაიმერის დაავადების შემდგომ. 60 წლის ზემოთ მოსახლეობის დაახლოებით 2%-ს აღენიშნება ეს დაავადება. იგი თავდაპირველად ხასიათდება დოფამინერგული ნეირონების მასიური კვდომით სუბსტანცია ნიგრა პარა კომპაქტაში (SNpc), რასაც მივყავართ დოფამინის დეფიციტამდე სტრიატუმში. ბაზალური განგლიის რეგულაციის მოშლას მივყავართ ყველაზე ხშირ მოტორულ სიმპტომებამდე, როგორებიცაა ბრადიკინეზია, პიჰოკინეზია, კუნთების გაშეშება (რიგიდულობა), კანკალი (ტრემორი) და პოსტულარული არასტაბილურობა. ცილისმაგვარი ჩანართების (Lewy bodies) არსებობა ნეირონულ პერიკარიაში, რომლებიც ძირითადად წარმოდგენილნი არიან α-სინუკლეინით, უბიქიტინით, ნეიროფილამენტებით და მოლეკულური ჩაპერონებით, წარმოადგენს სპორადული პარკინსონიზმის პათოლოგიის განმასხვავებელი ნიშანს (Spillantini et al. 1997). ლევის სხეულაკები წარმოადგენს ცილების გადაგვარებულ აგრეგატებს, რომლებიც ვითარდება ნერვულ უჯრედებში პარკინსონის დაავადების დროს (PD), Lewy body - დემენციისას და სხვა დაავადებების დროს. მათი იდენტიფიცირება შესაძლებელია მიკროსკოპის ქვეშ, თავის ტვინის ჰისტოლოგიის შესწავლისას. ლევის სხეულაკების როლი პათოლოგიის განვითარებაში და მათი სტატუსი როგორც პათოლოგიური მარკერებისა დღეს-დღეობით ისევ წარმოადგენს შესწავლის საკითხს. აღსანიშნავია, რომ შემთხვევითი მემკვიდრული პდ ფორმების შემთხვევაში ლევის სხეულაკების შესახებ არ მიმდინარეობს თანმიმდევრული კვლევები (Hardy et al. 2009).

არსებულ კვლევებზე დაყრდნობით შემოთავაზებულ იქნა თეორია, რომ მიტოქონდრია თამაშობს მთავარ როლს პარკინსონის დაავადების, როგორც

სპორადული, ასევე მემკვიდრული ფორმების პათოგენეზის განვითარებაში. მიტოქონდრიული დისფუნქციები, რომლებიც გამოწვეულია ბიოენერგეტიკის დარღვევით, მიტოქნოდრიული დნმ-ისა და ბირთვული დნმ-ის მუტაციებით, მიტოქონდრიული დინამიკის ცვლილებით, როგორიცაა მაგალითად მიტოქონდრიების შერწყმა და გაყოფა, ცვლილებები ზომასა და მორფოლოგიაში, ცვლილებები ტრანსპორტში და მოძრაობაში, ასევე ტრანსკრიპციის გაუარესებაში და ცილოვანი სპექტრის ცვლილებებში პირდაპირპროპორციულად დაკავშირებულია პარკინსონის დაავადების განვითარებასთან (Bose and Beal 2016).

მიტოქონდრიული დისფუნქცია მჭიდროდ არის დაკავშირებული პდ-ის პათოგენეზთან. ნათელი მტკიცებულება მიტოქონდრიული დისფუნქციისა პდ-ის განვითარებაში ადამიანის თავის ტვინიდან აღებულმა ნიმუშმა მოგვცა. პდ-ით დაავადებული პაციენტების სუბსტანცია ნიგრას ნეირონებში მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის აქტივობა საგრძნობლადაა დაქვეითებული (Schapira et al. 1989; Bindoff et al. 1989). ასევე, პდ-ის პაციენტების სინაპტოსომულ ნეირონებში ნანახია დნმ-ის დელეციების მაღალი ხარისხი (Bender et al. 2006) რითიც ვარაუდობენ მიტოქონდრიულის დისფუნქციის როლს პდ-ის განვითარებაში. პირდაპირი კავშირი მიტოქონდრიულ დისფუნქციებთან პდ-ის განვითარებაში პირველად 1983 წელს ნახეს, მას შემდეგ რაც აღმოაჩინებს ნეიროტოქსინი 1-მეთილ-4-ფენილ-1,2,5,6,-ტეტრაჰიდროპირიდინი (MPTP), რომელიც იწვევდა პდ-ის მსგავს სიმპტომებს ნარკომანებში (Langston et al. 1983). მალევე MPTP-ის ნეიროტოქსიურობა დადასტურდა პრიმატებისა და მღრღნელების მოდელების საშუალებით (Kolata 1983; Burns et al. 1983; Heikkila et al. 1984). მოგვიანებით აღმოაჩინეს MPTP-ის ინჰიბიტორული ეფექტი მიტოქონდრიაზე (Ramsay et al. 1986; Mizuno, Suzuki, and Sone 1990; Suzuki, Mizuno, and Yoshida 1990). დღეს-დღეობით საკმაოდ კარგად ცნობილია MPTP-ის ნეიროტოქსიურობის შესახებ, რომელიც გამოწვეულია მისი ტოქსიური მეტაბოლიტის 1-მეთილ-4-ფენილპირიდინიუმის (MPP+) საშუალებით. MPTP მონოამინ ოქსიდაზას საშუალებით გარდაიქმნება 1-მეთილ-4-ფენილ-2,3-დიჰიდროპირიდინიუმად ასტროციტებში, რომელიც სწრაფად გარდაიქმნება MPP+-ად (Przedborski et al. 2004). MPP+ ასტროციტებიდან გამოიყოფა ორგანული კათიონ 3 ტრანსპორტერის საშუალებით და მათი ტრანსპორტი დოფამინერგულ ნეირონებში

ხორცილედება დოფამინერგული ტრანსპორტერების საშუალებით (Rappold and Tieu 2010). MPP+ აკუმულირდება მიტოქონდრიაში, სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის დათრგუნვით აფერხებს ელექტრონების გადატანის ჯაჭვს, რასაც თან სდევს ატფ-ის რაოდენობის შემცირება და თავისუფალი რადიკალების (ROS)-ის დიდი რაოდენობით წარმოქმნა (Mizuno, Suzuki, and Sone 1990; Przedborski et al. 2004).

პდ-ის გამოწვევა I კომპლექსის ინჰიბირებით. დაავადების გამოწვევა შესაძლებელია ორი პესტიციდის როტენონისა და პარაქვატის გამოყენებით, რომელთა ქიმიური სტუქტურა მსგავსია MPTP-ისა და რომლებიც პირდაპირ აინჰიბირებენ სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსს (Tieu 2011). დოფამინერგული ნეირონების დაზიანების მთავარ მექანიზმს I კომპლექსის დათრგუნვით გამოწვეული ROS-ის პროდუქცია წარმოადგენს, ოქსიდაციური სტრესის მიმართ დოფამინერგული ნეირონები განსაკუთრებით მგრძნობიარენი არიან გამომდინარე იქიდან, რომ კატაბოლიზმის დროს ხდება დოფამინის აუტოოქსიდაცია (Napolitano, Manini, and d'Ischia 2011). მიტოქონდრიული და ციტოპლაზმური ცილების დაჟანგვას, ასევე თავისუფალი რადიკალების დიდი რაოდენობით წარმოქმნას, რომელიც აზიანებს სუნთქვითი ჯაჭვის I და III კომპლექსებს, მივყავართ მიტოქონდრიულ დისფუნქციამდე (Zecca et al. 2004; Abou-Sleiman, Muqit, and Wood 2006). გაზრდილი ოქსიდაციური სტრესი ტვირთავს უბიქვიტინ-პროტეოსომულ სისტემას (UPS), რომლის დროსაც დიდი რაოდენობით გროვდება დაზიანებული და არასწორად დაკეცილი (misfolded) ცილები (Abou-Sleiman, Muqit, and Wood 2006; Jenner 2003). მნიშვნელოვანია, რომ I კომპლექსის ინჰიბიტორებით შესაძლებელია დოფამინერგული ნეირონების მასიური კვდომისა და შესაბამისად პდ-ის კლინიკური სიმპტომების გამოწვევა ლაბორატორიულად, ცხოველურ მოდელებში, რაც თავის მხრივ ეხმარება მეცნიერებს პდ-ის ზუსტი მოლეკულური მექანიზმების შესწავლაში და თერაპევტული აგენტების გამოკვლევაში (Hirsch et al. 2003; Johnson and Bobrovskaya 2015).

როგორც გენეტიკური ფაქტორები, ასევე გარემო პირობები, რომლებიც ასოცირებულნი არიან პდ-სთან მონაწილეობენ მიტოქონდრიული დისფუნქციების განვითარებაში პდ-ის პათოგენეზისას. პდ-ის გამოწვევა ნეიროტოქსინებით,

რომლებიც აინჰიბირებენ მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსს, წარმოადგენს პირდაპირ მტკიცებულებას პდ-ის განვითარებასა და მიტოქონდრიული დისფუნქციების კავშირის დასადასტურებლად. მიტოქონდრიის I კომპლექსის აქტივობის დათრგუნვა ნანახია პდ-ით დაავადებულთა თავის ტვინში, ასევე ხელოვნურად ნეიროტოქსინით გამოწვეული პდ-ის მქონე თაგვებში ან გენეტიკურად განპირობებულ პდ-ის როგორც უჯრედულ ასევე ცხოველურ მოდელებში. ამის გარდა, ორ ავტოსომულ/რეცესიულ პდ გენის პროდუქტებს PINK1 და პარკინს გააჩნიათ მნიშვნელოვანი როლი მიტოფაგიაში. მიტოფაგია - უჯრედული პროცესი, რომელიც მონაწილეობს დაზიანებული მიტოქონდრიის მოცილებაში და აპოპტოზის პრევენციაში. PINK1 ააქტიურებს პარკინს მიტოქონდრიული მემბრანის გარეთა ცილების უბიქვიტინირებისათვის, რომელიც იწვევს აუტოფაგიის გზით დაზიანებული მიტოქონდრიის შერჩევით დეგრადაციას (Qingsong Hu and Wang 2016).

დოფამინერგული ნეირონების მასიური დაკარგვის გარდა SNpc -ში, მემკვიდრულ და შემთხვევით პდ-ის უმეტეს შემთვევებში გადარჩენილ დოფამინერგულ ნეირონებში ნანახია ციტოპლაზმური და ნეკროზული ჩანართები, რომლებსაც ლევის სხეულაკებს (LBs) და ლევის ნეირიტებს უწოდებენ, რომლებიც, როგორც ზემოთ უკვე ავღნიშნეთ ძირითადად შედგებიან ალფა-სინუკლეინით (α-syn) და სხვა ცილოვანი კომპონენტებით (RECCHIA et al. 2004; Yasuda, Nakata, and Mochizuki 2013). მიუხედავად იმისა, რომ დოფამინერგული ნეირონების მასიური კვდომის ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები კიდევ რჩება გაურკვეველი, იდენტიფიცირებული მრავალი ფაქტორი, რომელიც მონაწილეობს პდ პათოგენეზში: ცილების აგრეგაცია (Guerrero et al. 2013), უბიქვიტინ-პროტეასომული გზის დათრგუნვა (Le 2014), ოქსიდაციური სტრესი (Gaki and Papavassiliou 2014), მიტოქონდრიული დისფუნქციები (Ho et al. 2012; Xu et al. 2014) და ნეიროანთებითი პროცესები (Q. Hu et al. 2012; Q. Wang, Liu, and Zhou 2015; Shao et al. 2012). კლინიკურად პდ-ის უმეტესი შემთხვევები არის არარეგულარული იგივე სპორადული, თუმცა მემკვიდრული ფორმები: აუტოსომულ-დომინანტური და რეცესიული, რომლებიც გამოწვეულია პდ-სთან ასოცირებული გენების მუტაციით, იდენტიფიცირებულ იქნა ბოლო 2 ათწლეულის განმავლობაში. პდ-სთან

ასოცირებული მრავალი გენის პროდუქტები წარმოადგენენ მიტოქონდრიულ ცილებს ან გარკვეული სტიმულის საპასუხოდ აქვთ უნარი მიტოქონდრიაში ტრანსლოკაციისა. ისინი ასრულებენ როგორც დამცველობით ასევე დამაზიანებელ ფუნქციებს მიტოქონდრიისთვის. ამ გენებში მომხდარმა მუტაციებმა შესაძლებელია გამოიწვიოს გარკვეული ფუნქციების, როგორც შეძენა ასევე დაკარგვა, შესაბამისად მიტოქონდრიული დისფუნქციაც.

დეფექტური მიტოქონდრია, რომლის ფონზეც გაზრდილია უჯრედის ოქსიდაციური სტრესი (OS), როგორც უკვე აღინიშნა თამაშობს უმნიშვნელოვანეს როლს პდ-ის პათოგენეზში, თუმცა ზუსტი მექანიზმი დღეს-დღეობით უცნობია. სპორადული პდ-ის ეთიოპათოგენეზი კომპლექსურია, როგორც გარემოს ასევე გენეტიკური ფაქტორების ცვალებადი მონაწილეობით. ეს ორივე ფაქტორი ზეგავლენას ახდენს მიტოქონდრიის მრავალ ასპექტებზე, როგორიცაა მიტოქონდრიის სიცოცხლის ციკლი, ბიოენერგეტიკული შესაძლებლობა, ხარისხის კონტროლი, დინამიური ცვლილებები მორფოლოგიაში (შერწყმა და გაყოფა) და პროგრამირებული უჯრედული კვდომის, ანუ აპოპტოზის რეგულაცია. მიტოქონდრიული დისფუნქცია ნანახია მრავალ პდ-ით დაავადებული პაციენტების ქსოვილოვან და უჯრედულ ნიმუშებში, ასევე ტრანსგენულ თაგვებში. დოფამინერგული ნეირონების შეზღუდული რაოდენობა ხელს უშლის მათ დეტალურ შესწავლას.

ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, მიტოქონდრია წარმოადგენს პერსპექტიულ სამიზნეს პდ-ის ადრეული ბიომარკერების შემუშავებისათვის და დაავადების მკურნალობისთვის (Moon and Paek 2015).

1.2.6. ალცჰაიმერი

ალცჰაიმერის დაავადება წარმოადგენს ასაკთან დაკავშირებულ, პროგრესულ ნეიროდეგენერაციულ აშლილობას და დემენციის წამყვან მიზეზს (Querfurth and LaFerla 2010). იგი ძირითადად ხასიათდება ბეტა ამილოიდის (Aβ) დაგროვებით, სინაფსისა და ნეირონების პროგრესული კვდომით, შიდაუჯრედული ნეიროფიბლირალური გროვებით (intracellular neurofibrillary tangles - NFT), ანთებითი რეაქციებით, ოქსიდაციური სტრესითა და მიტოქონდრიების დისფუნქციით. ალცჰაიმერის დაავადება ვითარდება სიმპტომების გარეშე და დადგენილია, რომ კლინიკური სიმპტომების გამოვლენამდე მისი განვითარება 20-30 წლით ადრე იწყება (Mistur et al. 2009). მიუხედავად მრავალი კვლევებისა და ძალისხმევისა, დღეს-დღეობით მაინც გაურკვეველი რჩება ალცჰაიმერის დაავადების პათოგენეზში ის ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები, რომლებიც მონაწილეობას იღებს პათოგენეზში. არსებობს მრავალი ჰიპოთეზა, რომლებიც ნაწილობრივ ხსნიან ალცჰაიმერის დაავადების წარმოქმნას. დღეს-დღეობით ალცჰაიმერის დაავადების განვითარების ერთ-ერთ უპირველეს მიზეზად მიტოქონდრიული დისფუნქცია და ოქსიდაციური სტრესი ითვლება, შესაბამისად ეს სისტემები პოტენციურ თერაპევტულ სამიზნეებს წარმოადგენენ.

უამრავი კვლევა ადასტურებს იმას, რომ მიტოქონდრიული დისფუნქცია წარმოადგენს ალცჰაიმერის დაავადების განვითარების ერთ-ერთ ადრეულ გამოვლენას. მიტოქონდრიული დისფუნქციები აღწერილია ალცჰაიმერით დაავადებულთა თავის ტვინში, (Devi et al. 2006; G. E. Gibson, Sheu, and Blass 1998), ფიბრობლასტებში და სისხლის უჯრედებში (Parker, Filley, and Parks 1990; Jon Valla et al. 2006; X. Wang et al. 2008), ასევე ნანახია ტრანსგენური თაგვების ალცჰაიმერის მოდელებშიც (Caspersen et al. 2005; Eckert et al. 2008; Hauptmann et al. 2009; Z. Li et al. 2004; Lustbader et al. 2004; Manczak et al. 2006; Reddy et al. 2004; Yao et al. 2009), ასევე უჯრედულ ხაზებში, რომლებშიც მუტანტური ამილოიდის პრეკურსორი ცილით (APP) ან ბეტა ამილოიდით (Aβ) იყო გამოწვეული ალცჰაიმერი (Keil et al. 2004). მიტოქონდრიული დისფუნქცია გამოხატულია დაავადების ყველა ეტაპზე და მძიმდება დაავადების პროგრესირებასთან ერთად (Parker, Filley, and Parks 1990).

ალცაიმერის დაავადების დროს მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის გამოვლენილ დეფექტებს მიეკუთვნება α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზული კომპლექსის (α-KDHC), პირუვატ დეჰიდროგენაზული კომპლექსისა (PDHC) და ციტოქრომ ოქსიდაზის (COX) დისფუნქცია (Bubber et al. 2005; G. E. Gibson, Sheu, and Blass 1998; G E Gibson et al. 2000; Mastrogiacomo, Bergeron, and Kish 1993; Ko et al. 2001). α-KDHC და PDHC წარმოადგენენ ლიმონმჟავას ციკლის (TCA) უმნიშვნელოვანეს ფერმენტებს, მაშინ როდესაც COX-ი აფორმირებს ელექტრონთა გადატანის ჯაჭვის IV კომპლექსს. ამ ფერმენტების აქტივობის შემცირება ხელს უწყობს თავისუფალი რადიკალების (ROS) დიდი რაოდენობით წარმოქმნას და ჩართულია არა მხოლოდ მხოლოდ AD პათოლოგიის განვითარებაში და ნეირონების მასიური კვდომაში, არამედ მთელ რიგ სხვა პათოლოგიებში. გარდა ამისა, ალცაიმერის პათოლოგიის დროს ლიმონმჟავას ციკლის (TCA) ფერმენტების შესწავლამ ცხადყო, რომ α-KDHC და PDHC-ის შემცირებულ აქტივობას თან სდევს იზოციტრატ დეჰიდროგენაზის აქტივობის შემცირებაც (Bubber et al. 2005). ამის საპირისპიროდ, სუქცინატისა და მალატ დეჰიდროგენაზული აქტივობა პირიქით, იზრდება. ლიმონმჟავა ციკლის ფერმენტების აქტივობის ცვლილება, რომელიც დაკავშირებულია კლინიკურ მდგომარეობასთან, ნავარაუდებია, რომ მათი დისბალანსი იწვევს თავის ტვინის ფუნქციის გაუარესებას (Bubber et al. 2005). ციტოქრომ ოქსიდაზის აქტივობა მნიშვნელოვნად მცირდება ასაკთან ერთად, რასაც თან სდევს მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ფუნქციონირების გაუარესება (Ojaimi et al. 1999; Sohal et al. 2008). COX-ის აქტივობის შემცირება მკაფიოდ გამოხატულია AD-ში. საყურადღებოა, რომ ალცაიმერის დაავადებისას IV კომპლექსის კატალიზური აქტივობა პათოლოგიურად იცვლება, ხოლო COX-ის სუბერთეულების დონე უცვლელი რჩება (Jon Valla et al. 2006).

ალცაიმერის დაავადების დროს შემცირებული COX-ის აქტივობა ნანახია თავის ტვინში, ფიბრობლასტებსა და თრომბოციტებში, (Bosetti et al. 2002; Cardoso et al. 2004; Mutisya, Bowling, and Beal 1994; Parker 1991; Parker, Filley, and Parks 1990; Parker et al. 1994; Jon Valla et al. 2006), MCI (mild cognitive impairment - სუსტი კოგნიტური გაუარესება)-ის მქონე პირთა თრომბოციტებში (Jon Valla et al. 2006), ასევე ჰიბრიდულ უჯრედებში, რომლებიც შეიცავენ მიტოქონდრიულ დნმ-ს ალცაიმერით

დაავადებული პაციენტებისაგან (Cardoso et al. 2004; Trimmer et al. 2004; Swerdlow et al. 1997).

თავის ტვინი განსაკუთრებით მგრძნობიარეა თავისუფალი რადიკალების მიმართ, რამოდენიმე მიზეზის გამო. იგი გამოირჩევა მაღალი ჟანგბადის მოხმარებითა და კონცენტრაციით, მაშინ როდესაც მას გააჩნია გაცილებით ნაკლები ანტიოქსიდანტური დაცვა, ამავდროულად თავის ტვინი შეიცავს ნახევრადუჯერ მემბრანულ ცხიმოვან მჟავებს, ასევე მაღალი კონცენტრაციით რკინასა და ასკორბატს (Moreira et al. 2005). ძირითადად თავის ტვინის მოთხოვნილებას გაზრდილი ენერგიის მოხმარების მიმართ უზრუნველყოფს ჟანგვითი ფოსფორილირება (OXPHOS), რომელიც, როგორც ცნობილია წარმოადგენს მთავარ თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის წყაროს. როდესაც თავისუფალი რადიკალების დონე სცილდება უჯრედული ანტიოქსიდანტური დაცვითი სისტემების შესაძლებლობებს, დგება უჯრედისათვის დამანგრეველი პროცესი, რომელსაც ოქსიდაციური სტრესი ეწოდება. ოქსიდაციური სტრესი და მიტოქონდრიული დისფუნქცია უდაოდ მონაწილეობენ დაბერებისა და ალცაიმერის დაავადების განვითარების პროცესებში (Moreira et al. 2005, 2010; Aleksandra Trifunovic et al. 2004; A. Trifunovic et al. 2005). საყურადღებოა, რომ ცხოვრების სტილი და ასაკი წარმოადგენენ ალცაიმერის დაავადების რისკ ფაქტორებს, ასევე დაავადების განვითარებასთან დაკავშირებულია ისეთი რისკ ფაქტორები როგორებიცაა ჰიპერტენზია, ტრავმული თავის ტვინის დაზიანება, შაქრიანი დიაბეტი, ჰიპერქოლესტეროლემია, ჰიპერჰომოცისტეინემია, მოწევა, მაღალი დოზით კალორიების მიღება, ფიზიკური აქტივობის დაბალი სიხშირე რომლებიც მონაწილეობენ ოქსიდაციური სტრესის დონის გაზრდაში. ამის საწინააღმდეგოდ, არსებობს ალცჰაიმერის დაავადების დამცველობითი ფაქტორები, რომელთა შორისაცაა ანტიოქსიდანტები, იგივე თავისუფალი რადიკალების სქავენჯერები, როგორებიცაა მაგ. ვიტამინი C, E, ესტროგენი, არასტეროიდული ანთების საწინააღმდეგო წამლები, სტატინები და ა.შ., ასევე ფაქტორები, რომლებიც ხელს უწყობენ ნეირონების გადარჩენას, მაგალითად კალორიების შეზღუდვა (Akihiko Nunomura et al. 2006). ოქსიდაციური სტრესის მარკერების დონე გაცილებით მაღალია AD და MCI-ში ვიდრე შესაბამისი ასაკის ჯანმრთელ კონტროლებში. არსებობს უამრავი მტკიცებულება თავის ტვინში, ბიოლოგიური სითხეებისა და

პერიფერული ქსოვილების ალცჰაიმერით დაავადებულ პაციენტებში ჭარბი რაოდენობით თავისუფალი რადიკალების მიერ გამოწვეულ ოქსიდაციურ დაზიანების შესახებ, განსაკუთრებით ლიპიდების, (D A Butterfield et al. 2001; Montine et al. 2002; Praticò et al. 2001), ნუკლეინის მჟავების (Abe et al. 2002; Mecocci, MacGarvey, and Beal 1994; A Nunomura et al. 1999; J. Wang et al. 2005) ცილების (Aksenov et al. 2001; Castegna, Aksenov, Thongboonkerd, et al. 2002; Castegna, Aksenov, Aksenova, et al. 2002; Sultana, Perluigi, and Butterfield 2009; D. Allan Butterfield and Sultana 2007), მოლეკულებში (Mancuso et al. 2006), ასევე ტრანსგენულ ალცაიმერის მოდელის თაგვებში (Hauptmann et al. 2009; Reddy 2006; Praticò et al. 2001; Yao et al. 2009). გაზრდილი ოქსიდაციური დაზიანება MCI-ში წარმოადგენს ნეიროდეგენერაციულ დაავადებების ერთგვარ ადრეულ სიმპტომს (Keller et al. 2005; Migliore et al. 2005; Padurariu et al. 2010; Smith et al. 2010; Sultana and Butterfield 2009; Sultana, Perluigi, and Butterfield 2009). გარდა ამისა, ოქსიდაციური სტრესი მჭიდროდ არის დაკავშირებული ნეირონების მასიურ კვდომასთან და პათოლოგიისათვის დამახასიათებელ ტოპოგრაფიულ განაწილებასთან. კერძოდ, პირველ რიგში ზიანდება ჰიპოკამპი, პარიეტოტემპორალური და უკანა სარტყლისებრი ქერქი (posterior cingulate cortices) (Hirai et al. 2001; Mutisya, Bowling, and Beal 1994; Simonian and Hyman 1994; J Valla, Berndt, and Gonzalez-Lima 2001; J. Wang et al. 2005). ამის გარდა, AD-ში ნანახია ლიმონმჟავა ციკლის (ETC) შესუსტებული მუშაობა, რაც თავის მხრივ ROS-ების პროდუქციის წყაროს წარმოადგენს (Mancuso et al. 2007). უახლესი კვლევებით კი ნანახია, რომ ROS-ების მომატებული პროდუქცია პირდაპირპროპორციულად დაკავშირებულია მიტოქონდრიულ ცვლილებებთან, როგორებიცაა მიტოქონდრიის მორფოლოგიის, დინამიკის ცვლილება რაც საბლოოდ უჯრედის კვდომას იწვევს (Reddy 2007; Barsoum et al. 2006; Benard et al. 2007; Yoon et al. 2006).

არსებობს რამოდენიმე მოსაზრება, იმის შესახებ, რომ ჟანგვითი დაზიანებები წინ უსწრებს ალცაიმერის დაავადების პათოლოგიის განვითარებას. ალცაიმერის დაავადების საწყის ეტაპზე Aβ-ს დეპონირება შესაძლებელია წარმოადგენდეს ნეირონების მიერ კომპენსატორულ პასუხს თავის ტვინში ოქსიდაციური დაზიანებების საპასუხოდ თანმდევი დაბერების პროცესისას (Kontush 2001; Moreira et

al. 2006; Akihiko Nunomura et al. 2006; X. Zhu et al. 2007). უახლესი მონაცემები მიუთითებს, რომ ინტრანეირონულმა არაოლიგომერულმა ბეტა-ამილოიდმა (Aβ), მათი კონცენტრაციისა და ერთობლიობის მდგომარების მიხედვით, ასევე რედოქს-აქტიური ლითონების სიჭარბის მიხედვით შესაძლებელია იმოქმედოს, როგორც ანტიოქსიდანტმა (Atwood et al. 2003; Kontush 2001; Akihiko Nunomura et al. 2010). მეორეს მხრივ, Aβ მოქმედებს, როგორც მეტალების ქელატორი, ამასთანავე მას აქვს მეტალების აღდგენის უნარი, რასაც მივყავართ უჯრედებში არსებული მოლეკულების დაჟანგვამდე (X. Zhu et al. 2007). ნანახია, რომ ალცაიმერის დაავადების პროგრესირებისას Aβ და NFT-ის ანტიოქსიდანტური აქტივობა იცვლება პრო-ოქსიდანტურად (Akihiko Nunomura et al. 2006).

გამომდინარე, იქიდან რომ უჯრედების ბიოენერგეტიკა სპეციფიურია უჯრედების ტიპისა და ქსოვილის მიხედვით, ზოგადი კანონზომიერების გამოსავლენად საჭიროა რამოდენიმე ორგანიზმის მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის შესწავლა. ამ თვალსაზრისით ბიოენერგეტიკულად ერთ-ერთ საინტერესო მოდელს საფუარი წარმოადგენს.

1.2.7. ჰორმეზისი და ნეიროპროტექცია

უახლესი კვლევებით ნანახი იქნა შეუღლების გამთიშავი (ანქაფლერი) ცილების (UCP) მნიშვნელოვანი როლი როგორც ნეირონულ პლასტიურობაში, ასევე მეტაბოლური და ოქსიდაციური სტრესის მიმართ რესიზტენტობაში. UCP ცილების ექსპრესია ძირითადად ხდება ბიოენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ისეთი ცვლილებების დროს, რომელიც თან ახლავს კალორიების შეზღუდვას და ვარჯიშს, რის საშუალებითაც ისინი შესაძლებელია იცავენ ნეირონებს დისფუნქციისა და დეგენერაციისაგან.

გამოვლენილია სამი ცხოვრებისეული ფაქტორი, რომელიც ხელს უწყობს ტვინის ოპტიმალურ ფუნქციონირებას და ნეირონების მდგრადობას დაზიანებებისა და ასაკთან დაკავშირებული ნეიროდეგენერაციული დისფუნქციებისაგან, ესენია

ვარჯიში, კვების (დიეტური) შეზღუდვა (იგულისხმება სწორი კვება), სოციალური ინტერაქციები და ინტელექტუალურ გამოწვევებში რეგულარული ჩართულობა (Mattson 2012, 2015; Barnard et al. 2014; Yaffe et al. 2014). მაგალითად, პერიოდულ შიმშილს და ვარჯიშს შეუძლია თავიდან აგვარიდოს ნეირონული დისფუნქციები და ნეიროდეგენერაცია ალცაიმერისა (AD) და პარკინსონის (PD) დაავადების ცხოველურ მოდელებში, ასევე ინსულტის დროს (Duan and Mattson 1999; Halagappa et al. 2007; Ploughman et al. 2007; Yuede et al. 2009; Tapia-Rojas et al. 2016; Arumugam et al. 2010; Zigmond and Smeyne 2014). ამის საპირისპიროდ, ინდივიდები, რომლებიც პასიური ცხოვრების წესს ეწევიან, ზედმეტად კალორიულ პროდუქტებს მიირთმევენ და არ არიან დაკავებულები ინტელექტუალური აქტივობებით (ე.წ."couch potato" ცხოვრების წესი) მათ AD-ისა და ინსულტების, ასევე სხვა დაავადებების განვითარების მომატებული რისკი აქვთ (Mattson 2015; Akinyemi et al. 2013; Geisler 2011).

ლაბორატორიულ ცხოველებზე და ადამიანებზე ჩატარებულმა დაკვირვებამ ცხადყო, რომ პერიოდული ბიოენერგეტიკული გამოწვევები, როგორებიცაა საკვების გახანგძლივებული შეზღუდვა და აქტიური ფიზიკური ვარჯიში, აძლიერებს თავის ტვინის ფუნქციონირებას და ზრდის სტრესისადმი მის რეზისტენტობას (Mattson 2012). ბიოლოგიური ჰორმეზისის პრინციპების კლასიკური დახასიათება წარმოადგენს ორფაზიან დოზა-დამოკიდებულების მრუდს, რომლის დროსაც დაბალი დოზით პოტენციურად დამაზიანებელ აგენტი ან მდგომარეობა ორგანიზმში იწვევს სასარგებლო ფიზიოლოგიურ პასუხს (Calabrese et al. 2007).

ცნობილია, რომ უჯრედული კულტურისა და ცხოველური მოდელების შემთხვევაში ძლიერმა მეტაბოლურმა სტრესმა შესაძლებელია გაზარდოს მათ რეზისტენტობა არა მარტო უფრო ძლიერი მეტაბოლური სტრესის მიმართ, არამედ ოქსიდაციური და სხვა ტიპის სტრესებისადმიც. ამგვარად, ფაქტორებს, რომლებიც იწვევენ ძლიერ ბიოენერგეტიკულ და მიტოქონდრიულ ოქსიდაციურ სტრესს, შეუძლიათ დაიცვან ნეირონები მეტად ძლიერი ნეირონული სტრესისაგან. მაგალითად, მიტოქონდრიული ატფ-სინთაზის (ანუ სუნთქვითი ჯაჭვის V კომპლექსის) ინჰიბირება იწვევს ნეირონების რეზისტენტობას ექსციტოტოქსიური დაზიანებისადმი (Formentini et al. 2014). მეტაბოლური და ოქსიდაციური პრეკონდიციის ნეიროპროექტორული ეფექტი ასევე მოიცავს, მიტოქონდრიული

მდგარადობის გაძლიერებას და შეუღლების გამთიშავი (ანქაფლერი) ცილების ჩართულობას.

პირველად შეუღლების გამთიშავი (ანქაფლერი) ცილების (UCP) ჯგუფში აღმოჩენილ იქნა UCP1. იგი წარმოდგენილია რუხ ცხიმოვან უჯრედებში, სადაც მის ფუნქციას წარმოადგენს სითბოს წარმოქმნა ისეთ ძუძუმწოვართა ორგანიზმში, რომლებიც ცივ გარემოში ცხოვრობენ (Golozoubova et al. 2001). ადამიანებს მღრღნელებთან შედარებით 50-ჯერ ნაკლები რუხი ცხიმი აქვთ, შესაბამისად UCP1 ცილები უმნიშვნელო როლს ასრულებენ ადამიანების თერმოგენეზში (Geisler 2011). თუმცა, UCP1 ცილის ჰომოლოგები UCP2, UCP3, UCP4, და UCP5 (BMCP1) უფრო ფართოდ არიან ექსპრესირებულნი ადამიანში და მათი როლი მიტოქონდრიაში დაკავშირებულია უჯრედული სტრესის ადაპტაციასთან (Giralt and Villarroya 2017). ნეირონებში UCP1 ძალიან მცირე რაოდენობით, ან საერთოდ არ ექსპრესირდება, მის ნაცვლად კი ექსპრესირდებიან UCP2, UCP4, და UCP5 ცილები (Andrews, Diano, and Horvath 2005). ეს უკანასკნელნი (UCP) აქტივირდებიან ცხიმოვანი მჟავებითა და თავისუფალი რადიკალებით, ინჰიბირდებიან პურინებითა და ნუკლეოტიდებით, მათი ექსპრესიის ინდუქცია კი შესაძლებელია სხვადასხვა მეტაბოლური და ოქსიდაციური გამოწვევებით, მათ შორის ვარჯიშითა და საკვებიდან მიღებული კალორიების შეზღუდვით (Andrews, Diano, and Horvath 2005; D. Liu et al. 2006). ტრანსკრიპციის ფაქტორები, რომლებიც არეგულირებენ ნეირონულ UCP-ების ექსპრესიას ჯერ-ჯერობით არ არის დადგენილი; ციკლურ ამფ-ზე მოპასუხე ელემენტის დამაკავშირებელი ცილა (CREB) წარმოადგენს ერთ-ერთ სავარაუდო კანდიდატს გამომდინარე იქიდან, რომ იგი ჩართულია UCP1-ის ექსპრესიის ინდუქციაში ადიპოციტებში (Rim and Kozak 2002) და აშუალებს ნეირონების ადაპტურ პასუხს მეტაბოლური და ამაგზნებელი გამოწვევების მიმართ (Bengtson and Bading 2012).

უჯრედული კულტურებისა და in vivo შესწავლებმა ცხადყო, რომ UCP2, UCP4, და UCP5 თამაშობენ მნიშვნელოვან როლს ნეირონების მიერ ბიოენერგეტიკული და ოქსიდაციური სტრესის საპასუხო რეაქციებში, აქედან გამომდინარე მათ შეუძლიათ დაიცვან ნეირონები სიკვდილისაგან, როგორც თავის ტვინის მწვავე დაზიანებების, ასევე ნეიროდეგენერაციული დისფუნქციების მქონე ექსპერიმენტულ მოდელებში.

იშემიური პრეკონდიცია იწვევს UCP2 ცილების ექსპრესიას თავის ტვინის უჯრედებში, რაც დაკავშირებულია ნეიროპროტექციასთან იშემია/რეპერფუზიულ თავის ტვინის დაავადების მქონე ცხოველურ მოდელებში (Y. Liu et al. 2009). პერიფერული სენსორული ნეირონების შესწავლამ აჩვენა, რომ ჰიპერგლიკემია იწვევს UCP3-ის ექსპრესიის დაუნრეგულაციას, ამავდროულად UCP3 ან UCP1-ის ოვერექსპრესია კი იცავს ნეირონებს ქრონიკული ჰიპერგლიკემიისაგან. აქედან გამომდინარე, ნავარაუდებია UCP-ების შესაძლო როლი დიაბეტურ პერიფერულ ნეიროპათიებში (Vincent et al. 2004). არსებული მონაცემები საფუძველს გვაძლევს ვივარაუდოთ UCP-ების მნიშვნელოვანი როლი ნეირონების დაცვაში როგორც მეტაბოლური და ოქსიდაციური, ასევე ექციტოტოქსიური სტრესების დროს.

დოფამინერგული ნეირონების პირველად უჯრედულ კულტურაში UCP2-ების ოვერექსპრესიამ დაიცვა ნერონები მიტოქონდრიული პირველი კომპლექსის ინჰიბიტორის - როტენონის ზემოქმედებისაგან, cAMP-დამოკიდებული პროტეინკინაზული კასკადის აქტივაციის გზით (Hwang et al. 2014). ასევე ნანახია, რომ UCP-ების აქტივაციამ შესაძლებელია გამოიწვიოს ინდივიდუალური მიტოქონდრიის მიერ ატფ-ის პროდუქციის კლება, მთლიანად კი ატფ-ის რაოდენობა შესაძლებელია შენარჩუნდეს ან გაიზარდოს კიდეც. რამოდენიმე ფაქტორი ხსნის ამ ტიპის ბიოენერგეტიკულ ადაპტაციას: პირველი, UCP-ები ძირითადად აქტივირდებიან/ექსპრესირდებიან თავისუფალი ცხიმოვანი მჟავებით (მაგ. დოკოზოჰექსანოიდის მჟავა, პალმიტოლეინის მჟავა და ბუთირულით), რომლებიც აკუმულირდებიან შიმშილისა და იმ მეტაბოლური პირობების საპასუხოდ, რომლის დროსაც ხდება კეტონების, როგორიცაა ბ-ჰიდროქსიბუთირათის დონის მატება (Davis, Rho, and Sullivan 2008). მეორე, იგივე ფაქტორები, რომლებიც აძლიერებენ მიტოქონდრიული შეუღლების გამთიშავ პროცესებს, ასევე ასტიმულირებენ მიტოქონდრიულ ბიოგენეზს, რომლის დროსაც იზრდება მიტოქონდრიების რაოდენობა უჯრედებში (Z. Wu et al. 1999). მომატებული მიტოქონდრიული ბიოგენეზი ნეირონებში ხელს უწყობს ახალი სინაფსების ფორმირებას და არსებულის შენარჩუნებას, რაც განიხილება, როგორც საპასუხო რეაქცია ისეთ ბიოენერგეტიკულ გამოწვევებზე, როგორიცაა ვარჯიში და შიმშილი (Cheng et al. 2012).

ამრიგად, მიტოქონდრიული ელექტრონების სატრანსპორტო ჯაჭვის აქტივობის შემცირებით და ატფ-ის რაოდენობის ალტერნატიული გზებით გაზრდის გზით UCP-ებს შეუძლიათ შეამცირონ მიტოქონდრიული თავისუფალი რადიკალების პროდუქცია და უჯრედული ბიოენერგეტიკის ნორმალურ დონეზე შენარჩუნება.

უახლესი კვლევებით დადგინდა ისეთი ფარმაკოლოგიური აგენტების თერაპიული როლი, რომლებიც იწვევენ მიტოქონდრიის ძლიერ შეუღლების გათიშვას (ანქაფლინგს, ანუ პროტონების გამონთავისუფლებას მიტოქონდრიულ მატრიქსში) მწვავე და ქრონიკული ნეიროდეგენერაციის პირობებში. ნეიროდეგენერაციის ექსპერიმენტულ მოდელებში ყველაზე ფართოდ გამოყენებული და ეფექტური შეუღლების გამთიშავი (ანქაფლერი) ნაერთი არის 2,4-დინიტროფენოლი (DNP). დაბალი დოზით DNP-ის (1–3 mM) დამატება იცავს კორტიკალურ ნეირონებს ჟანგბადისა და გლუკოზის დეპრივაციისაგან (Mattiasson et al. 2003).

სუნთქვითი სიხშირის გაძლიერება სუსტი შეუღლების გამთიშავით 1) ამცირებს სუპეროქსიდების ანიონური (O^{-}_{2}) რადიკალების წარმოქმნას მიკროგარემოში O_2-ის კონცენტრაციის შემცირებით; 2) ხელს უწყობს სუნთქვითი ჯაჭვის შუამავალი კომპონენტების ჟანგვით მდგომარეობაში შენარჩუნებას, როგორებიცაა I კომპლექსისა და III კომპლექსის მთავარი O_2-ის პროდუქციის უბნები; 3) ამცირებს NADH-ის დონეს და შესაბამისად თავიდან იცილებს თავისუფალი რადიკალების (ROS) წარმოქმნას მიტოქონდრიის მატრიქსული ფლავოპროტეინების მიერ და 4) ამცირებს მემბრანულ პოტენციალს, რაც აინჰიბირებს ელექტრონების რევერსნაკადს სუნთქვითი ჯაჭვის II კომპლექსიდან I კომპლექსზე (Kowaltowski et al. 2009). მემბრანული პოტენციალის შემცირება DNP-ს მოქმედების შედეგად ტრანზიტორულად ზრდის ციტოზოლურ Ca^{2+}-ის დონეს, მაგრამ ამავდროულად ამცირებს შიდამიტოქონდრიული Ca^{2+}-ის რაოდენობას, რის საშუალებითაც ამცირებს ოქსიდაციურ სტრესს ვირთაგვის კორტიკალური ნეირონების უჯრედულ კულტურაში (D. Liu et al. 2015). აქედან გამომდინარე, DNP-ს უნარი შეამციროს მიტოქონდრიული თავისუფალი რადიკალების პროდუქცია და ამავდროულად დაიცვას მიტოქონდრია Ca^{2+}-ის გადაჭარბებული რაოდენობის აკუმულაციისაგან, ხსნის მის თერაპიულ პოტენციალს ისეთი დაავადებების დროს რომელთა

პათოგენეზშიც უჯრედული კალციუმის ჭარბი რაოდენობის აკუმულირება თამაშობს მთავარ როლს. DNP-ს დამატება მიოკარდიუმის გულის უჯრედებს იცავს იშემიური ინსულტებისაგან (Minners et al. 2000; Hausenloy et al. 2004).

თანაზიარად, ეს დასკვნები მთლიანად შეესაბამება ჰორმეზისზე დაფუძნებულ DNP-ის ნეიროპროტექტორულ მოქმედების მექანიზმს, სადაც მიტოქონდრიული შეუღლების სუსტი გათიშვა (ანქაფლინგი) ასტიმულირებს კოორდინირებულ ადაპტურ ნეირონულ მოლეკულურ პასუხს, რაც შემდგომში აძლიერებს ნეირონულ მდგრადობას მეტაბოლური, ოქსიდაციური და ექსციტოტოქსიური სტრესების მიმართ.

შეუღლების გამთიშავ სხვა აგენტებს რომლებსაც ერთ ან მეტ ცხოველურ მოდელებზეც აქვთ DNP-ს მსგავსი ნეიროპროტექტორული მოქმედება, მიეკუთვნება FCCP და დიაზოქსიდი (diazoxide) (D. Liu et al. 2002; Pandya et al. 2007; Pandya, Pauly, and Sullivan 2009). დიაზოქსიდი, ნაერთი, რომელიც ხსნის ატფ მგრძნობიარე K^+ არხებს, ჰორმეზზე დაფუძვნებული მექანიზმით ავლენს ნეიროპროტექტორულ ეფექტს AD-ისა და ინსულტის მქონე ექსპერიმენტულ მოდელებში (D. Liu et al. 2002, 2010).

მნიშვნელოვანია, რომ მომავალში სწორად შეფასდეს იმ ჩარევის შედარებითი უპირატესობები, რომლებიც განაპირობებენ UCP ცილების ექსპრესიის რეგულაციას. ნაჩვენებია, რომ რამდენიმე ტიპის ჩარევამ გამოიწვია UCP ერთი ან მეტი ცილის ექსპრესიის აფრეგულაცია თავის ტვინის უჯრედებში. ასე მაგალითად, მორბენალი ბორბალის ექსპერიმენტმა გამოიწვია UCP2 ცილის ექსპრესია ვირთაგვის ჰიპოკამპში (Vaynman et al. 2006). UCP2 ცილის ნოკაუტირებულ თაგვებში ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ვარჯიშის დროს UCP2 არსებობა აუცილებელია იმისათვის, რომ გაიზარდოს სინაფსების რაოდენობა დენდრიტებზე CA1 რეგიონში პირამიდული ნეირონებისათვის, ასევე დაკბილული ფასციის მარცვლოვანი ნეირონებისათვის ჰიპოკამპში (Dietrich, Andrews, and Horvath 2008). კალორიების შეზღუდვა და პერიოდული შიმშილი, ასევე კეტოგენური დიეტა უზრუნველოფს UCP2-ის და სხვა UCP ცილების ექსპრესიას თავის ტვინში (Sullivan et al. 2004).

ცნობილია, რომ ვარჯიში და ენერგიის შეზღუდვა (სადაც დიეტა იგულისხმება) დადებითად მოქმედებს ისეთ ორგანოთა სისტემებზე, რომლებშიც ადგილი აქვს

მრავალი მაღალინტეგრირებული, ევოლუციურად-კონსერვატული უჯრედული და მოლეკულური მექანიზმების ფუნქციონირებას (Mattson 2015).

შეუღლების გამთიშავი ნაერთები სიმსუქნის, დიაბეტისა და ნეიროდეგენერაციული დარღვევების პროფილაქტიკისათვის შესაძლებელია იქნეს გამოყენებული. მაგალითად, DNP-ს, რომელიც იწვევს შეუღლების სუსტ გათიშვას (ანქაფლინგს) ჰეპატოციტებში, კონტროლიდებადი დოზით ორალურად შეყვანა ამცირებს ინსულინისადმი რეზიზტენტობას, ჰიპერლიპიდემიას და ღვიძლის სტეატოზს (ცხიმოვანი დეგენერაცის) დიაბეტის მქონე ვირთაგვის ცხოველურ მოდელებში (Perry et al. 2015).

ამგვარად, მიტოქონდრიიული სტრესის მიმართ რეზისტენტობის გაძლიერება შესაძლებელია წარმოადგენდეს ეფექტურ თერაპიულ საშუალებას ისეთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების დროს, რომელთა პათოგენეზში ჩართულია მეტაბოლური და ოქსიდაციური უჯრედული სტრესი.

თავი 2. საფუარი და მისი ბიოენერგეტიკა

2.1. საფუარის ზოგადი მიმოხილვა

საფუარები წარმოადგენენ ფართოდ გავრცელებულ ერთუჯრედიან ორგანიზმებს, რომლებიც ბინადრობენ და კოლონიზდებიან დედამიწის თითქმის ყველა ბუნებრივ გარემოში, ხმელეთზე, ჰაერში და წყალში, სადაც მათი წარმატებული კოლონიზაცია მჭიდროდ არის დაკავშირებული ცვლად გარემოსთან ადაპტაციაზე.

ნახშირწყლების მეტაბოლიზმის ცენტრალური გზა სხვადასხვა სახეობის საფუარებში ძირითადად იდენტურია, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ეს მიკროორგანიზმები წარმოადგენენ მეტაბოლურად ჰომოგენურ ჯგუფს. მიუხედავად ამისა, საკვები ნივთიერებების მოხმარების მექანიზმი, სხვადასხვა იზოფერმენტების რაოდენობა და რაც მთავარია ფერმენტაციის რეგულაცია, მათ შორის სუნთქვა მნიშვნელოვნად განსხვავდება (Flores et al. 2000). ამ თვალსაზრისით, საფუარები წარმოადგენენ ძალზედ ჰეტეროგენულ და რთულ მეტაბოლურ ჯგუფებს.

საფუარებში, ისევე როგორც სხვა ჰეტეროტროფულ ორგანიზმებში, ენერგია და ნახშირბადოვანი მეტაბოლიზმი მჭიდროდაა ურთიერთდაკავშირებული, ე.ი. ანაბოლიზმი დაკავშირებულია კატაბოლიზმთან. ატფ წარმოიქმნება ორგანული მოლეკულების დაჟანგვით, რომლებიც ასევე წარმოადგენენ ნახშირბადის წყაროს ბიოსინთეზისთვის, მაგრამ ის ასევე წარმოადგენს ძირითად ენერგეტიკულ მოლეკულას რომელიც გამოიყენება უჯრედში მიმდინარე ყველა რეაქციის მიმდინარეობისას. ბუნებრივ პირობებში საფუარების სახეობებს გააჩნიათ ნახშირბადის წყაროს ფართო სპექტრი (მაგ. პოლიოლები, სპირტები, ორგანული მჟავები და ამინომჟავები), რომლებსაც შეუძლიათ ხელი შეუწყონ მათ ზრდას, მაგრამ ისინი შაქრების მეტაბოლიზმს ანიჭებენ უპირატესობას., ნახშირბადის სხვადასხვა წყაროს მეტაბოლიზმთან დაკავშირებული ინფორმაცია ძალზედ დიდია, განსაკუთრებით კარგადაა შესწავლილი ჰექსოზები (გლუკოზა, ფრუქტოზა, გალაქტოზა ან მანოზა) და დისაქარიდები (მალტოზა ან საქაროზა), ასევე ორატომიანი ნახშირბადის ნაერთები (ეთანოლი ან აცეტატი). ჰექსოზების და

დისაქარიდების მეტაბოლიზმს აქვს საერთო მეტაბოლური გზები (გამოიყენებენ გლიკოლიზის, ტრიკარბონის მჟავების (კრებსის) ციკლის და პენტოზოფოსფატური გზის შუალედურ პროდუქტებს), ისინი ძირითადად განსხვადებიან მხოლოდ მეტაბოლიზმის საწყისი სტადიით. მნიშვნელოვანი ცვლილებები შეიშნება მაშინ, როდესაც ვადარებთ შაქრების მეტაბოლიზმს ორნახშირბადიანი ნაერთების მეტაბოლიზმთან. ამ შემთხვევაში ტრიკარბონის მჟავების (ლიმონმჟავას) ციკლი, პენტოზოფოსფატური გზა გლუკონეოგენეზთან და გლიოქსილატის ციკლთან ერთად წარმოადგენენ ანაბოლური წინამორბედების უზრუნველყოფისთვის უმნიშვნელოვანეს პროცესებს. გარემო პირობების მრავალფეროვნება მათ შორის ნახშირბადის და ენერგიის ხელმისაწვდომობა განაპირობებს საფუარების მეტაბოლური სარეგულაციო გზების კომპლექსურობას. საინტერესოა საფუარების მეტაბოლიზმის თავისებურებანი, რომლებიც სპეციფიკურად დაკავშირებულია გლუკოზის კატაბოლიზმთან Saccharomyces cerevisiae-ში როგორც ანაერობულ, ისე აერობულ პირობებში. დიდი ყურადღება ეთმობა პირუვატის მეტაბოლიზმს ალკოჰოლური ფერმენტაციის და სუნთქვის პროცესებისას.

2.2. საფუარის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი

2.2.1. პასტერის ეფექტი

თანამედროვე შეხედულებებით პასტერის ეფექტი ანაერობული გლიკოლიზის აქტივაციას მიეკუთნება, უჯრედული ატფ-ის მოთხოვნილებების დასაკმაყოფილებლად, ვინაიდან ატფ-ის სინთეზი ფერმენტული გზით უფრო დაბალეფექტურია, სუნთქვის დროს მიღებულ ატფ-ის რაოდენობასთან შედარებით. 1861 წელს პასტერმა შეამჩნია, რომ უჟანგბადო არეში S. cerevisia მოიხმარს გლუკოზას გაცილებით მეტი რაოდენობით, ვიდრე ჟანგბადიან არეში. მან აჩვენა, რომ აერაციის (ე.ი. აერობულ პირობებში) დროს საფუარების ზრდა ჩქარდებოდა (უფრო სწრაფად მიმდინარეობდა), ხოლო ანაერობულ პირობებში კი მცირდებოდა. პასტერმა გამოიტანა დასკვნა, რომ მიკროორგანიზმებში (საფუარებში) მეტაბოლიზმის

გადართვა ანაერობული ენერგეტიკული ცვლიდან (დუღილი) აერობულ (სუნთქვა) ცვლაზე ენერგეტიკულად გაცილებით მომგებიანია (ხელსაყრელია). ეს ეფექტი აიხსნება იმით, რომ საფუარები წარმოადგენენ ფაკულტატურ ანაერობებს და მათ შეუძლიათ ენერგია მიიღონ ორი სხვადასხვა მეტაბოლური გზის გამოყენებით. ჟანგბადის დაბალი კონცენტრაციებისას გლიკოლიზის პროდუქტი - პირუვატი გარდაიქმნება ეთანოლში და ნახშირმჟავაში (რომელიც შემდეგომში იშლება ნახშირორჟანგად და წყლად), დაბალი ენერგეტიკული გამოსავალით (2 მოლ. ატფ ერთ მოლ. გლუკოზაზე). თუ ჟანგბადის კონცენტრაცია მაღალია - პირუვატი გარდაიქმნება აცეტილ-CoA, რომელიც ლიმონმჟავა (კრებსის) ციკლში ჩაერთვება, სადაც ატფ-ის გამოსავალი უფრო მაღალია (38 მოლ ატფ - ერთ მოლ. გლუკოზაზე). ამგვარად საფუარებისთვის გაცილებით ხელსაყრელია ლიმონმჟავა (კრებსის) ციკლის გამოყენება, რადგან გლუკოზას ერთნაირი კონცენტრაციისას აერობულ პირობებში ატფ-ის უფრო მეტი რაოდენობა სინთეზირდება ანაერობულთან შედარებით.

2.2.3. კრაბტრის ეფექტი (Crabtree Effect)

კრაბტრის ეფექტი (გლუკოზით რეპრესია) - საფუარებში სუნთქვის დამუხრუჭება და დუღილის გააქტივებაა შაქრის მაღალი კონცენტრაციის არეში (Pronk, Yde Steensma, and Van Dijken 1996). სახელწოდება ინგლისელი ბიოქიმიკოსის ჰერბერტ გრეისი კრაბტრის პატივსაცემად ეწოდა. როგორც ცნობილია, ჟანგბადი ამუხრუჭებს დუღილის (პასტერის ეფექტი) პროცესს, მაგრამ S. cerevisiae საფუარის ზოგიერთი სახეობა, თუ არეში საკმაოდ დიდი რაოდენობითაა შაქრები, გამოიმუშავებენ ეთანოლს აერობულ პირობებში. რადგან სპირტი საფუარებისთვის ტოქსიკურია, ის ანელებს მათ გამრავლებას და ზღუდავს საფუარების პროდუქტიულობას. გლუკოზას კონცენტრაციის მატება აჩქარებს გლიკოლიზს, რასაც მივყევართ ატფ-ის მნიშვნელოვანი რაოდენობის წარმოქმნასთან (სინთეზთან) სუბსტრატული ფოსფორილირების გზით. ეს ამცირებს ჟანგვით ფოსფორილირებაზე მოთხოვნილებას, რომელიც ლიმონმჟავა (კრებსის) ციკლიდან ელექტრონების

გადატანის საშუალებით მიმდინარეობს და, შესაბამისად, ამცირებს ჟანგბადზე მოთხოვნილებას (Petrik, Kappeli, and Fiechter 1983).

2.2.4. კუსტერის ეფექტი (Custer Effect)

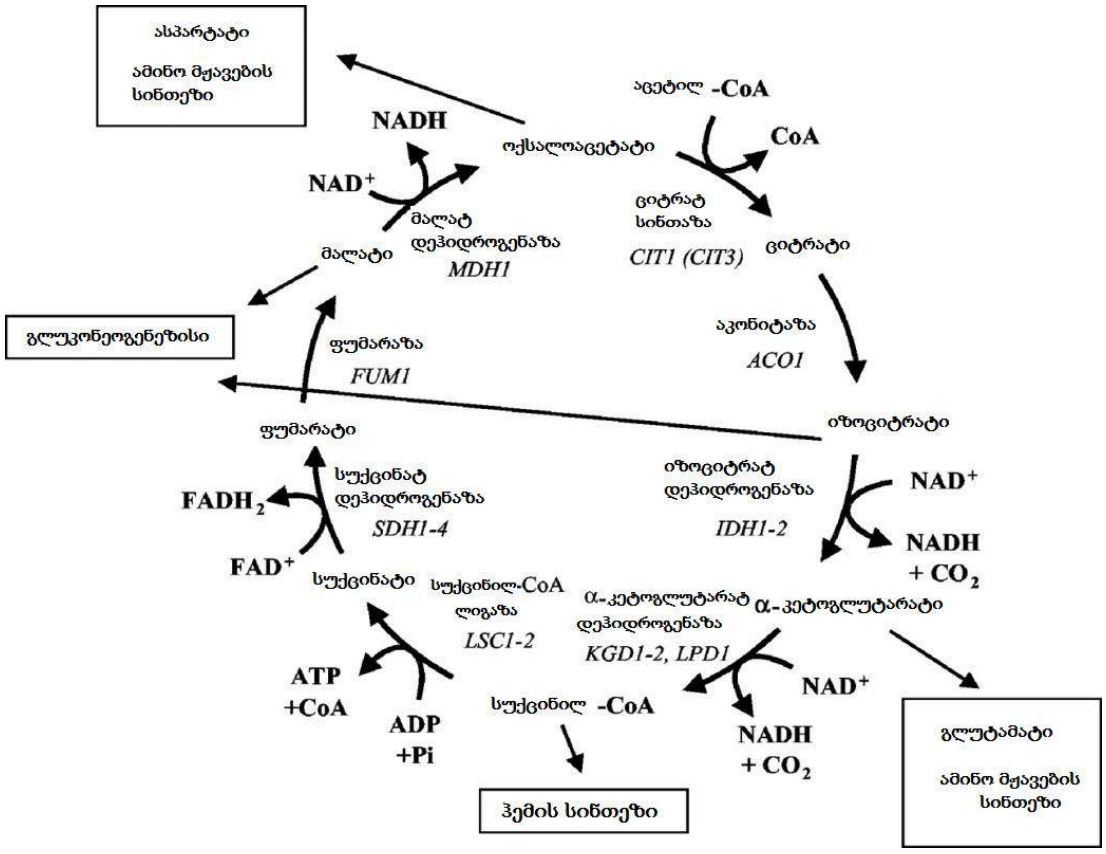
კუსტერის ეფექტი ცნობილია, როგორც ალკოჰოლური ფერმენტაციის ინჰიბირება ჟანგბადის არარსებობისას. კუსტერის ეფექტი - ჟანგბადის არსებობისას, ე.ი. აერობულ პირობებში, ზოგიერთი საფუარი Brettanomyces და Dekkera წარმომადგენლები გლუკოზას ფერმენტულად გარდაქმნიან სპირტში (ეთანოლი) და ძმარმჟავაში (Wijsman et al. 1984; Dijken and Scheffers 1986). მაგრამ ანაერობულ პირობებში გადასვლისას ფერმენტული პროცესები (ფერმენტაცია) მკვეთრად ინჰიბირდება. თვლიან, რომ კუსტერის ეფექტი გამოწვეულია რედუქტიული სტრესით (ე.ი. აღმდგენელი ნაერთების გლუტათიონის და NADH-ის დიდი რაოდენობა საფუარებში).

2.2.5. პირუვატიდან აცეტილ-CoA-მდე

როგორც ავღნიშნეთ საფუარებში S. cerevisiae გლუკოზის უჯრედგარე კონცენტრაცია აკონტროლებს სუნთქვასა და ფერმენტაციას შორის გადასვლის პროცესს. მიუხედავად იმისა, რომ წარმოქმნილი ეთანოლის მნიშვნელოვანი ნაწილი საერთოდ არ არის წარმოდგენილი კრაბტრის ნეგატიურ საფუარებში აერობულ პირობებში (DE DEKEN 1966; González Siso, Freire Picos, and Cerddn 1996), საფუარების სახეობები როგორიცაა Pichiaanomala, C utilis და Kluyveromyceslactis, აერობულ პირობებში და გლუკოზას მაღალი კონცენტრაციისას (ექსპონენციალური ზრდის ფაზის დროს) დროის გარკვეულ პერიოდში წარმოქმნიან ეთანოლს. ნაჩვენებია, რომ ეს დროებითი წარმოქმნა ძირითადად დამოკიდებულია არაადექვატურ აერაციაზე (Kiers et al. 1998).

2.2.6. ტრიკარბონის მჟავების გზა

ტრიკარბონის მჟავების (ლიმონმჟავა, კრებსის) ციკლის გზა - როგორც ჩანს, ტრიკარბონის მჟავების ციკლის მიმდინარეობა ორ საფეხურიან მოდელამდე დადის, რომელიც აერთიანებს ორ სუბსტრატს (ოქსალოაცეტატს და α-კეტოგლუტარატს) და მათი ტრანსამინირების პროდუქტებს (გლუტამატს და ასპარტატს) (Yudkoff et al. 1994; Rustin et al. 1997) (სურ. 6). ეს მოდელი შესაბამისობაშია საფუარებში ტრიკარბონის მჟავების ციკლის პირველი სამი ფერმენტის უნიკალურ რეგულაციასთან (McCammon et al. 2003).



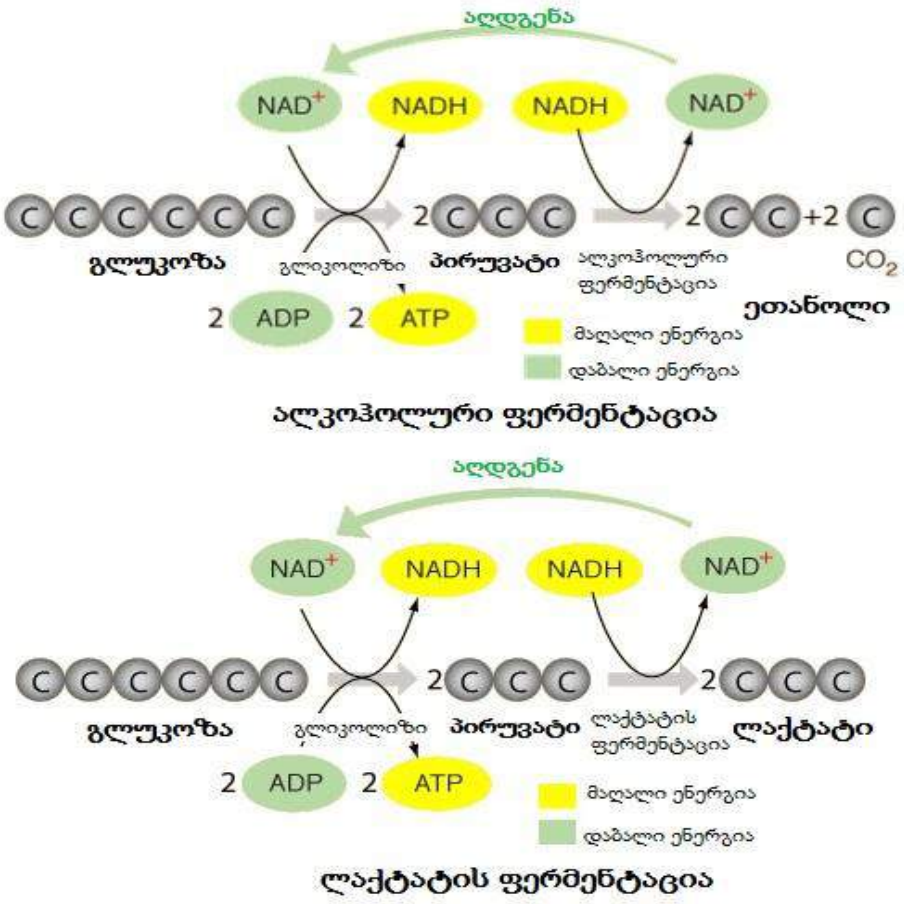
სურათი 6. საფუარის ტრიკარბონის მჟავას ციკლი.

2.2.7. ჟანგვითი ფოსფორილირება

მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორილირება წარმოადგენს რთულ და მაღალ კონტროლირებად ჯაჭვს, რომლის საშუალებით ატფ-ის სინთეზი მუდმივად ადაპტირდება ენერგიის მოთხოვნილების ცვლილებებისადმი, რომელიც საჭიროა ზრდის და ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისთვის. რესპირატორული (სუნთქვითი) ცვლის დროს როგორც ციტოზოლური ასევე მიტოქონდრიული NADH ხელმეორედ იჟანგება სუნთქვით ჯაჭვში. მაგრამ S. cerevisiae, სხვა მრავალი ეუკარიოტული უჯრედებისაგან განსხვავებით, ასევე სხვა სახეობის საფუარებიც, განიცდიან მრავალკომპონენტიანი I კომპლექსის ტიპის NADH-დეჰიდროგენაზას უკმარისობას (Nosek and Fukuhara 1994). ამ ფერმენტის მაგივრად S. cerevisiae-ში წარმოადგენილია ერთსუბერთეულიანი NADH:უბიქინონ-ოქსიდორედუქტაზა, რომელიც აკავშირებს ინტრამიტოქონდრიულ NADH-ის დაჟანგვას სუნთქვით ჯაჭვთან. ეს ფერმენტი (რომელსაც აკოდირებს NDI1), რომელსაც "მიტოქონდრიის შიგნითა NADH-დეჰიდროგენაზას" უწოდებენ, აკატალიზებს ორი ელექტრონის გადატანას შიგნითა მიტოქონდრიული NADH-დან, უბიქინონზე (VRIES and GRIVELL 1988; Marres, de Vries, and Grivell 1991).

ამის გარდა, საფუარების მიროქონდრიები, მცენარეების მიტოქონდრიების მსგავსად (Moller, Rasmusson, and Fredlund 1993), შეიცავენ არა მხოლოდ შიგნითა მიტოქონდრიულ NADH-დეჰიდროგენაზას, არამედ აქვთ გარეთა მიტოქონდრიული NADH-დეჰიდროგენაზას აქტივობა (Jagow and Klingenberg 1970). S. cerevisiae-ს აქვს ორი გენი, რომელიც აკოდირებს გარეთა მიტოქონდრიულ NADH-დეჰიდროგენაზას იზოფერმენტებს, NDE1 და NDE2, ორივე წარმოადგენს ტიპიურ აერობულ პირობებში ექსპრესირებად გენებს (Luttik et al. 1998; Small and McAlister-Henn 1998). როგორც შიგნითა მიტოქონდრიულ NADH-დეჰიდროგენაზა, გარეთა იზოფორმები არ ახდენენ პროტონების გადაქაჩვას (Jagow and Klingenberg 1970). ამიტომ S. cerevisiae-ს გააჩნია ჟანგვითი ფოსფორილირების დაბალი ატფ-სტექიომეტრია. მიუხედავად ჟანგვითი ფოსფორილირების დაბალი სტექიომეტრიისა, გლუკოზას მოლეკულის სრული რესპირატორული დისიმილაცია გვაძლევს დაახლოებით 16 მოლეკულა ატფ-ს (ოთხი მოლეკულა ატფ სუბსტრატული დონის ფოსფორილირებით- ორი გლიკოლიზიდან

და ორი კრებსის (ლიმონმჟავა) ციკლში წარმოქმნილი გტფ-დან) და დაახლიობით 12 მოლეკულა ატფ-ი ჟანგვითი ფოსფორილირებიდან. ეს რვაჯერ აჭარბებს ატფ-ის მაქსიმალურ გამოსავალს ალკოჰოლური ფერმენტაციით გლუკოზას დისიმილაციის დროს (სურ 7.).



სურათი 7. საფუარის ჟანგვითი ფოსფორილირება (აერობული სუნთქვა) და ლაქტატის ფერმენტაცია.

ატფ-ის მაღალი გამოსავალი შაქრების სუნთქვითი დისიმილაციის (აერობული) დროს ასახულია შაქრიანი ბიომასების კულტურების გამოსავალში: ტიპიური ბიომასის გამოსავალი, გლუკოზაზე რესპირატორული უჯრედების კულტურების ხუთჯერ მეტია, ვიდრე ფერმენტატული უჯრედების კულტურებისა (C Verduyn 1991). S. cerevisiae სუნთქვითი ჯაჭვის მეორე თავისებურება მდგომარეობს იმაში, რომ კომპლექსი bc1 ციტოქრომრედუქტაზა (III) და aa1 ციტოქრომოქსიდაზა (IV)

ერთიანდებიან დიდ სუპერკომპლექსებში (Schagger and Pfeiffer 2000). S. cerevisiae სუნთქვითი ჯაჭვი სხვა სოკოების და მცენარეების სუნთქვითი ჯაჭვისაგან განსხვავდება არა მხოლოდ NADH-დეჰიდროგენაზას არსებობით, რომელიც არაა დაკავშირებული პროტონულ ტუმბოსთან, არამედ ასევე ციანიდების მიმართ არამგძნობიარე ალტერნატიული ოქსიდაზას არარსებობით, რომელიც აკატალიზებს უბიქინონის პირდაპირ დაჟანგვას მოლეკულური ჟანგბადით, პროტონული მამოძრავებელი ძალის წარმოქმნის გარეშე (Vanlerberghe and McIntosh 1997).

ნანახია, რომ მიტოქონდრია წარმოადგენს ენერგიის გამანაწილებელ ძირითად სისტემას აერობული მეტაბოლიზმის დროს და რომ ენერგიის განაწილება შეიძლება რეგულირებულ იქნას მიტოქონდრიული ფერმენტების შემცირებით, ჟანგვითი ფოსფორილირების რეჟიმის შესანარჩუნებლად (Dejean et al. 2000).

მეტაბოლური გზების რეგულაციების ერთ-ერთ მექანიზმს წარმოადგენს სუნთქვითი ჯაჭვის ციტოქორომების რაოდენობის ცვლილება. აღნიშნული პროცესი რამდენიმე სასიგნალო მექანიზმით რეგულირდება, მათ შორის კარგად არის შესწავლილი HAP2/3/4 ტრანსკრიპციული ფაქტორების სისტემა, რომელიც ახდენს COX-ის გენის ექსპრესიის სტიმულირებას (Bourens et al. 2013) ჰიპოქსიურ პირობებში, აგრეთვე ნანახია ალტერნატიული სასიგნალო გზები, რომლებიც ახდენენ ჟანგვითი მეტაბოლიზმის მოდიფიცირებას ციტოქრომების რაოდენობის ცვლილების გზით - ORD1 და Rcf1 ცილოვანი ფაქტორები და მათთან დაკავშირებული აღმავალი სასიგნალო სისტემები.

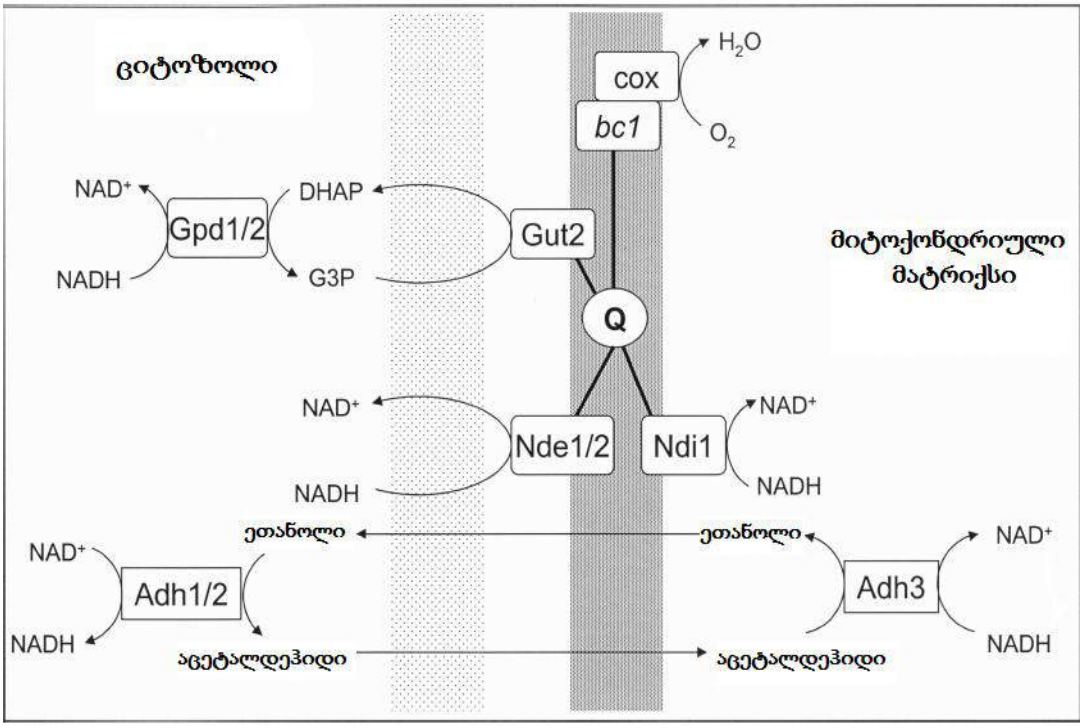
2.2.8. რედოქს ბალანსი

პირიდინ-ნუკლეოტიდური კოფაქტორები NAD+/NADH და NADP+/NADPH ცენტრალურ როლს თამაშობენ საფუარების მეტაბოლიზმში. NADH-ი უპირატესად გამოიყენება დისიმილაციურ პროცესებში, მაშინ როდესაც NADPH ჩვეულებრივ ასიმილაციურ პროცესებშია საჭირო (Dijken and Scheffers 1986). S. cerevisiae, C. utilis და სხვა საფუარებში ზოგადად NADH-ის და NADPH-ის ურთიერთკონვერტირება არ ხდება, რადგან ამ ორგანიზმებში არ არის წარმოდგენილი ტრანსჰიდროგენაზული

აქტივობა (P. M. Bruinenberg, Van Dijken, and Scheffers 1983). ჟანგვა-აღდგენითი ბალანსის შენარჩუნება ცოცხალი უჯრედებისთვის აუცილებელ პირობას წარმოადგენს, რათა მოხდეს მეტაბოლური აქტივობის რეგულაცია და ზრდის უზრუნველყოფა. იმას თუ გავითვალისწინებთ, რომ ბიოლოგიური მემბრანებში პირიდინნუკლეოტიდები ვერ გადიან, შესაბამისად, რედოქსი პოტენციალის შესანარჩუნებლად, აღდგენილი კოფერმენტები ხელმეორედ უნდა დაიჟანგონ იმ კომპარტმენტში სადაც მათი სინთეზი ხდება.

ციტოზოლური NADPH-ის წარმოქმნა პენტოზო-ფოსფატური გზის ჟანგვით ნაწილში ხდება, რომელიც გლიკოლიზში გლუკოზა-6-ფოსფატის დონეზე მიიღება. გარდა ამისა, $NADP^+$-დამოკიდებული იზოციტრატდეჰიდროგენაზას და $NADP^+$-დამოკიდებული აცეტალდეჰიდდეჰიდროგენაზას შეუძლიათ ხელი შეუწყონ NADPH-ის წარმოქმნას (P. M. Bruinenberg, Van Dijken, and Scheffers 1983; Minard et al. 1998). S. cerevisiae-ს არ შეუძლია პირდაპირ დააკავშიროს NADPH-ის დაჟანგვა სუნთქვით ჯაჭვთან (Peter M. Bruinenberg 1986) და ამიტომ არ შეუძლია პირდაპირ მოახდინოს ზედმეტი ციტოზოლური NADPH-ის დაჟანგვა. შედეგად, პენტოზოფოსფატური გზას, რომელიც წარმოქმნის ბიოსინთეზისთვის აუცილებელ NADPH-ს, არ ფუნქციონირებს, როგორც დისიმილაციის გზა S. cerevisiae-ში (González Siso, Freire Picos, and Cerddn 1996). გარდა ამისა, S. cerevisiae-ს შაქრის ფერმენტაციული დისიმილაციისას NADPH-ის როლი შეზღუდულია, რადგან ძირითადი ალკოჰოლდეჰიდროგენაზები მკაცრად NADH-დამოკიდებულნი არიან (Ciriacy 1979). მეორე მხრივ, მიტოქონდრიული NADPH დეჰიდროგენაზები, რომლებიც აუღლებენ ციტოზოლური NADPH-ის დაჟანგვას მიტოქონდრიის სუნთქვით ჯაჭვთან, მცენარეებში საერთოა, ამ ტიპის მიტოქონდრიული NADPH ოქსიდაზური აქტივობა ნანახია C. utilis -ში (Peter M. Bruinenberg 1986; Van Urk et al. 1989) S. cerevisiae-სგან განსხვავებით (de Vries and Marres 1987; Van Urk et al. 1989; Small and McAlister-Henn 1998). S. cerevisiae-ს გააჩნია რამოდენიმე მექანიზმი NADH-ის განმეორებით დასაჟანგავად, რომლის დახმარებით ხორციელდება ნივთიერებათა ცვლა (Bakker et al. 2001). NAD+-ის აღდგენა მიმდინარეობს როგორც ციტოზოლში გლიკოლიზით, ასევე მიტოქონდრიაში (PDH) პირუვატ-დეჰიდროგენაზული კომპლექსით და კრებსის ციკლის დეჰიდროგენაზებით. ორივე გზით NADH-ის

მარაგი შეიძლება დაიჟანგოს მიტოქონდრიის სუნთქვით ჯაჭვში ჟანგბადით, რომელიც ელექტრონების საბოლოო აქცეპტორად გვევლინება (de Vries and Marres 1987; Luttik et al. 1998; Overkamp et al. 2000; Bakker et al. 2001).



სურათი 8. რედოქს ბალანსის სქემა Saccharomyces cerevisiae-ის საფუარის უჯრედებში.

NADH-ის განმეორებით დაჟანგვის ორ სისტემას შორის რეგულაცია ასევე განხილული უნდა იყოს, როგორც გლუკოზის კატაბოლური დათრგუნვა, განსაკუთრებით S. cerevisiae-ს შემთხვევაში. გლუკოზის მაღალი კონცენტრაციის პირობებში სუნთქვა მხოლოდ ნაწილობრივაა დათრგუნული (Blomberg, Larsson, and Gustafsson 1988; K Larsson et al. 1998).

ამ პირობებში ციტოზოლური ჟანგვა აღდგენითი ბალანსი მნიშვნელოვან წილად აღდგება ეთანოლის და გლიცეროლის წარმოქმნის გზით, თუმცა მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანის NADH-დეჰიდროგენაზას აქტივობით შეიძლება აიხსნას გლიცეროლის მცირე რაოდენობით წარმოქმნა აერობული პროცესის დროს ანაერობულ S. cerevisiae კულტურებთან შედარებით (Rigoulet et al. 2004). მეორეს მხრივ, ანაერობული ზრდის დროს გლუკოზას დაბალი კონცენტრაციების პირობებში კულტივირებისას, გარეთა NADH-დეჰიდროგენაზა და გლიცერო-3-ფოსფატური

მექანიზმები თითქოს ერთდროულად მოქმედებენ (Rigoulet et al. 2004) (სურ 8.), მაგრამ ამ პირობებში უფრო მნიშვნელოვანია NADH-დეჰიდროგენაზული აქტივობა.

2.2.9. ნივთიერებათა ფაკულტატური ან ობლიგატურ-ფერმენტული ანაერობული მეტაბოლიზმი

საფუარების ზემოთ ხსენებულ ტიპებში მხოლოდ ორს გააჩნია ინტენსიურად ფუნქციონირებადი გზა, რომელიც უზრუნველყოფს თავისუფალი ენერგიის ტრანსლიაციას ანაერობული ზრდისას. ალკოჰოლური ფერმენტაცია მიღებულია როგორც გლუკოზის კატაბოლიზმი ეთანოლამდე. ალკოჰოლური ფერმენტაციის სტექიომეტრიის მიხედვით, 2 მოლეკულა ატფ-ი წარმოიქმნება ერთი გლუკოზის მოლეკულის ეთანოლში გარდაქმნით, რომელიც წარმოადგენს ძირითად ენერგიის წყაროს ზრდისა და ჰომეოსტაზისათვის. გარდა ამისა, ალკოჰოლური ფერმენტაცია წარმოადგენს ჟანგვა-ნეიტრალიზაციის პროცესს, რადგან NADH, წარმოქმნილი 3-ფოსფოგლიცერატის ფოსფალდეჰიდროგენაზით დაჟანგვისას, შემდგომში ხელმეორედ იჟანგება ფერმენტ ალკოჰოლდეჰიდროგენაზით აცეტალდეჰიდის აღდგენით ეთანოლამდე (Dijken and Scheffers 1986). მაგრამ არ შეიძლება დავივიწყოთ, რომ ზრდა დაკავშირებულია ანაბოლურ პროცესებთან, ხოლო საფუარებს გააჩნიათ საერთო ბიომასის შემადგენლობა, რომელიც უფრო მეტადაა შემჟავებული, ვიდრე იმ ნაერთების სინთეზი, როგორიცაა გლუკოზა, რაც გულისხმობს, რომ ანაბოლურ პროცესებს იწვევენ აღმდგენელი ექვივალენტების სიჭარბეს.

აერობული პირობებისაგან განსხვავებით, ჟანგბადის არარსებობა შეუძლებელს ხდის აღდგენილი პირიდინნუკლეოტიდების შესაძლო დაჟანგვას სუნთქვით ჯაჭვში, რაც შეუღლებულია ჟანგვით ფოსფორილირებასთან. ზრდის პროცესში რედოქსი ბალანსის შენარჩუნების ერთ-ერთ გავრცელებულ გზას წარმოადგენს გლუკოზისა და გლიცერინის მეტაბოლიზმის განცალკევება. გლიცეროლი წარმოიქმნება გლიკოლიზის შუალედური პროდუქტის დიჰიდროქსიაცეტონფოსფატის აღდგენით 3-ფოსფოგლიცერინამდე, მისი შემდგომი დეფოსფორილირებით გლიცეროლამდე. პირველ სტადიას აკატალიზებს NAD+-დამოკიდებული გლიცერილ-3-

დეჰიდროგენაზა (კოდირებულია ორი იზოგენით GPD1 და GPD2), მაშინ როდესაც მეორე რეაქცია კატალიზდება 3-გლიცეროფოსფატაზის აქტივობით (კოდირებულია GPP1 და GPP2 გენებით) (Eriksson et al. 1995; Katrin Larsson et al. 1993; Norbeck et al. 1996).

შედეგად, გლიცეროლის ბიოსინთეზი თამაშობს ფიზიოლოგიურ როლს S. cerevisiae-ის მეტაბოლურ ადაპტაციაში. გლიცერინის წარმოქმნასა და ანაერობულ პირობებში ზრდას შორის კორელაცია ნათლადაა ნაჩვენებია ანაერობული დეფექტების აღდგენის დროს, ზრდის მეტაბოლიტების მიერ გლიცერინის წარმოქმნის დარღვევაში, ელექტრონების აქცეპტორების აცეტოინის (3-ჰიდროქსი-2-ბუტათიონი) და აცეტალდეჰიდის თანაობისას. ეს ორი ნაერთი აადვილებს უჯრედულ აღდგენით სტრესს, რადგანაც ისინი ფერმენტულად ჟანგავენ შიდაუჯრედულ NADH-ს NAD-მდე მეორეს მხრივ საფუარების რამოდენიმე სახეობა S. cerevisiae-ის ჩათვლით, ცნობილია ძმარმჟავას პროდუცირების შესაძლებლობებით, როგორც აერობულ ასევე ანაერობულ პირობებში. S. cerevisiae-ში ძმარმჟავას შემდგომი მეტაბოლიზმი აცეტილ-CoA სინთეტაზას (კოდირებული გენებით ACS1 და ACS2) მეშვეობით წარმოადგენს ერთადერთ წყაროს ციტოზოლური აცეტილ-CoA-სთვის, რომელიც იმპერატიულად წარმოადგენს ცხიმოვანი მჟავების სინთეზში მთავარ სამშენებლო ბლოკს (Van den Berg and Steensma 1995; Flikweert et al. 1996). როდესაც აცეტალდეჰიდი გარდაიქმნება ძმარმჟავაში, მიიღება ორი ჭარბი აღმდგენელი ექვივალენტი. ასეთი პროდუქტის წარმოქმნა დამატებით პრობლემას ქმნის ჟანგვა-აღდგენით ბალანსში, კიდევ ერთხელ გლიცერინის წარმოქმნის გვერდის ავლით. იმ შემთხვევაში თუ საფუარი ვერ უმკლავდება ჭარბ აღმდგენელ ექვივალენტებს ანაერობული აქტივობა შეჩერდება. ანაბოლური თვალთახედვით, როდესაც აცეტალდეჰიდი გარდაიქმნება აცეტატში, NADPH წარმოიქმნება.

ფერმენტაციის დროს, ლიმონმჟავა ციკლის გზასაც ორგანული მჟავების წარმოქმნასთან მივყავართ, ძირითადად ციტრატის, მალატის და სუქცინატის (Heerde and Radler 1978) და სხვადასხვა პროდუქტის გამოსავლის მიხედვით არსებობს განსხვავება თუ როგორ გაუმკლავდება უჯრედი ჟანგვა-აღდგენითი ბალანსის რეგულაციას. აზოტის წყარო ძლიერ მოქმედებს უჯრედის მეტაბოლიზმზე და S. cerevisiae-ში პროდუქტების წარმოქმნაზე, განსაკუთრებით ანაერობულ პირობებში

რედოქსი კონტურის ბალანსირების გამო (Albers et al. 1996). NADPH-ზე მაღალი მოთხოვნილება აუცილებელია გლუტამატის წარმოქმნისათვის, როდესაც უჯრედები ამონიუმს იყენებენ აზოტის ერთადერთ წყაროდ. ამის საპირისპიროდ, როდესაც გლუტამატი გამოიყენება აზოტის წყაროდ გლუკოზადან წარმოქმნილ 2-ოქსოგლუტარატს მივყევართ ადგენითი ექვივალენტების რაოდენობის დაკლებასთან, რაც ამცირებს გლიცერინის გამოსავალს და შესაბამისად ზრდის ეთანოლის წარმოქმნას (Albers et al. 1996; Camarasa, Grivet, and Dequin 2003).

2.2.10. საფუარების ზრდის შესაძლებლობა ანაერობულ პირობებში

678 აღწერილი სახეობიდან, ტაქსონომიური ტესტების საფუძველზე (ტაქსონომიური ტესტი ასახავს გაზის წარმოებას Durham-ის მილებში) 60% ითვლება ფერმენტატულ სახეობად (J. A. Barnett 2000). მაგრამ ეს რიცხვი უფრო მაღალია, რადგან გარკვეულ პირობებში ზოგიერთი ეს სახეობა, რომელიც ითვლება არაფერმენტატულებად, ასევე ამჟღავნებს გლუკოზას ფერმენტირების უნარს (Dijken and Scheffers 1986; Visser et al. 1990). თუმცა შეზღუდული ჟანგბადის პირობებში გლუკოზის ფერმეტაციის უნარი საერთო თვისება აღმოჩნდა სხვადასხვა სახეობის საფუარებისთვის; როგორც ჩანს, ზრდის უნარი ანაერობულ პირობებში არ ვრცელდება ამ მიკროორგანიზმებზე (Visser et al. 1990). ფაქტიურად, საფუარების სახეობების მხოლოდ ძალზედ მცირე რაოდენობას აქვს ამ პირობებში სწრაფად ზრდის უნარი, ხოლო S. cerevisiae გამოირჩევა როგორც საფუარი, რომლებიც მიჩნეულია ფაკულტატურ ანაერობებად (C. Verduyn et al. 1990; Visser et al. 1990). საყოველთაოდაა მიღებული, რომ ფაკულტატურ ანაერობებს შეუძლიათ იზრდებოდნენ როგორც ანაერობულ ისე აერობულ პირობებში, შესაბამისად ელექტრონების საბოლოო აქცეპტორის სახით იყენებენ მოლეკულური ჟანგბადის ან სხვა ნაერთის აღმდგენ ექვივალენტებს, რომლებიც ჭარბადაა მიღებული ანაბოლური პროცესებიდან. რადგანაც ანაერობული ზრდა დაკავშირებულია ენერგიის დაბალ გამოსავალთან სრული დაჟანგვის პროცესებთან შედარებით, ამ მიკროორგანიზმებს გააჩნიათ ორი საერთო მახასიათებელი: 1. შაქარ-სუბსტრატის მოხმარების სიჩქარე

უფრო მაღალია ანაერობულ პროცესებში ვიდრე აერობულ პირობებში და 2. ჟანგბადი გამოიყენება როგორც უპირატესი წყარო ელექტრონების საბოლოო აქცეპტორისა.

როგორც ნათლად აჩვენა ლაგუნასმა თავის ნაშრომებში (R. Lagunas 1979; Rosario Lagunas 1981; Rasario Lagunas 1986), S. cerevisiae-ს შესაძლოა მიახლოებით შეესაბამებოდეს ზემოთ აღწერილ კრიტერიუმებს. მიუხედავად იმისა, რომ S. cerevisiae-ს აქვს სწრაფი ანაერობული ზრდის უნარი, ის მოითხოვს გარემოდან საკვებს სტეროლების და ცხიმოვანი მჟავების სახით (C. Verduyn et al. 1990).

ბიოსინთეზური გზები, რომლებიც მონაწილეობენ ამ ნივთიერებების წარმოქმნაში და აუცილებელი არიან მემბრანული პროცესებისთვის, მოითხოვენ მოლეკულურ ჟანგბადს (ANDREASEN and STIER 1953; Andreasen and Stier 1954). საჭიროა აღინიშნოს, რომ ამ სახეობით გლუკოზას, მალტოზას ან ფრუქტოზას მხოლოდ 5-10% არ მეტაბოლიზირდება აერობული ზრდის დროს ალკოჰოლური ფერმენტაციით. შეფარდება შაქრების მოთხოვნილებაზე აერობულ და ანაერობულ პირობებში შეადგენს შესაბამისად 1.05, 0.90 და 1.08 (R. Lagunas 1979). საბოლოო ანგარიშით სიჩქარის მნიშვნელობა ახლოსაა 1-თან, რაც ნიშნავს, რომ პასტერის ეფექტი არ წარმოიქმნება ზემოთ აღწერილი შაქრების მეტაბოლიზმის დროს.

მიუხდავად ამისა, ბიოსინთეზური ჟანგბადის მოთხოვნილება ფაკულტატურ-ფერმენტატულ საფუარებში ძალზედ მცირეა. ამიტომ საფუარების სახეობების სანდო და მნიშვნელოვანი იდენტიფიკაციისთვის და მკაცრად ანაერობულ პირობებში შემდგომი მათი გაზრდა-გამოყვანისთვის, აუცილებელია სპეციალური უსაფრთხოების ზომების გატარება ზრდის პროცესის მიმდინარეობისას, რათა მინიმიზირებული იქნას ჟანგბადის შეღწევა იმ რაოდენობით, რომლის დროსაც ჟანგბადზე ეს მცირე მოთხოვნილებაც კი აშკარა ხდება (Visser et al. 1990; Rodrigues et al. 2001). თუმცა ზოგიერთ შემთხვევებში მოლეკულურ ჟანგბადზე მოთხოვნილება შეიძლება იყოს საკმაოდ მაღალი, მაშინ როდესაც, ჟანგბადის უმნიშვნელო გაჟონვა 0.3 და 6 მმოლ-ს შორის O_2 h^{-1}-ის რაოდენობა, შეესაბამება ნორმალურად მკაცრ ანაერობულ პირობებს. ეს პირობები საკმარისია Zygosaccharomyces bailii და C. utilis საფუარების ზრდისთვის (Rodrigues et al. 2001). ზრდის კინეტიკის ხაზობრიობის მოუხედავად, რომელიც დამახასიათებელია ჟანგბადის შეზღუდვისთვის, C. utilis ითხოვს 1,5-ჯერ მეტ დროს, ვიდრე Z. bailii უჯრედის პროლიფერაციის

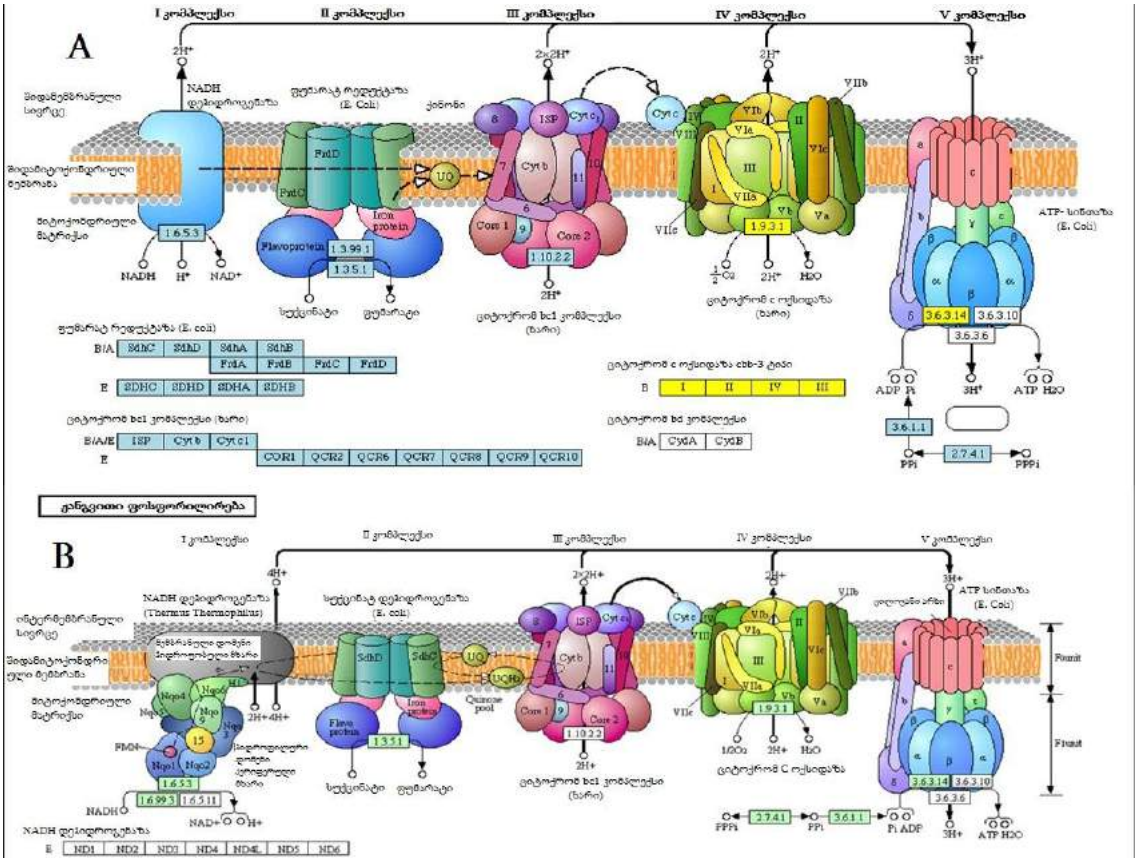
დასრულებისთვის, რაც ხაზს უსვამს ორივე სახეობის საფუარებში ზრდისთვის აუცილებელ ჟანგბადის მოხმარებაში განსხვავებას.

ანაერობულ პირობებში აერობულისაგან განსხვავებით ლიმონმჟავა (კრებსის) ციკლს გააჩნია მხოლოდ ანაბოლური ფუნქცია და უჯრედების ზრდა მთლიანად დამოკიდებულია ეთანოლის წარმოქმნაზე ენერგიის უზრუნველსაყოფად. თეორიულად შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ საფუარების ზოგიერთი სახეობისთვის გლიკოლიზური გზა არასაკმარისია უჯრედული პროცესების თავისუფალი ენერგიით უზრუნველსაყოფად. აჩვენეს, რომ (Cornelis Verduyn et al. 1992) S. cerevisiae-ის ფერმენტაციის სიჩქარე ზღუდავს ატფ-ის მიწოდებას სხვადასხვა მიზნებისათვის უჯრედში დაახლოებით 17 მმოლ ატფ-მდე Eq g^{-1} h^{-1}. მაგრამ, როდესაც მოთხოვნა მოხმარებაზე იზრდება ზღვრულ მნიშვნელობამდე (მაგ. ეფექტი, რომელიც გამოწვეულია სუსტი კარბონის მჟავების დაშლით ან ზრდის არის (მედიუმის) pH არის 2,8-ზე ნაკლები), გლიკოლიზური მიმართულება ვეღარ უზრუნველყოფს დამატებით ატფ-ს, რასაც მივყევართ ციტოპლაზმის შემჟავებამდე და უჯრედის შემდგომ დაღუპვამდე (C. Verduyn et al. 1990).

აუცილებელია აღინიშნოს, რომ წინამდებარე მოსაზრებები არ არის დაკავშირებული საფუარებში კასტერის ეფექტთან, რომელიც ახასიათებს ფერმენტაციის ინჰიბირებას ანაერობულ პირობებზე გადასვლისას. მეორე მხრივ, მიტოქონდრიული ტრანსლოკაციის ადფ/ატფ დარღვევამ ჟანგბადის არარსებობის პირობებში შეიძლება გამოიწვიოს ზრდის შეჩერება. S. cerevisiae-ში ნაჩვენებია, რომ ადფ/ატფ ტრანსლოკატორების ბლოკირება ბონგკრეკინის მჟავით იწვევდა ზრდის შეჩერებას დაახლოებით 50%-ით ანაერობულ პირობებში (Visser et al. 1994). გარდა ამისა, S. cerevisiae კულტივირებისას აღმდგენი ექვივალენტების სიჭარბე, რომლებიც წარმოქმნილნი არიან ანაბოლური რეაქციებისას, გლიცერინის წარმოქმნით უნდა იყვნენ ბალანსირებულნი, რაც დაახლოებით 5% გლუკოზას დაშლის ტოლფასია. ამიტომ ჟანგვა-აღდგენითი ცვლის დარღვევა ზოგიერთ შემთხვევებში რჩება გადაუჭრელ გამოცანად. ამიტომ სამეცნიერო ძალისხმევა უნდა იყოს მიმართული კომპლექსურ მიდგომაზე, რაც გამოიხატება ურთიერთშემავსებელი მიდგომების - საფუარების ფიზიოლოგიის და მოლეკულური ბიოლოგიის შესწავლის სტიმულირებაზე და ამით საფუარებზე ცოდნის გაღრმავებაზე.

2.2.11. საფუარის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურებები

საფუარის სახეობას *Saccharomyces cerevisiae* არ გააჩნია პირველი კომპლექსი, ამის ნაცვლად იგი შეიცავს ერთი სუბერთეულისაგან შემდგარ როტენონ-არამგრძნობიარე NADH:უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზას (Ndi1p), რომელიც არ არის ინკორპორირებული მიტოქონდრიულ მემბრანაში და შესაბამისად არ შეუძლია პროტონების გადატუმბვა (სურ. 9). Ndi1p უზრუნველყოფს ელეტრონების გადაცემის ალტერნატიულ გზას NADH-დან პირდაპირ სუნთქვით ჯაჭვზე. ეს ფერმენტი აკატალიზებს ორი ელექტრონის გადაცემის რეაქციას, რომელსაც უბისემიქინონის ფორმაციის გარეშე ახდენს, ამცირებს ელექტრონების გაჟონვას, და შესაბამისად ROS-ის გენერაციას. ფერმენტის NADH-დეჰიდროგენაზეური აქტივობა არ ითრგუნება I კომპლექსის ინჰიბიტორის - როტენონის დამატებით.



სურათი 9. საფუარის ორ სხვადასხვა შტამში არსებული სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსები. (A) - საფუარის შტამები რომელთაც გააჩნიათ ხუთივე, სრულყოფილი სუნთქვითი ჯაჭვი (მაგ. Candida Utilis), (B) - საფუარის იმ შტამების სუნთქვითი ჯაჭვი (Saccharomyces cerevisiae), რომელთაც პირველი კომპლექსის ნაცვლად გააჩნიათ NADH:უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზა (Ndi1p).

ნაჩვენებია, რომ ამ როტენონ-არამგრძნობიარე NADH-უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზის (NDI1) გენის გადასმა *Saccharomyces cerevisiae* თაგვის და ვირთაგვის მიტოქონდრიაში, განაპირობებს მის აქტიურ ექსპრესიას და ფუნქციურად გამართული ფერმენტის სინთეზს. ამ გენის ექსპრესია მნიშნელოვნად ამცირებს ROS-ის რაოდენობას დოფამინის და თიროზინჰიდროქსილაზას, ასევე დოფამინის ტრანსპორტერების დეფიციტს 1-მეთილ-4-ფენილ-1,2,3,6-ტეტრაჰიდროპირიდინით (MPTP) გამოწვეული ქრონიკული პარკინსონის დაავადების მქონე ვირთაგვების სტრიატუმში. გარდა ამისა, ნაჩვენებია მოტორული აქტივობის გაუმჯობესება, რაც მიგვითითებს ამ ფერმენტის შესაძლო თერაპიულ პოტენციალზე პარკინსონის დაავადების და I კომპლექსის დისფუნქციით გამოწვეული სინდრომების მკურნალობაში (Barber-Singh et al. 2009).

უკანასკნელ წლებში ლიტერატურაში დაგროვდა მონაცემები მცენარეული წარმოშობის პოლიფენოლური ნაერთების მსგავსი თერაპიული ეფექტის შესახებ (Yabuki et al. 2014) რამაც განაპირობა მათ ზუსტი მოლეკულური სამიზნეების იდენტიფიკაციის ინტენსიური კვლევა. ამ თვალსაზრისით, განსაკუთრებულ ინტერესს წარმოადგენს ციტრუსის ფლავონოიდი ნობილეტინი.

თავი 3. ფლავონოიდები

3.1. ფლავონოიდების ზოგადი დახასიათება

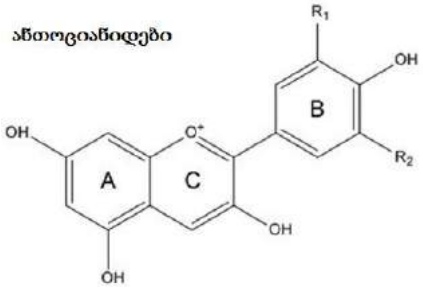
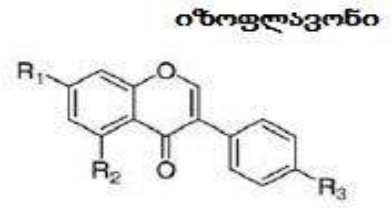
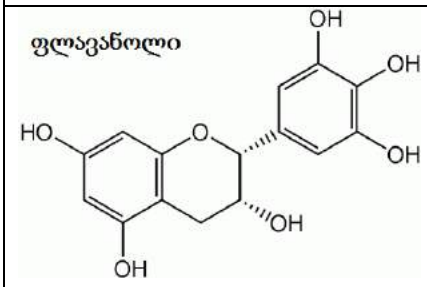
ფლავონოიდები - ფენოლური ნაერთების მრავალარიცხოვანი ჯგუფია, რომელშიც გაერთიანებულია როგორც წყალში სხნადი, ასევე ლიპოფილური ბუნებრივი ნაერთები. ფლავონოიდები წარმოადგენენ ჰეტეროციკლურ ჟანგბადშემცველ ნივთიერებებს, რომელთა ძირითად ბირთვს შეადგენს 3 ნახშირბადიანი ფრაგმენტით დაკავშირებული ორი ბენზოლის რგოლი (C_6-C_3-C_6 ჯაჭვი) და ცენტრალური პირანის რგოლის ნაჯერობის და გახსნის ხარისხის მიხედვით ძირითადად განასხვავებენ შემდეგ ჯგუფებს: ფლავონები, ფლავონოლები, იზოფლავონები, ფლავონოლები, ფლავონონები და ფლავანონოლები (სურ. 10) (Elliott Middleton and Kandaswami 1994; Harborne and Williams 2000).

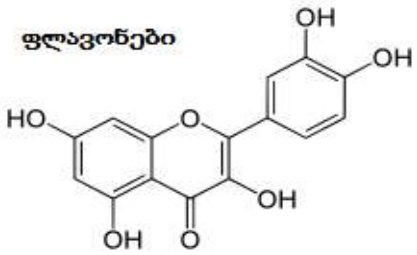
ფლავონოიდები წარმოადგენენ მცენარიდან მიღებულ პოლიფენოლების ნაერთების ოჯახს, რომლებიც გავრცელებულია ხილსა და ბოსტნეულში, ამიტომ რეგულარულად მოიხმარება ადამიანის დიეტაში. ფლავონოიდები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ მცენარეების მეტაბოლიზმში და ფართოდ გავრცელებულნი არიან უმაღლეს მცენარეებში. ფლავონოიდების მრავალფეროვნება ნაწილობრივ შეიძლება აიხსნას მათი შაქრებთან დაკავშირებულ მდგომარეობაში არსებობით. შაქრის ნაშთი შეიძლება იყოს მონოსაქარიდი - გლუკოზა, გალაქტოზა, ქსილოზა, ან სხვა დი-, ტრი- ან ტეტრასაქარიდი.

მცენარეებში ფლავონოიდები მონაწილეობენ ფოტოსინთეზის სინათლის ფაზაში და ახდენენ ელექტრონთა ტრანსპორტის კატალიზს (Das 1994). ისინი ძირითადად სინთეზირდებიან არომატული ამინომჟავებიდან - ფენილალანინისა და თიროზინისაგან (W. Heller and G. Forkmann 1993).

ფლავონოიდების ძირითად წყაროს საკვებში წარმოადგენენ ციტრუსები (მათი ცედრა/კანი), კენკროვანი მცენარეები, ხახვი, მწვანე ჩაი, წითელი ღვინო, ქაცვი, შავი შოკოლადი და ა.შ. ფლავონოიდები დიდი რაოდენობით გვხვდება ხილში, ბოსტნეულში, ჩაიში და ღვინოში (Ross and Kasum 2002). მცენარეებში მათ რამდენიმე

მნიშვნელოვან ფუნქცია გააჩნიათ, როგორიცაა მაგ. დამაზიანებელი ულტრაიისფერი გამოსხივებისაგან დაცვა, მცენარეთა პიგმენტაცია (Pollastri and Tattini 2011). ფლავონოიდების უმეტესობა განაპირობებს ყვავილის, ნაყოფისა და ფოთლების მომხიბვლელ შეფერილობას (de Groot and Rauen 1998).

ფლავონოიდები	მათი საკვები წყარო
	წითელ და იისფერ ხილში, ასევე ბოსტნეულში (კენკრა, წითელი კომბოსტო, ყურძენი, ალუბალი)
	სოიოს პროდუქტები, პარკოსნები (სოიო, სოიოს რძე, ტოფუ (იაპონური სოიოს ხაჭო), ტემპე (სოიოს ინდონეზიური კერძი).
	წითელი ღვინო, შოკოლადი, შავი და მწვანე ჩაი.
	ციტრუსის ხილი (ფორთოხალი, გრეიფრუტი, მანდარინი, ლიმონი).

	ნიახური, ოხრახუში, ველური თავშავა.
	ხახვი, კოჭა, ბროკოლი, სატაცური, მწვანილი.

ცხრილი 1. ფლავონოიდების კლასები და მათი წყაროები საკვებ პროდუქტებში (Egert and Rimbach 2011).

ამჟამად ბუნებაში იდენტიფიცირებულია და დახასიათებულია 4000-ზე მეტი ფლავონოიდი. მათ შორის, განსაკუთრებული ინტერესი ექცევა ციტრუსების ნაყოფებიდან მიღებულ ფლავონოიდებს და მათ მეტაბოლიტებს, რომლებიც მნიშვნელოვანი ბიოლოგიური ეფექტით ხასიათდებიან. მათ შორის ანტისიმსივნური, ანტივირუსული, ანთების საწინააღმდეგო, ნეიროპროტექტორული და ათეროსკლეროზის საწინააღმდეგო მოქმედება. ეპიდემიოლოგიური შესწავლა მიუთითებს იმაზე, რომ ფლავონოიდების საკვებთან ერთად მოხმარება ამცირებს კიბოს და ქრონიკული დაავადებების განვითარების რისკს.

მრავალი სამკურნალო მცენარის ფლავონოიდები ამჟღავნებენ სიმსივნეების საწინააღმდეგო ფარმაკოლოგიურ ეფექტს, რომლებიც განპირობებულია სიმსივნური უჯრედების პროლიფერაციისა და სიმსივნის ინვაზიის დათრგუნვით (Kandaswami et al. 1991). ასევე ნანახია ფლავონოიდების გავლენა სიგნალის გადამცემი მოლეკულების აქტივაციაზე და მათ ექსპრესიაზე, რითიც აიხსნება მათი თერაპიული ეფექტის მოლეკულური მექანიზმი (Miyata et al. 2004).

ფლავონოიდებით მდიდარია ციტრუსის კანი, აქ ძირითადად წარმოდგენილია პოლიმეთოქსილირებული ფლავონოიდები, რომლებიც ძალიან იშვიათად გვხვდება

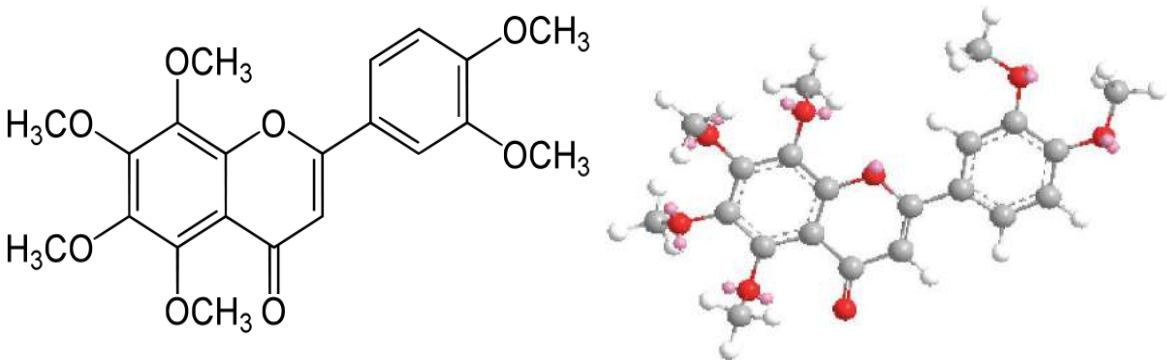
სხვა მცენარეებში. პოლიმეთოქსილირებული ფლავონოიდების მრავალი ფიზიოლოგიური ეფექტი მიუთითებს იმაზე, რომ მათ ძირითად მოლეკულურ სამიზნეს სხვადასხვა უჯრედშიდა ანტი- და პრო- აპოპტოზური სისტემები წარმოადგენს. ამ ნაერთების ანტისიმსივნური, ანთების საწინააღმდეგო და ნეიროპროტექტური მოქმედების ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები ცუდად არის შესწავლილი.

ეპიდემიოლოგიური კვლევებით ნანახი იქნა, რომ ციტრუსის ფლავონოიდების მიღება სასარგებლოა სიმსივნის პრევენციისათვის. ციტრუსები შეიცავენ რამდენიმე ქემოპრევენციულ აგენტებს, ესენია: ლიმონიდები და სხვა საგულე გლიკოზიდები, D-ლიმონენი, რამოდენიმე ფლავონოიდი როგორიცაა ჰესპერიდინი და გლიცეროგლიკოლიპიდი.

3.2. ნობილეტინი - ციტრუსის ფლავონოიდი

ნობილეტინი (3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone) გავრცელებული პოლიმეთოქსილირებული ფლავონოიდია, ნანახია მისი ანტიპროლიფერაციური ეფექტი სხვადასხვა სიმსივნური უჯრედების ხაზებში. ნობილეტინის ანტი-პროლიფერაციული ეფექტის გარდა აგრეთვე ახასიათებს ნეიროტროფული ეფექტიც, ვირთაგვის ფეოქრომოციტომურ უჯრედებში ამ ნაერთის მოქმედება იწვევს მორჩების წარმოქმნას და ნერვული უჯრედების დიფერენცირებას MEK/ERK კინაზების სასიგნალო გზის გააქტივებით. აქედან გამომდინარე მიჩნეულია, რომ ნობილეტინის მოქმედების მექანიზმი უფრო რთულია და სავარაუდოდ აგრეთვე მოიცავს ანთებითი პასუხის მოდულირების პროცესს, რაც ძალიან მნიშვნელოვანია ნეიროგენეზის და კარცინოგენეზის დროს. ეს ნაერთი თრგუნავს ანთებით პროცესებში მონაწილე ცილების გენების ექსპრესიას. აღნიშნული ინჰიბირება სავარაუდოდ ხორციელდება ტრანსკრიფციული ფაქტორის NF-kappaB დნმ-თან ეფექტური დაკავშირების შეფერხებით (Choi et al. 2007). ნაჩვენებია, რომ ნობილეტინი ამცირებს სასუნთქი გზების ანთებას ასთმის მქონე ვირთაგვებში (Y.-Q. Wu et al. 2006). ლიტერატურაში მრავალი მონაცემია, რომელიც ადასტურებს

ნობილეტინის ანთების საწინააღმდეგო მოქმედებას (მაგ. ულტრაიისფერი დასხივების შემდეგ კანის უჯრედებში). ნობილეტინი ამცირებს ათეროსკლეროზული პროცესების განვითარების რისკს: იგი აქვეითებს ქოლესტეროლის დონეს სისხლში და თრგუნავს ქაფისებრი უჯრედების წარმოქნას (Whitman et al. 2005).



სურათი 10. ნობილეტინის ქიმიური სტრუქტურა (2D და 3D).

ნანახია, რომ ნობილეტინი იწვევს ლეიკემიის დროს თაგვის მიელოიდური უჯრედების დიფერენციაციას, ამჟღავნებს ანტიპროლიფერაციულ აქტივობას ადამიანის კარცინომული უჯრედების ხაზის მიმართ, ზეგავლენას ახდენს ანტიმუტაგენურ აქტივობაზე და თრგუნავს მატრიქსის მეტალოპროტეინაზა-9-ის ინდუქციას. ნაჩვენებია, რომ ნობილეტინი თრგუნავს ორივე - LPS და IFN-γ-გამოწვეულ NO-ის პროდუქციას დოზა-დამოკიდებული წესით.

შესაბამისად, ნობილეტინის პრო- და ანტი-აპოპტოზური ეფექტები წარმოადგენენ უჯრედის სხვადასხვა რეგულატორულ კომპონენტებთან გარკვეული ურთიერთქმედების შედეგს და არ შეიძლება გაშუალებული იყოს მხოლოდ თავისუფალი რადიკალების შებოჭვით. ამგვარად, ნობილეტინი არ წარმოადგენს მხოლოდ ანტიოქსიდანტური თვისებების მქონე ნაერთს, არამედ მისი ფიზიოლოგიური ეფექტი განპირობებულია მის მიერ გარკვეული სასიგნალო სისტემების აქტივობის ცვლილებით. ნანახია, რომ ციტრუსის ფლავონოიდები არათანაბრად ვრცელდებიან თავის ტვინის სტრუქტურებში. ასე მაგალითად,

ჰიპოთალამუსში, ჰიპოკამპსა და სტრიატუმში მათი კონცენტრაცია 10-ჯერ მეტია, ვიდრე ტვინის ღეროსა და ნათხემში (Datla et al. 2001).

ნანახია, რომ ნობილეტინი შეიძლება გამოყენებულ იქნას, როგორც ანტისიმსივნური აგენტი ავთვისებიანი სიმსივნეების განვითარების გარკვეულ ეტაპებზე. ასევე აღსანიშნავია, რომ ციტრუსის ფლავონოიდებისთვის განსაკუთრებულად დამახასიათებელია ქიმიურად სტაბილობა და კარგი ბიოშეღწევადობა ლიპოფილური ბუნების გამო.

უახლესი მონაცემები ადასტურებენ, რომ ნობილეტინი (5,6,7,8,3V,4V-ჰექსამეთოქსი ფლავონი) ავლენს ანტისიმსივნურ ინვაზიურ აქტივობას პრო-მატრიქსული მეტალოპროტეინის (proMMPs) პროდუქციის დათრგუნვით და ქსოვილის ზრდის ინჰიბიტორის მეტალოპროტეინაზა-1ის (TIMP-1) ექსპრესიის გაზრდით როგორც in vivo ასევე in vitro. ნობილეტინი აგრეთვე აინჰიბირებს მიტოგენ აქტივირებული ცილის უჯრედგარე სიგნალით რეგულირებული კინაზების (MEK½) ფოსფორილირებას, მაგრამ არ ცვლის Ras ცილის აქტივობასა და Raf ცილის ფოსფორილირებას. MEK1/2-ის ინჰიბიტორი U0126 იმეორებს ნობილეტინის უნარს შეამციროს proMMPs-1-ის პროდუქცია ადამიანის ფიბრობლასტომის HT-1080 უჯრედებში, რომლებიც სტიმულირებული იყო 12-O-ტეტრადეკანოლ ფორბოლ-13-მჟავით (TPA). ასევე აღსანიშნავია, რომ არც PI3K-ის (ფოსფოინოზიტოლ 3 კინაზა) აქტივობა და არც Akt-ის ფოსფორილება არ იყო ნობილეტინით გამოწვეული. თუმცა ნანახია, რომ ნობილეტინი ზრდის c-Jun-NH2-ტერმინალური კინაზის (JNK) ფოსფორილირებას, რომელიც დაღმავალი სასიგნალო გზის ფაქტორია PI3K-Akt გზისა TPA-ნამკურნალები HT-1080 უჯრედებში. მსგავსი ზრდა JNK-ის ფოსფორილირებისა ნანახი იყო PI3K-ის ინჰიბიტორის დამატებისას LY-294002. გარდა ამისა ნანახია, რომ ნობილეტინით გამოწვეული TIMP-1 ის პროდუქცია TPA-ით სტიმულირებულ HT- 1080 უჯრედებში მოხსნილია JNK-ის ინჰიბიტორის დამატებისას (SP600125). ასევე, პროტეინკინაზა C (PKC) ინჰიბიტორულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ PKCBII/E არის დაკავშირებული ნობილეტინით გაშუალებულ JNK ფოსფორილირების მომატებასთან. ამ კვლევებიდან გამომდინარე შემოთავაზებულია ნობილეტინის ანტისიმსივნური ეფექტის ახალი მექანიზმი,

რომელიც რეგულირებულია შემდეგი მექანიზმებით: (1) MEK1/2-ის აქტივობის ინჰიბირება იწვევს MMP-ის ექსპრესიის დათრგუნვას და (2) PKCBII/E-JNK-ის გზის გააქტივება დაკავშირებულია TIMP-1-ის ექსპრესიის ზრდასთან (Miyata et al. 2004).

ასევე ნავარაუდებია, რომ ნობილეტინი ამცირებს სიმსივნური უჯრედების ინვაზიას MMP-9-ის პროდუქციის შემცირებით პერიტონეალური ადამიანის გასტროკარცინომისას მკაცრ კომბინირებულ იმუნოდეფიციტურ თაგვებში.

კვლევების შედეგად დადგინდა, რომ PI3K და MEK შესაძლებელია წარმოადგენენ ნობილეტინის შიდაუჯრედულ სამიზნეებს, რითიც ვლინდება მისი თერაპიული ეფექტი. თუმცა გაურკვეველი რჩება თუ რა გზით არეგულირებს ნობილეტინი PI3K და MEK -ის ექსპრესიასა და მათ აქტივაციას, ასევე ჩართულია თუ არა ამ მექანიზმებში სხვა მნიშვნელოვანი სამიზნე მოლეკულები ნობილეტინით გამოწვეულ MMP-ის ექსპრესიის დათრგუნვასა და TIMP-1-ის ექსპრესიის გაძლიერებასთან.

ნობილეტინის ანტისიმსივნური მოქმედების გარდა, ნანახია მისი დადებითი ეფექტი ნერვული სისტემის დარღვევების დროს. ციტრუსის ფლავონოიდი ნობილეტინი ჯანმრთელობისათვის სხვა სასარგებლო თვისებასთან ერთად დადებით გავლენას ახდენს დასწავლისა და მეხსიერების აღდგენის პროცესებზე, ალცჰეიმერის დაავადებისა და თავის ტვინის იშემიური პროცესების დროს (Yamamoto et al. 2009; Onozuka et al. 2008). ნაჩვენებია, რომ ნობილეტინი აღადგენს ქოლინერგულ ნეიროდეგენერაციას და აძლიერებს სინაფსურ ნეიროგადაცემას ჰიპოკამპში (Matsuzaki et al. 2008). ნობილეტინი ავლენს ანტიდეპრესანტის მსგავს ეფექტს თაგვებში (Yi et al. 2011) და იწვევს ნეიროგენეზს უჯრედშიდა სასიგნალო კასკადებთან ურთიერთქმედების გზით (Lai et al. 2011).

უკანასკნელმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ნობლეტინი აძლიერებს cAMP/პროტეინკინაზა A/ERK სიგნალს თაგვის ჰიპოკამპის ნეირონებში და PC12D უჯრედებში. ეს ბუნებრივი ნაერთი აუმჯობესებს დასწავლას მისი გაუარესების პირობებში, რაც დაკავშირებულია NMDA რეცეპტორის ანტაგონიზმთან ERK-ის აქტივაციით ჰიპოკამპში. 50მგ/კგ ნობილეტინით მკურნალობისას მცირდება NMDA რეცეპტორის ანტაგონისტით MK-801-ით გამოწვეული დამახსოვრების გაუარესება.

ვესტერ ბლოტინგის ანალიზითაც ნანახი იყო, რომ ნობილეტინმა შეამცირა დასწავლასთან ასოცირებული ERK-ის აქტივაციის MK-801-ით გამოწვეული ინჰიბირება ცხოველების ჰიპოკამპში. ამ შედეგების თანახმად, თაგვის ჰიპოკამპის კულტივირებულ ნეირონებში ნობილეტინმა კონცენტრაცია დამოკიდებული გზით აღადგინა MK-801-ით გამოწვეული NMDA რეცეპტორით სტიმულირებული ERK-ის ფოსფორილირების დაქვეითება. აქედან გამომდინარე, ნობილეტინის ნერვულ უჯრედზე მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის შესწავლა გახსნის ახალ თერაპიულ პერსპექტივას იმ ნევროლოგიური დაავადებების სამკურნალო პრეპარატების განვითარებისათვის, რომლებსაც თან სდევს კოგნიტური ფუნქციების გაუარესება NMDA რეცეპტორების ჰიპოფუნქციის- ERK-სასიგნალო გზით (A. Nakajima et al. 2007).

ნობილეტინი ასევე დადებით გავლენას ახდენს მეხსიერების გაუარესების დროს მღრღნელების მოდელების შემთხვევაში. ნობილეტინი აუმჯობესებს MPTP-ით გამოწვეულ პარკინსონიან თაგვებში მოტორულ და კოგნიტურ ფუნქციებს 2 კვირის თანმიმდევრული გამოყენებისას (50 mg/kg i.p.) და ეს ეფექტი გრძელდება ამ ნაერთის გამოყენების შეწყვეტის შემდეგ 2 კვირის განმავლობაში. მიუხედავად ამისა, ნობილეტინით მკურნალობისას არ გამოვლინდა დოფამინერგული ნეირონების დაბლოკვა (დაკარგვა) MPTP-ით ნამკურნალებ თაგვების თავის ტვინის ცენტრალურ ნაწილში, ასევე არ გამოვლინდა შემცირებული თიროზინ ჰიდროქსილაზას (TH) ცილების დონე სტრიატუმის ან ჰიპოკამპის CA1 რეგიონში. თუმცა, ნობილეტინმა შეამცირა Ca2+/კალმოდულინ-დამოკიდებული პროტეინ კინაზას II (CaMKII) აუტოფოსფორილირება და cAMP-რეგულირებული ფოსფოპროტეინის-32 (DARPP-32) ფოსფორილირება სტრიატუმში და ჰიპოკამპის CA1 უბანში. ასევე CaMKII- და cAMP კინაზა-დამოკიდებულ TH-ის ფოსფორილირება საგრძნობლად გაუმჯობესდა ნობილეტინით მკურნალობისას. MPTP-ით გამოწვეული დოფამინერგული ნეირონების მასიური შემცირება როგორც სტრიატუმში ასევე ჰიპოკამპის CA1 უბანში გაუმჯობესებული იყო ნობილეტინის (50 mg/kg i.p.)-ით კონცენტრაციის პირობებში. ინტერპერიტონალურად ნობილეტინის დამატებისას ასევე გაძლიერდა დოფამინის გამოყოფა სტრიატუმში და ჰიპოკამპის CA1 რეგიონში (Yabuki et al. 2014).

არსებული მონაცემებიდან გამომდინარე, საინტერესო ხდება ამ ფლავონოიდის შესაძლო გავლენა ბიოენერგეტიკაში ჩართულ ფერმენტულ სისტემებზეც.

როგორც აღმოჩნდა, ფლავონოიდების უმრავლესობა გარკვეულ ეფექტს ახდენს ძუძუმწოვრების ფერმენტულ სისტემებზე in vitro. ზოგიერთი მკვლევარის აზრით მსგავს პროცესებს ადგილი აქვს in vivo; რადგანაც ფლავონოიდების უმრავლესობა ჰიდროფობულია და ადვილად გაივლის მემბრანას (E Middleton, Kandaswami, and Theoharides 2000). მიუხედავად ამისა, კვლავ უცნობი რჩება მიტოქონდრიაში არსებულ რომელ სასიგნალო სისტემაზე შერჩევითად მოქმედებს ესა თუ ის ფლავონოიდი.

გარდა ამისა, ეს ფლავონოიდი ცვლის ზოგიერთი მიტოქონდრიული ფერმენტის (სუქცინატდეჰიდროგენასა და ციტოქრომ c ოქსიდაზას) აქტივობას (DABRUNDASHVILI et al. 2011) და გავლენას ახდენს მიტოქონდრიის მემბრანულ პოტენციალზე (J.-J. Wu et al. 2013). მიუხედავად ლიტერატურაში არსებული გარკვეული ექსპერიმენტული მონაცემებისა, ნობილეტინის ეფექტი მიტოქონდრიულ ბიოენერგეტიკაზე შესწავლილი არ არის.

აქედან გამომდინარე, ფრიად აქტუალური ხდება მცენარეული წარმოშობის ამ პოლიფენოლური ნაერთის მიტოქონდრიაში მიმდინარე პროცესებზე ზემოქმედების შესწავლა, ეს ნაერთი შესაძლებელია იყოს პოტენციური კანდიდატი როგორც სიმსივნური დაავადებების პროფილაქტიკასა და მკურნალობაში გამოყენებისთვის, ასევე ნეიროდეგენერაციული და ზოგადად მიტოქონდრიული დისფუნქციით მიმდინარე დარღვევების ახალი თერაპიული სტრატეგიისათვის.

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენს ნობილეტინის ზეგავლენის შესწავლა მიტოქონდრიაში მიმდინარე ზემოთ ჩამოთვლილი ენერგეტიკული პროცესების ინტენსივობაზე. შევარჩიეთ ორი ერთმანეთისაგან განსხვავებული ორგანიზმი - ხარის თავის ტვინის მიტოქონდრიები და საფუარის ორი განსხვავებული შტამი. კვლევისათვის შერჩეულ იქნა ორი ერთმანეთისაგან თვისობრივად განსხვავებული

ეუკარიოტული ორგანიზმი, იმისათვის, რომ შეგვედარებინა ნობილეტინის ეფექტი მათ მიტოქონდრიის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე.

კვლევის ობიექტს წარმოადგენს ხარის თავის ტვინიდან და საფუარის უჯრედული კულტურიდან მიღებული მიტოქონდრიული ფრაქცია, ასევე უჯრედული კულტურის შემთხვევაში მთლიანი, ანუ ინტაქტური უჯრედების სუსპენზია და საფუარის სფეროპლასტები.

კვლევის პირველი ეტაპის ობიექტს წარმოადგენს ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებული ინტაქტური მიტოქონდრიების ფრაქცია. მიტოქონდრიების სუნთქვით აქტივობაზე ნობილეტინის ზეგავლენის შესასწავლად წინა ექსპერიმენტების შედეგების საფუძველზე შერჩეულია ნობილეტინის მაქსიმალურად ეფექტური კონცენტრაცია (10 μM); სუნთქვითი ჯაჭვის ცალკეული კომპლექსების ბლოკატორების ოპტიმალური კონცენტრაცია შერჩეულია ლიტერატურიდან.

კვლევის შემდგომ ეტაპზე ობიექტად გამოყენებულია საფუარის Saccharomyces cerevisiae-ს და Candida Utilis უჯრედული კულტურა. კონკრეტული ამოცანების შესასრულებლად ამ უჯრედებიდან მიღებულია იზოლირებული ინტაქტური მიტოქონდრიული ფრაქცია და სფეროპლასტები.

ყველა ზემოთ ჩამოთვლილი ობიექტის შემთხვევაში შესწავლილია ნობილეტინის გავლენა საფუარის უჯრედულ კულტურაზე, საფუარიდან გამოყოფილ სფეროპლასტებზე და იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე, ასევე ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე და ბიოენერგეტიკის მნიშვნელოვან ასპექტებზე.

მასალა და მეთოდები

თავი 1. ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე ჩატარებული ექსპერიმენტული მეთოდები

1.1. ხარის თავის ტვინიდან მიტოქოდრიების მიღება

ხარის თავის ტვინიდან მიტოქონდრიების მიღება ხდებოდა ხარის თავის ტვინის ქერქის დიფერენცირებული ცენტრიფუგირებით და Percoll-ის გრადიენტში შემდგომი გასუფთავებით (Sims and Anderson 2008). გამოყენებული იყო არასინაფსური მიტოქონდრიების სუფთა ფრაქცია. მიტოქონდრიული ფერმენტების აქტივობის შეფასება ხდებოდა გამოყოფისთანავე ან ფრაქცია შენახული იყო -80^0 C-ზე ალიქვოტებად იზოტონურ ბუფერულ ხსნარში.

1.2. მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარების დადგენა

მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარების დადგენა ხდებოდა კლარკის ელექტროდით "Oxygraph Plus" სისტემით (OxyGraph Plus, Hansatech, UK) თავის ტვინის ინტაქტურ მიტოქონდრიებში. მიტოქონდრიები (0,05 მგ ცილა) დამატებული იყო საინკუბაციო არეში, რომელიც შეიცავდა 0,5 მლ რესპირაციის ბუფერს: 200 mM საქაროზა, 25 mM KCl, 2 mM K2HPO4, 5 mM HEPES, pH 7.2, 5 mM $MgCl_2$, 0.2 mg/mL of BSA, 30 μM Ap_5A (ადენილატ კინაზის ინჰიბიტორი), 10 mM გლუტამატს და 5 mM მალატს ან 5mM სუქცინატს. ნობილეტინთან და სხვა ინჰიბიტორებთან 5-5 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ (Franko et al. 2013). ჟანგვითი ფოსფორილირების ინიცირებისათვის (State 3) მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვამატებდით ADP-ს (1 mM, საბოლოო კონცენტრაცია) (Niatsetskaya et al. 2012). სუნთქვითი ჯაჭვის I და II კომპლექსების აქტივობის განსაზღვრისათვის რესპირაციის ბუფერში ვამატებდით 2 μM როტენონს და 100μM 3-NPA შესაბამისად.

1.3. მიტოქონდრიების მიერ ატფ-ის პროდუქციის განსაზღვრა

მიტოქონდრიების მიერ ატფ-ის პროდუქციის განსაზღვრა ხდებოდა ლუმინომეტრულად, თავის ტვინის ინტაქტურ მიტოქონდრიებში ნობილეტინთან და ინჰიბიტორებთან წინასწარი ინკუბაციის შემდეგ. ახლად გამოყოფილი 0.1 მგ/მლ მიტოქონდრია დამატებული იყო 10 mM Tris-HCl ბუფერში pH 7.4, რომელიც შეიცავდა 0.32 M მანიტოლს, 8 mM არაორგანულ ფოსფატს, 4 mM $MgCl_2$, 0.08 mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1 mM Ap_5A, 0.2 mg/mL ხარის უცხიმო ალბუმინი (BSA). ატფ-ის პროდუქციის სტიმულირებისათვის ვამატებდით 10 mM გლუტამატს, 5 mM მალატს და 1 mM ადფ-ს. იმისათვის, რომ განსაზღვრულიყო ჟანგვითი ფოსფორილების გზით წარმოქმნილი ატფ-ის წილი, პარალელურ სინჯებში დამატებული იყო ატფ-სინთაზას ინჰიბიტორი - 2 მკგ/მლ ოლიგომიცინი. ატფ-ის რაოდენობას ვითვლიდით ლუციფერინ/ლუციფერაზას მეთოდით. ლუციფერინ/ლუციფერაზას მეთოდი წარმოადგენს შემდგომს: ციცინათელის ლუციფერაზა არის მონომერული 61 kD-ის მქონე ფერმენტი რომელიც აკატალიზებს ლუციფერინის ორსაფეხურიან დაჟანგვას 560 ნმ ტალღის სიგრძეზე. პირველი ეტაპი მოიცავს ცილის აქტივაციას ატფ-ით, რომელის დროსაც წარმოიქმნება შუალედური რეაქტიული შერეული ანჰიდრიდი. მეორე ეტაპზე, წარმოქმნილი აქტიური შუალედური პროდუქტი რეაქციაში შედის ჟანგბადთან, რომლის დროსაც წამოიქმნება გარდამავალი დიოქსეთანი, რომელიც სწრაფად იშლება ოქსილუციფერინამდე და ნახშირორჟანგამდე და ამ დროს წარმოიქმნება ნათება (de Wet et al. 1985). როდესაც ატფ-ი წარმოადგენს შემზღუდველ კომპონენტს, სინათლის ინტენსიობა პროპორციულია ატფ-ის კონცენტრაციასთან. მიღებული ლუმინესცენციის მაჩვენებელი საკალიბრაციო მრუდის მიხედვით გადათვლილი იყო ატფ-ის კონცენტრაციაში და გამოსახული იყო ნანო მოლი ატფ წუთში 1 მგ საერთო ცილაზე.

1.4. α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას მიერ ატფ-ის სინთეზის განსაზღვრა

α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას მიერ ატფ-ის სინთეზის განსაზღვრა ხდებოდა საინკუბაციო არეში, რომელიც საბოლოო კონცენტრაციით შეიცავდა 0.1 მგ/მლ მიტოქონდრიულ ცილას, 0.3 mM თიამინ პიროფოსფატს (TPP), 0.2 mM MgCl2, 50 μM CaCl2, 5 mM ალფა-კეტოგლუტარატს, 1 μM როტენონს, 0.1 mM Ap5A, 0,2 mM NAD+ და 100 μM 3-ნიტროპროპიონის მჟავას (სუქცინატდეჰიდროგენაზას ინჰიბიტორი). რეაქცია იწყებოდა 0.14 mM CoASH-ის დამატებით. 25°C-ის ტემპერატურის პირობებში 5 წუთიანი ინკუბაციის შემდგომ რეაქციას ვაჩერებდით 7%-იანი პერქლორმჟავით, 25 mM EDTA-თი. ატფ-ის რაოდენობას ვითვლიდით ლუციფერინ/ლუციფერაზას (Sigma) მეთოდით (A. A. Starkov et al. 2004).

1.5. სუქცინილ-CoA-ლიგაზის განსაზღვრა

სუქცინილ-CoA-ლიგაზის განსაზღვრა ხდებოდა 50mM-ის კალიუმის ფოსფატის ბუფერში pH 7.2, რომელიც შეიცავდა 0.4% CHAPS, 10 mM MgCl2, 0.2 mM სუქცინილ-CoA, 2 mM ADP და 0.2 mM DTNB. რეაქცია იწყებოდა სუქცინილ CoA-სა და DTNB-ს სწრაფი დამატებით. რეაქცია იზომებოდა სპექტროფოტომეტრულად 412ნმ ტალღის სიგრძეზე, DTNB-ის კონცენტრაციის ცვლილებით, რეაქციის სიჩქარის კორექტირება ხდებოდა ბაზალური სიჩაქარის (ადფ-ის გარეშე) გამოკლებით (Lambeth et al. 2004).

1.6. α-კეტოგლუტარატ დეჰიდროგენაზის აქტივობის განსაზღვრა

α-კეტოგლუტარატ დეჰიდროგენაზის აქტივობის განსაზღვრა ხდებოდა საინკუბაციო არეში, რომელიც შეიცავდა 20 mM HEPES (pH 7.8), 0.3 mM თიამინ პიროფოსფატს, 50 μM CaCl2, 0.2 mM MgCl2, 5 mM α- კეტოგლუტარატს, 1 mM დითიოტრეიტოლს, და 0.5 mM NAD+ (Kiss et al. 2013). რეაქცია იწყებოდა 0.12 mM CoASH-ს დამატებით მიტოქონდრიებზე (0.1 mg/mL). რეაქციის დინამიკა ფასდებოდა NAD+ ის დაკლებით სპექტროფოტომეტრულად 340ნმ-ზე. მიღებული შედეგები

გადათვლილი იყო 1 მილიგრამ საერთო ცილაზე და გამოსახულია საერთაშორისო ერთეულებში - მმოლი აღდგენილი NADH • წთ-1 • მგ ცილაზე-1.

1.7. მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის განსაზღვრა

მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის განსაზღვრა ხდებოდა კათიონური საღებავის საფრანინ O-ს ფლუორესცენციის სიგნალის მიხედვით (Więckowski and Wojtczak 1998). მიტოქონდრია (0.2 მგ ცილა/მლ) ინკუბირებული იყო 2,5 მლ ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 5mM HEPES, 5mM MgCl2, 2mM KH2PO4 (pH 7.4), 0.1% BSA, 5μM საფრანინ O-ს, და 40 μL მიტოქონდრიულ ფრაქციას. სუნთქვითი ჯაჭვის ინიცირებისათვის ვამატებდით გლუტამატსა და მალატს 10mM და 5mM საბოლოო კონცენტრაციით შესაბამისად. ფლუორესცენციას ვზომავდით 460 ნმ აგზნების და 540 ნმ ემისიის ტალღის სიგრძეზე 10 წუთის განმავლობაში. შედეგები ნაჩვენებია ფლუორესცენციის პირობით ერთეულებში (AFU). თითოეული ექსპერიმენტი სხვადასხვა მიტოქონდრიული სინჯებისათვის გავიმეორეთ ყველაზე მცირე სამჯერ.

1.8. მიტოქონდრიების მიერ წყალბადის ზეჟანგის გენერაციის განსაზღვრა

მიტოქონდრიების მიერ წყალბადის ზეჟანგის გენერაციის განსაზღვრა ხდებოდა სკოპოლეტინის დაჟანგვის მეთოდით (Boveris, Martino, and Stoppani 1977). მიტოქონდრია (0.2 მგ/მლ) ინკუბირებული იყო 10mM HEPES-ის ბუფერში, pH 7.4, რომელიც შეიცავდა 5mM $MgCl_2$, 2mM KH_2PO4, 250mM საქაროზას, 0.1% BSA, 1 ერთეული/მლ პირშუშხას პეროქსიდაზა, 100nM სკოპოლეტინს. სუნთქვითი ჯაჭვის II კომპლექსის აქტივაციისთვის სუბსტრატად ვიყენებდით 5mM სუქცინატს, ხოლო I კომპლექსისათვის – 10mM გლუტამატსა და 5mM მალატს. ფლუორესცენციას ვზომავდით 460 ნმ აგზნების და 540 ნმ ემისიის ტალღის სიგრძეზე 5 წუთის განმავლობაში. კალციუმით გამოწვეული წყალბადის ზეჟანგის პროდუქციის განსაზღვრისათიის საინკუბაციო არეში ვამატებდით 0.1mM $CaCl_2$ და 0.05 mM EGTA-

ს. ელექტრონთა უკუტრანსპორტის თავიდან ასაცილებლად, როდესაც სუბსტრატად სუქცინატი იყო გამოყენებული საინკუბაციო არეში ვამატებდით 1 μM როტენონს.

1.9. მიტოქონდრიული ცილების სოლუბილიზაცია

ხარის თავის ტვინიდან აღებული ქერქის ჰომოგენიზაცია ხდებოდა საიზოლაციო ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 225 mM მანიტოლს, 75 mM საქაროზას, 5 mM HEPES ბუფერს, pH 7.3, 1 მგ/მლ BSA-ს და 0.5 mM EDTA-ს (Votyakova and Reynolds 2001). 10, 500 x g-ზე ცენტრიფუგირების შემდგომ, პირველ მიტოქონდრიულ ნალექს ვამატებდით დიგიტონინს (საბოლოო კონცენტრაციით 0.013%). შემდგომში ვახდენდით მიტოქონდრიის რესუსპენდირებას და ვაცენრიფუგირებდით საიზოლაციო არეში დიგიტონინის გარეშე. თითეული საიზოლაციო პროცედურა შესრულებული იყო 0 C°-ზე. ცილების სოლუბილიზაციას ვახდენდით ნალექის რესუსპენდირებით 50 mM Tris-HCl ბუფერში pH 7.0, რომელიც შეიცავდა 10% n-dodecyl--D-maltopyranoside და 2mM PMSF, 30 წთ-ის განმავლობაში, ყინულზე. სუპერნატანტი გამოცალკავებული იყო გაუხსნელი ნაწილიდან ცენტრიფუგირების გზით 90 წთ 20,000 x g- ზე, 4°C-ზე. დიალიზის საშუალებით მოვახდინეთ სუპერნატანტიდან დეტერგენტების მოცილება, მიღებული დიალიზატი კი შემდგომი კვლევისათვის, აფინური ქრომატოგრაფიისათვის იქნა გამოყენებული.

1.10. სოლუბილიზირებული მიტოქონდრიის აფინური ქრომატოგრაფია

სოლუბილიზირებული მიტოქონდრიის აფინური ქრომატოგრაფიის ექსპერიმენტის დროს ვიყენებდით სვეტს, რომელშიც მოთავსებული იყო სეფაროზასთან დაკავშირებული ნობილეტინი. ამ შემავსებლის მიღების მიზნით ხდებოდა 3-ჰიდროქსინობილეტინის (3-hydroxy-5,6,7,8,30,40-hexamethoxyflavone) მიბმა ეპოქსი-აქტივირებულ სეფაროზა 6B-სთან. 3-ჰიდროქსინობილეტინის ქიმიური სინთეზი ხდებოდა ერთსაფეხურიანი რეაქციის შედეგად, რომლის დროსაც ნობილეტინი რეაგირებდა დიმეთილდიოქსირანთან დაბალ ტემპერატურაზე

აცეტონის გარემოში (S. Li et al. 2007). 3-ჰიდროქსინობილეტინის მიბმა ეპოქსი-აქტივირებულ სეფაროზა 6B-სთან ტარდებოდა მწარმოებლის პროტოკოლის შესაბამისად (GE Healthcare) მცირე მოდიფიკაციით. ხდებოდა ლიგანდის განზავება შესაბამის ბუფერში (კარბონაული ბუფერი pH 11.5) და აცეტონში კონცენტრაციით 100 μmole/მლ, შემდეგ მისი შერევა ეპოქსი-აქტივირებულ სეფაროზა 6B-სთან და ინკუბაცია 35°C ტემპერატურის პირობებში 16 საათის განმავლობაში. გელის დარჩენილი აქტიური ჯგუფების ბლოკირება ხდებოდა 1M ეთანოლამინის დამატებით. ლიგანდთან დაკავშირებული გელის გარეცხვა ხდებოდა საპირისპირო pH-ის მქონე ბუფერებში (0.1 M აცეტატის ბუფერი pH 4.0 და 0.1 M Tris- HCl pH 8.0). გარეცხვის შემდეგ გელი თავსდებოდა ქრომატოგრაფიულ სვეტში ზომებით 4x 0.8 სმ.

გელთან დაკავშირებული ნაერთების ელუცია ხდებოდა საწყის ბუფერში (20 Mm Tris-HCl, pH 7.4) 0.5M NaCl-ის დამატებით. ელუატის გასუფთავება იონური მინარევებისაგან ხდებოდა დიალიზით ჰიპოტონურ ბუფერულ ხსნარში. მიღებული ფრაქციის ცილოვანი შედგილობა ისაზღვრებოდა SDS-PAGE ელექტროფორეზული ანალიზით და ცილების ვიზუალიზაცია ხდებოდა a Coomassie Brilliant Blue შეღებვით.

1.11. ვესტერნ ბლოტის ანალიზი

იმუნობლოტინგის ანალიზისათვის, აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული 50μg დენატურირებული ცილა დავყავით SDS-PAGE-ელექტროფორეზით 15%-აინ გელზე და გადავიტანეთ ნიტროცელულოზის მემბრანაზე. ბლოკირების შემდგომ მემბრანები ინკუბირებული იყო ანტი-NDUFV1-ის პირველად ანტისხეულთან (ab203208, Abcam). იმუნოლოგიურად მონიშნული ზოლების ვიზუალიზაციას ვახდენდით ქემილუმინისცენტული რეაგენტით (Amersham Biosciences) და მისი ანალიზი ხდებოდა დენსიტომეტრული სკანირებით. მონიშნული ზოლების ინტენსივობა შეესაბამებოდა დატანილი სინჯებში არსებული საკვლევი ცილის რაოდენობასთან.

1.12. ჰექსოკინაზის აქტივობის განსაზღვრა

ჰექსოკინაზის აქტივობის განსაზღვრას თავის ტვინის ინტაქტურ მიტოქონდრიებში ვახდენდით ნობილეტინთან წინასწარი 5-5 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ. საინკუბაციო არე შეიცავდა 890 მლ ბუფერს (10mM Tris–HCl, pH 7.4, 5mM d-გლუკოზა, 10mM MgCl2, 1mM ATP, 1mM NADP+, 1 ერთეული/მლ გლუკოზა-6-ფოსფატდეჰიდროგენაზა, 125mM KCl, 10 mM MOPS, , 2 mM KH_2PO_4, 10 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,7 mM CaCl2) და 50 მკგ მიტოქონდრიული ფრაქციას. რეაქციას ვიწყებდით ატფ-ის დამატებით. რეაქციის დინამიკა იზომებოდა სპექტროფოტომეტრულად 340 ნმ-ის სიგრძის ტალღაზე, 10 წუთის განმავლობაში ყოველი 1 წუთში 37^{0}C პირობებში. რეაქციის სიჩქარე ფასდებოდა წარმოქმნილი NADPH ოპტიკური შთანთქმის ხარისხის მიხედვით. მიღებული შედეგები გადათვლილი იყო 1 მილიგრამ საერთო ცილაზე და გამოსახულია საერთაშორისო ერთეულებში.

1.13. სუქცინატდეჰიდროგენაზური აქტივობის განსაზღვრა

სუქცინატდეჰიდროგენაზური აქტივობის განსაზღვრა ხდებოდა თავის ტვინის ინტაქტურ მიტოქონდრიებში ნობილეტინთან წინასწარი 5-5 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ (Rosen et al. 1987). საინკუბაციო არე შეიცავდა 0.65 მლ ბუფერულ ხსნარს, 4.2mM PMS, 0.6mM როტენონს, 0.42 mM DCIP, 50μg მიტოქონდრიალურ სუსპენზიას, რეაქცია იწყებოდა 0.2M სუქცინატის დამატებით. რეაქციის დინამიკა ფასდებოდა სპექტროფოტომეტრულად 540 ნმ-ის სიგრძის ტალღაზე, 5 წუთის განმავლობაში 25^{0}C პირობებში. DCIP-ის აღდგენა იწყებოდა PMS-ის დამატებით და საწყისი შემცირების ხარისხს ვადგენდით 540 ნმ-ზე დაჟანგული DCIP-ს ექსტინციის კოეფიციენტის $\varepsilon = 21{,}000$ გამოყენებით. რეაქციის სიჩქარე ფასდებოდა ოპტიკური სიმკვრივის მატების ხარისხით. აქტივობა გამოისახებოდა ერთეულებში, რომელიც შეესაბამება DCIP 1 მმოლ-ის აღდგენას 1 წუთში 25^{0}C ტემპერატურაზე გადათვლილი საერთო

ცილის ერთ მილიგრამზე და გამოსახულია საერთაშორისო ერთეულებში - mmole აღდგენილი DCIP • min-1 • mg protein-1.

1.14. NADH-დეჰიდროგენაზული აქტივობის განსაზღვრა

NADH-დეჰიდროგენაზული აქტივობის განსაზღვრა ხდებოდა სპექტროფოტომეტრულად, თავის ტვინის ინტაქტურ მიტოქონდრიებში ნობილეტინთან და ინჰიბიტორებთან წინასწარი ინკუბაციის შემდეგ, სამი მეთოდის გამოყენებით.

1. NADH-დეჰიდროგენაზული აქტივობის საინკუბაციო არე წარმოადგენდა 1მლ ბუფერულ ხსნარს, რომელიც შეიცავდა 25mM KH_2PO_4, 3.5 g/L BSA, 60 μM DCIP (დიქლორინდოფენოლს), 70 μM კოფერმენტი Q1 და 50 μg მიტოქონდრიალურ სუსპენზიას (A. J. M. Janssen et al. 2007).

2. NADH-დეჰიდროგენაზული აქტივობის საინკუბაციო არე წარმოადგენდა 1მლ 0.1 mM KH2PO4 ბუფერულ ხსნარს pH 7.4, რომელიც შეიცავდა 100 μM კოფერმენტ Q1, 1 mM KCN და 2 mM NaN3 (2 mm), აგრეთვე 50 μg მიტოქონდრიალურ სუსპენზიას სონიკატის სახით (Keeney et al. 2006). რეაქციას ვიწყებდით 300 μM β-NADH-ის დამატებით.

როტენონ-მგრძნობიარე აქტივობის დასადგენად პარალელურ სინჯებში დამატებული იყო 1 μM როტენონი. რეაქცია ფასდებოდა სპექტროფოტომეტრულად 340 ნმ-ის ტალღაზე 180 წამის განმავლობაში 37° ტემპერატურის პირობებში. მიღებული შედეგები გამოსახულია პირობით ერთეულებში და გადაყვანილია 1 მგ ცილაზე.

3. NADH:უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობა იზოლირებული თავის ტვინის მიტოქონდრიებისა და აფინურად გასუფთავებული პრეპარატის ფრაქციებში ვზომავდით სპექტროფოტომეტრულად 340 ნმ-ის ტალღის სიგრძეზე საინკუბაციო არეში, რომელიც შეიცავდა 25 mM კალიუმის ფოსფატს, 3.5 g/L BSA, 60 μM DCIP, 70 μM CoQ1, და 0.2 mmol/L NADH, pH7.8. ცილოვანი პრეპარატის (100 μg) ან მიტოქონდრიის (50 μg) დამატების შემდგომ შთანთქმის წერტილს ვზომავდით 30-წამიანი ინტერვალებით 4 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე (A. J. M. Janssen et al. 2007).

1.15. ნობილეტინის ფხვნილის სისუფთავის ანალიზი

ნობილეტინის ფხვნილის სისუფთავის ანალიზის დადგენა მოვახდინეთ მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიული მეთოდით (Agilent 6200). ნობილეტინი შთანთქმის სპექტრის ორი მაქსიმუმით ხასიათდება - 285 ნმ და 324 ნმ (Y. Sun et al. 2010), რომელზეც ხდებოდა ანალიზი; სისუფთავის ანალიზი ტარდებოდა C18 სვეტში (250 მმ × 4.6 მმ i.d., 5μm ნაწილაკის ზომა) ოთახის ტემპერატურაზე აცეტონიტრილის გრადიენტზე, დინების სიჩქარე 1.0 მლ/წთ. დატანა და ელუცია მიმდინარეობდა შემდეგ მობილურ ფაზებში: 0-5წთ - 20% აცეტონიტრილი, 80% დეიონიზირებული წყალი, 5-30წთ - 61% აცეტონიტრილი, 39% დეიონიზირებული წყალი, 30-35წთ – 100% აცეტონიტრილი. რეტენციის დრო არის 17 წუთი.

1.16. ნობილეტინის მეტაბოლიტების განსაზღვრა

მიტოქონდრიების მიერ ნობილეტინის მეტაბოლიზმის დასადგენად, მოხდა შედარებითი ანალიზი მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიული მეთოდით. შედარებული იყო მიტოქონდრიული ფრაქციის ორი სინჯი, ნობილეტინთან (2,5μg საბოლოო კონცენტრაციით) ინკუბაციის დასაწყისში (0 წთ) და 10 წთ-ის შემდეგ. სინჯებს დავამატეთ 500μl ცივ აცეტონს, ვანჯღრევდით და -ვინახავდით -80°C-ზე 30 წუთის განმავლობაში ფლავონოიდის სრული ექსტრაქციის მიზნით, შემდგომ ვაცენტრიფუგირებდით 10 000g-ზე 8 წუთის განმავლობაში. მიღებული სუპერნატანტი გაფილტვრის შემდეგ დატანილი იყო მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიულ C18 სვეტზე (250 მმ × 4.6 მმ i.d., 5μm ნაწილაკის ზომა) ოთახის ტემპერატურაზე აცეტონიტრილის გრადიენტზე, დინების სიჩქარე 1.0 მლ/წთ. დატანა და ელუცია მიმდინარეობდა შემდეგ მობილურ ფაზებში: 0-5წთ - 20% აცეტონიტრილი, 80% დეიონიზირებული წყალი, 5-30წთ - 61% აცეტონიტრილი, 39% დეიონიზირებული წყალი, 30-35წთ – 100% აცეტონიტრილი. რეტენციის დრო არის 17.5 წუთი. ნობილეტინის მეტაბოლიტების განსაზღვრა ხდებოდა სფექტროფოტომეტრულად 2 ტალღის სიგრძეზე, 271 და 340 ნმ.

1.17. ნობილეტინის დაჟანგულობის განსაზღვრა

ნობილეტინის დაჟანგულობის ცვლილების დასადგენად ჩატარდა მისი სპექტროფოტომეტრული ანალიზი. ზემოთ აღწერილი პროცედურით მიღებული სუპერნატანტის შთანთქმის სპექტრის განსაზღვრა და შედარება ხდებოდა CE7000 Cecil სფექტოფოტომეტრზე - შთანთქმის სპექტრი 100-1100 ნმ ფარგლებში.

1.18. სინჯებში ცილის საერთო რაოდენობის განსაზღვრა

სინჯებში ცილის საერთო რაოდენობის განსაზღვრას ვახდენდით „BCA Protein Assay“ კიტ ნაკრების (SantaCruz, USA) საშუალებით მწარმოებლის პროტოკოლის მიხედვით. სინჯების AB რეაგენტთან 60^0 C-ზე 15 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად 562 ნმ-ზე. ცილის კონცენტრაციის გამოთვლა ხდებოდა ალბუმინის სტანდარტული მრუდის შესაბამისად.

1.19. შედეგების სტატისტიკური დამუშავება

შედეგების სტატისტიკური დამუშავება ხდებოდა ANOVA ანალიზით. თითიოეულ შემთხვევაში ხდება მინიმუმ ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის დამუშავება. შედეგები სარწმუნოდ მიიჩნეოდა, როდესაც $p<0.05$ იყო. ყველა მონაცემი წარმოადგენს მინიმუმ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის საშუალო მაჩვენებელს.

თავი 2. საფუარის მოდელზე ჩატარებული ექსპერიმენტული მეთოდები

2.1. საფუარის ხაზები, კულტურის ზრდის მედიუმი და ზრდის პირობები

ჩვენს ექსპერიმენტში გამოყენებულ იქნა საფუარის ორი შტამი: *C. utilis* CBS621 და *S. cerevisiae* (yeast foam). უჯრედები იზრდებოდნენ აერობულად 28 °C-ზე შემდგომ ზრდის მედიუმში: 0.175% საფუარის აზოტის ფუძე (yeast nitrogen base) (Difco), 0.2% კაზეინის ჰიდროლიზატი (Merck), 0.5% $(NH4)_2SO_4$, 0.1% KH_2PO_4, 0.2% DL-ლაქტატი (w/v) (Prolabo), pH 5.5, 20 მგ/ლიტრზე l-ტრიფტოფანი (Sigma), 40 მგ/ლიტრზე ადენინის ჰიდროქლორიდი (Sigma), 20 მგ/ლიტრზე ურაცილი (Sigma). კულტურის ზრდა ისაზღვრებოდა სპექტროფოტომეტრულად 600ნმ ტალღის სიგრძეზე (სპექტროფოტომეტრი Safa Monaco). მშრალი წონის განსაზღვრა ხორციელდებოდა ზრდის პერიოდში და შემდგომში ირეცხებოდა გამოხდილი წყლით ორჯერ (Chevtzoff et al. 2010). უჯრედებს საექსპერიმენტოდ ვიყენებდით მათი ექსპონენციალური ზრდის ფაზაში.

2.2. მიტოქონდრიის იზოლირება საფუარის ინტაქტური უჯრედებიდან

თავდაპირველად უჯრედები იზრდებოდნენ აერობულ გარემოში, 28 °C-ზე, ზრდის მედიუმში, რომელიც უკვე აღწერილია 2.1. მეთოდების ქვეთავში. უჯრედები გროვდებოდა მათი ზრდის ექსპონენციალურ ფაზაში, შემდგომში ფერმენტ ზიმოლიაზას, 10 მგ/გ მშრალი წონა (ICN biomedicals) მოქმედების შედეგად ვშლიდით უჯრედულ კედელს და ვიღებდით სფეროპლასტებს (Guérin, Labbe, and Somlo 1979). მიტოქონდრიას ვიღებდით სფეროპლასტების პლაზმური მემბრანის გახეთქვის შემდგომ ჰიპო ოსმოსურ მედიუმში (Guérin, Labbe, and Somlo 1979), სადაც 10 mM-ის Tris-ფოსფატს ვამატებდით. საბოლოო ნალექი რესუსპენდირებული იყო მიტოქონდრიულ ბუფერში, რომელიც შეიცავდა: 0.65 M მანიტოლს, 0.36 mM EGTA,

10 mM Tris-maleate, 10 mM Tris-phosphate, pH 6.8. ცილის კონცენტრაცია გაზომილი იყო ბიურეტის მეთოდით სადაც შრატის ალბუმინს ვიყენებდით სტანდარტად.

2.3. საფუარის იზოლირებული მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარება

მიტოქონდრიები იზოლირებული იყო საფუარის ორივე შტამიდან: Candida Utilis და Yeast Foam, 0.3მგ/მლ ცილა შეგვქონდა საბოლოო კონცენტრაციით ექსპერიმენტში (Avéret et al. 2015). საფუარის ორივე შტამის იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე ექსპერიმენტისათვის გამოვიყენეთ ნობილეტინის შემდეგი კონცენტრაციები: 10μM; 50 μM; 100 μM, ნობილეტინის კონცენტრაცია შერჩეული იყო გამომდინარე იქიდან, რომ მიტოქონდრიები სუფთა სახით გვქონდა იზოლირებული საფუარის უჯრედებიდან, რაც ნიშნავს იმას რომ საფუარის უჯრედული კედელი მოშორებულია, ნობილეტინის კონცენტრაცია შესაბამისაც გაცილებით დაბალია. წინასწარი ინკუბაცია ნობილეტინთან გვქონდა 5 და 10 წუთით და ამის შემდგომ ვზომავდით ჟანგბადის მოხმარებას ოქსიგრაფზე. სუნთქვის დასაწყებად იზოლირებულ მიტოქონდრიებს ვუმატებდით ეთანოლს (100mM), როგორც სუბსტრატს, დამატებიდან 10 წუთის შემდეგ კი ვიწყებდით ჟანგბადის მოხმარების გაზომვას. მესამე მდგომარეობის (State 3) გასაზომად ვამატებდით ADP-ს 1mM კონცენტრაციით; ხოლო შეუღლების გამთიშავი პოტენციალის გასაზომად ვამატებდით დამთიშველს CCCP-ს 1μM კონცენტრაციით. მეთანოლს ვამატებდით ასევე, როგროც ნეგატიურ კონტროლს (მონაცემები არ არის წარმოდგენილი).

2.4. სფეროპლასტების გამოყოფა საფუარის უჯრედებიდან

Candida Utilis-ის უჯრედული კულტურა ცდისთვის გამოყენებული იყო მისი ექსპონენციალური ზრდის ფაზაში. საფუარის უჯრედებს ვაცენტრიფუგირებდით 5000 რპმ-ზე 5 წუთის განმავლობაში (5th, Sorval SC-5B), შემდგომში ნალექს

ვრეცხავდით გამოხდილი წყლით, კულტურის რეცხვას ვახდენდით იგივე მოცულობით რაც თავდაპირველი ცენტრიფუგირების დროს იყო, აგრეთვე ცენტრიფუგირების გზით 5000რპმ-ზე 5 წუთის განმავლობაში, გარეცხვის შემდგომ უჯრედები ინკუბირებულნი იყვნენ SH ბუფერში (0,5M β-მერკაპტოეთანოლი, 0,1M Tris pH 9,3) 32 ან 28°C-ზე 10 წუთის განმავლობაში დისულფიდური ბმების შესამცირებლად. SH ბუფერს ვიყენებდით 20მლ-ს, 1 გრამ უჯრედების მშრალ წონაზე. შემდგომში უჯრედებს ვრეცხავდით KCl-tris (2,5M KCl, 50mM Tris, pH 7.0, ექსპერიმენტში ვიყენებდით 1X განზავებულს) ბუფერში ცენტრიფუგირების გზით 5000 რპმ-ზე 5 წუთის განმავლობაში (5th, Sorval SC-5B). ამის შემდგომ მიღებულ ნალექს ვაინკუბირებდით digestion ბუფერში, რომელიც შეიცავდა (დეიონიზირებული სორბიტოლს 1,35M, 1mM EGTA, 10mM ციტრატ ფოსფატი (=10mM citrate acid + 10mM Na2HPO4) pH 5.8), ციტოჰელიკაზა 0.17 g/g მშრალი წონა. ინკუბირებას ვახდენდით 32 ° C-ზე მუდმივი შენჯღრევის პირობებში, ინკუბირება გრძელდებოდა 30 წუთიდან მაქსიმუმ 1 საათამდე. უჯრედული კედელი ფერმენტის მიერ დაშლილი უნდა იყოს 90%-მდე, მონელების პროცესის დაკვირვებას ვახდენდით უჯრედების OD-ის მიხედვით; როდესაც უჯრედების OD უთანაბრდება დაახლოებით იგივეს რაც საწყისი OD-ის მაჩვენებელი იყო, უჯრედების მონელების პროცედურა სრულდება. უჯრედული კედლის დაშლის შემდგომ მიღებულ სფეროპლასტებს ვრეცხავდით ცენტრიფუგირების გზით SS34 ცენტრიფუგაზე, 3-4-ჯერ 5 წუთის განმავლობაში, 2500 რპმ-ზე სფეროპლასტების ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 1M სორბიტოლს, 1,7mM NaCl, 2mM MgSO4, 10mM KH2PO4, 0,5mM EGTA, 0,1% BSA, pH 6,8. ბოლო გარეცხვის შემდგომ სფეროპლასტებს ვაბრუნებდით სფეროპლასების ბუფერში და ვამატებდით BSA-ს 1 გრამ მშრალ წონას 6მლ ბუფერზე. გამოყოფილ სფეროპლასტებს ვინახავდით ცივ ოთხში 4°-ზე. სფეროპლასტებს ექსპერიმენტში ვიყენებდით 0.1 მგ/მლ ცილის კონცენტრაციას, ხოლო სფეროპლასტების პერმეაბილიზაციისთვის ვიყენებდით ნისტატინს 20µg/მლ საბოლოო კონცენტრაციით.

2.5. საფუარის მიერ ჟანგბადის მოხმარების განსაზღვრა

საფუარის მიერ ჟანგბადის მოხმარების განსაზღვრა ხდებოდა პოლაროგრაფიულად 28°C-ზე კლარკის ელექტროდის გამოყენებით 1მლ საექსპერიმენტო თერმულად კონტროლირებად რეზერვუარში (ოქსიგრაფის მოცულობა სადაც ისხმევა საექსპერიმენტო არე). ჟანგბადის მოხმარების სიხშირე (JO_2) იზომებოდა O2-ის კონცენტრაციის ცვლილებით დროის ერთეულში. სუნთქვითი რეაქციები იზომებოდა უჯრედული კულტურის ზრდის საკვებ არეში. ინტაქტურ უჯრედებში ჟანგბადის მოხმარების ინტენსივობის გსაზომად მზარდი უჯრედული კულტურიდან ვიღებდით უჯრედული სუსპენზიის 1მლ-ს და სწრაფად გადაგვქონდა ჩამწერი რესპირომეტრის ფოსოში, ვიწერდით „სპონტანურ უჯრედულ სუნთქვას“. ექსპერიმენტების უმრავლესობაში ჟანგბადის მოხმარების ინიცირებისთვის ვამატებდით 100mM ეთანოლის. აქტიური სუნთქვის (State 3) შესაფასებლად 1mM ADP დამატებული იყო არეში. TCA ციკლის შესაძლო როლის დასადგენად გამოყენებული იყო ალტერნატიული სუბსტრატებიც: პირუვატი (10mM) და მალატი (5mM); α-კეტოგლუტარატი (10mM). უარყოფით კონტროლად ვიყენებდით მეთანოლს. სფეროპლასტების შემთხვევაში გამოყენებული შემდეგი სუბსტრატები: პირუვატი (10mM) + მალატი (5mM); სუქცინატი (10mM); NADH (2mM); α-KG (10mM); IV კომპლექსის აქტივობის განსაზღვრისათვის TMPD (0,25mM) და ასკორბინის მჟავა (1mM), აგრეთვე Antimycin A (4,56μM) დამატებული იყო სარეაქციო არეში, არაფოსფორილირებადი სუნთქვითი ინტენსივობა გავზომეთ ატფ სინთაზის ინჰიბიტორის 0.2mM ტრიეთილთინ ბრომიდის (TET) დამატებით (Cain K., et. al. 1977). იზოლირებული მიტოქონდრიის სუნთქვითი აქტივობის განსაზღვრისათვის მიტოქონდრია (0.33 მგ/მლ) ინკუბირებული იყო 2 მლ მიტოქონდრიულ ბუფერში (0.65 M მანიტოლი, 0.36 mM EGTA, 10 mM Tris-მალეატი, 10 mM Tris-ფოსფატი, pH 6.8). ჟანგბადის მოხმარების სიხშირე (JO_2) იზომებოდა 10 წუთის განმავლობაში, გამოსახულია O_2-ის კონცენტრაციის ცვლილებით დროსთან შეფარდებით და გამოხატული იყო როგორც nat O/წთ/OD (უჯრედების სუსპენზიის შემთხვევაში) ან nat O/წთ/მგ მიტოქონდრიული ცილა (ინტაქტური მიტოქონდრიების შემთხვევაში). ჟანგვითი ფოსფორილირების ინტენსიობის დასადგენად ზოგიერთ

სინჯში დამატებული იყო შეუღლების გამთიშავი - 10μM კარბონილ ციანიდ 3-ქლოროფენილჰიდრაზონი (CCCP).

2.6. ციტოქრომების რაოდენობრივი განსაზღვრა

ციტოქრომების რაოდენობრივ განსაზღვრას ვახდენდით ორმაგი სხივის მქონე (Double beam) სპექტროფოტომეტრზე (Aminco DW2000). თავდაპირველად მზარდი უჯრედული კულტურიდან ვიღებდით ექსპონენციალურ ზრდის ფაზაში მყოფ უჯრედებს, ერთი სინჯი იყო კონტროლი, ხოლო მეორე სინჯს ვაინკუბირებდით 1 საათით ნობილეტინთან (250μM საბოლოო კონცენტრაცია). მიღებულ ორივე სინჯის უჯრედულ კულტურას ვაცენტრიფუგირებდით 2500 rpm-ზე 10 წუთის განმავლობაში, ნალექს ვრეცხავდით გამოხდილი წყლით ორჯერ ასევე ცენტრიფუგირების გზით. მიღებული ნალექი შემდგომში იზომებოდა სპექტროფოტომეტრულად, ნალექს ვამატებდით 2 მლ გამოხდილ წყალს, რომ მიგვეღო 2მლ უჯრედული სუსპენზია, მიღებულ 2 მლ სუსპენზიას ვასხავდით 2 სხვადასხვა კიუვეტაში, 1მლ თითო კიუვეტაში. კიუვეტები მოთავსებული იყო სპექტოფოტომეტრში, ვზომავდით სხვადასხვა სპექტრზე (500ნმ დან 650ნმ-მდე), ერთ კიუვეტაში, რომელშიც იყო 1მლ უჯრედული სუსპენზია ვამატებდით - 1μM H_2O_2-ს 70% (w/v) (დაჟანგული მდგომარეობა), ხოლო მეორე კიუვეტის 1მლ უჯრედულ სუსპენზიაში ვამატებდით დითიონიტის რამოდენიმე გრანულს (აღდგენილი მდგომარება). ციტოქრომ c+c1 და ციტოქრომ b-ს რაოდენობის გამოთვლა ხდებოდა ექსტინციის კოეფიციენტის მიხედვით 18 000 M-1 სმ-1 550-540nm და 561-575nm ტალღის სიგრძისთვის, ხოლო ციტოქრომ $a+a_3$ გამოთვლა კი შესაბამისი კოეფიციენტით -12 000 M-1 სმ-1 603-630 nm ტალღის სიგრძის ინტერვალში (Dejean et al. 2000).

2.7. ვესტერნ ბლოტინგი

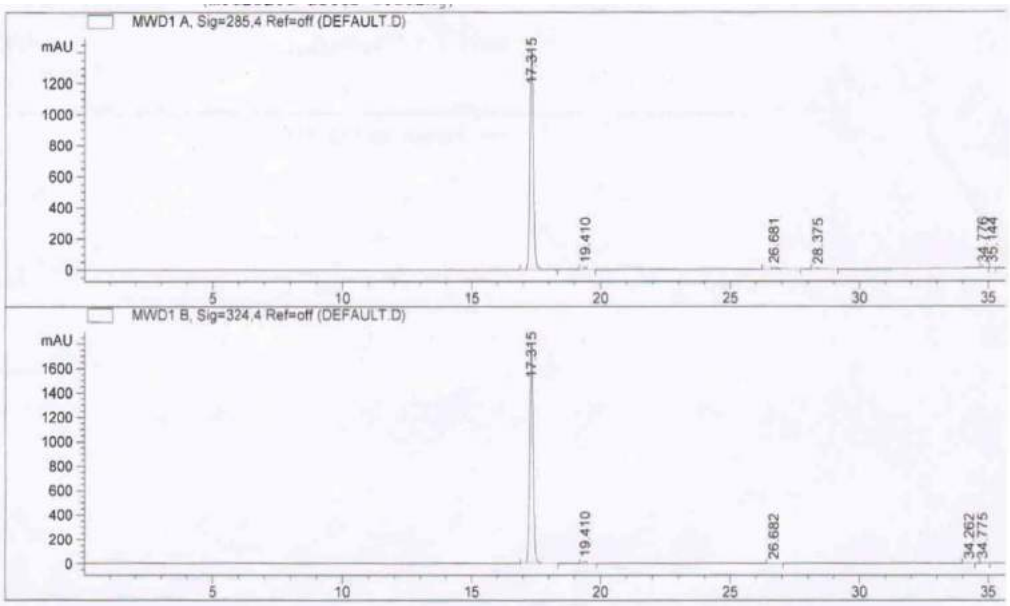
საფუარის უჯრედებიდან ცილების ექსტრაქცია ხდებოდა შემდეგი პროცედურით: უჯრედებს ვამატებდით 50µl 7.5% β-მერკაპტოეთანოლს 1.85 M NaOH-იან ხსნარში. ყინულზე 10 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ ცილებს ვამატებდით 50 µl 50%-იან TCA-ს და ვაყოვნებდით 15 წუთის განმავლობაში ყინულზე. სწრაფი დაცენტრიფუგირების შემდეგ, ნალექვს ვასუსპენდირებდით 1:1 (v/v) 10% SDS-ისა და ნიმუშების ბუფერის, რომელიც შეიცავდა (0.1 M Tris, 2% SDS, 2% β-მერკაპტოეთანოლს, 25% გლიცეროლი, 0.002% ბრომფენოლ ცისფერი) ნარევთან. ბიო-რადის ფირმის რეაქტივების ნაკრების (კიტის) საშუალებით ვახდენდით ცილების რაოდენობის განსაზღვრას, ამის შემდგომ ხდებოდა ცილის ფრაქციის ანალიზი 12% SDS-PAGE-ის გელზე Laemmli მეთოდის მიხედვით. ელექტროტრანსფერი ხდებოდა PVDF (polyvinylidene difluoride) მემბრანაზე, ვესტერნ ბლოტინგი ტარდებოდა შესაბამის ანტსხეულებთან ერთად. ცილების ვიზუალიზაციას ვახდენდით ECL (Amersham Biosciences), მწარმოებლის ინსტრუქციების შესაბამისად. მიღებული ცილის სიმკვრივის ნორმალიზაციას ვახდენდით ცილა α-PGK-ის ვესტერნ ბლოტის მონაცემებით, დენსიტომეტრულად.

მიღებული შედეგები

თავი 1. ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე მიღებული შედეგები

1.1. ნობილეტინის პრეპარატის სისუფთავის დადგენა

ხარის თავის ტვინის ქერქიდან იზოლირებულ ინტაქტურ მიტოქონდრიებზე ნობილეტინის გავლენის შესწავლის წინ კვლევის პირველ ეტაპზე მოხდა ნობილეტინის შეძენილი პრეპატატის სისუფთავის დადგენა.



სურათი 11. მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიული სტანდარტული სურათი, ნობილეტინის პრეპარატის ქრომატოგრამა.

ნობილეტინის შთანთქმის სპექტრი ორი მაქსიმუმით ხასიათდება - 285 ნმ და 324 ნმ. ორივე ტალღაზე განსაზღვრისას პრეპარატის სისუფთავე აღემატებოდა 96%, რაც გვაძლევს საფუძველს გამოვიყენოთ ეს პრეპარატი ნობილეტინის ეფექტის შესასწავლად (სურ. 11).

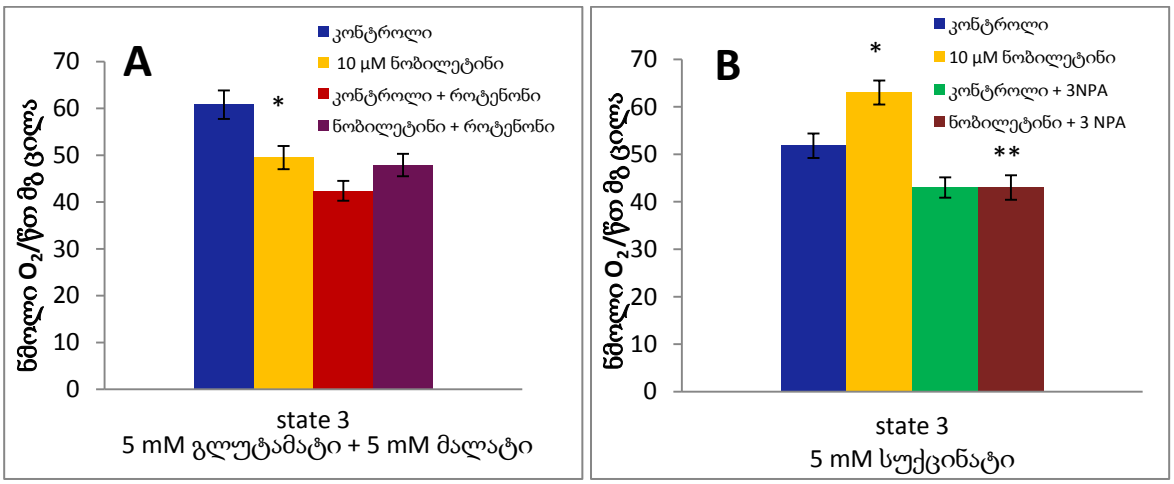
მიტოქონდრიული ბიოენერგეტიკის და მასში მიმდინარე ჟანგვითი პროცესების ძირითად და უმნიშვნელოვანეს პარამეტრს ჟანგბადის მოხმარება წარმოადგენს, რომელიც ამ ორგანელის ფუნქციური მდგომარეობისა და მისი ეფექტური მუშაობის

მარკერად მიიჩნევა. ცნობილია, რომ მიტოქონდრიების სუნთქვითი აქტივობა იცვლება მრავალი დაავადების ან პათოლოგიური ფაქტორის (მაგ. ჰიპოქსიის) მოქმედების დროს. ამ პროცესს თან ახლავს მიტოქონდრიის პოტენციალისა და ატფ-ის პროდუქციის ცვლილება.

აქედან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის შემდგომ ეტაპზე განსაზღვრული იყო ნობილეტინის ზეგავლენა თავის ტვინის იზოლირებული მიტოქონდრიების სუნთქვით აქტივობაზე.

1.2. იზოლირებული მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარების გაზომვა ნობილეტინის თანაობისას

ჩვენი ექსპერიმენტული სამუშაოს პირველ ნაწილში გავზომეთ ჟანგბადის მოხმარება ტვინის იზოლირებულ მიტოქონდრიებში ნობილეტინის თანაობისას. ჩვენ ვნახეთ, რომ ნობილეტინი ამცირებს ჟანგბადის მოხმარებას NAD+-თან დაკავშირებული სუბსტრატების დამატებისას (გლუტამატი + მალატი) (სურ. 12A). სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის ინჰიბიტორი, როტენონი ამცირებს ჟანგბადის მოხმარებას საკონტროლო მიტოქონდრიაში, მაგრამ არ ცვლის სუნთქვით აქტივობას ნობილეტინთან ინკუბირებულ მიტოქონდრიის სინჯში. ამის საპირისპიროდ, ნობილეტინი მცირედით ზრდის ჟანგბადის მოხმარებას სუქცინატის, როგორც სუბსტრატის თანაობისას, ხოლო II კომპლექსის ინჰიბიტორის - 3-ნიტროპროპიონის მჟავის, დამატებით ჟანგბადის მოხმარება მცირდება როგორც ნობილეტინთან პრეინკუბირებულ, ასევე საკონტროლო სინჯებში (სურ. 12B).



სურათი 12: თავის ტვინის მიტოქონდრიებში 10 μM ნობილეტინის ეფექტი ჟანგბადის მოხმარებაზე (A) - 10mM გლუტამატისა და 5 mM მალატის თანაობისას და (B) - 5 mM სუქცინატის. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ ხუთი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, t test შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

როტენონისგან განსხვავებით, II კომპლექსის ინჰიბიტორი - 3-NPA, საკმაოდ ეფექტურად ხსნის ნობილეტინის მასტიმულირებელ ეფექტს მიტოქონდრიების სუნთქვით აქტივობაზე, რაც II კომპლექსის ფერმენტული აქტივობის დათრგუნვასთან უნდა იყოს დაკავშირებული.

მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ ნობილეტინის შესაძლო მოლეკულურ სამიზნეს I კომპლექსი წარმოადგენს, ხოლო II კომპლექსის გააქტიურება სავარაუდოდ კომპენსატორულ ხასიათს ატარებს და I კომპლექსის ნაწილობრივი დათრგუნვით და ელექტრონთა რევერსიული ტრანსპორტის ბლოკირებით არის განპირობებული.

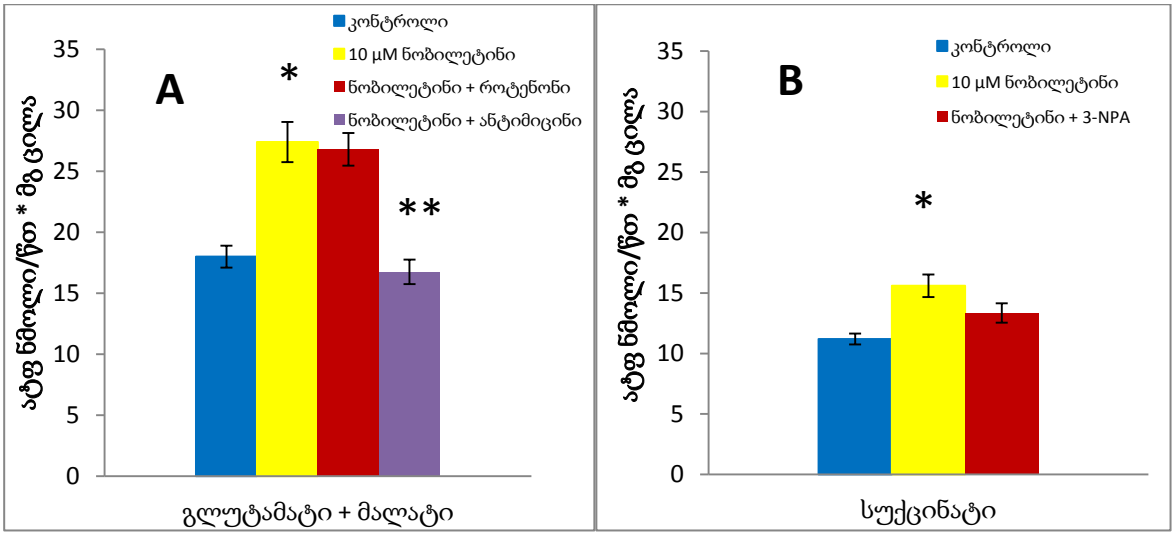
ცნობილია, რომ I კომპლექსის დროებითი გათიშვა ან მისი სრული დისფუნქცია მრავალ პათოლოგიასთან, მათ შორის ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებთან არის დაკავშირებული, რადგან I კომპლექსის სწორი ფუნქციონირება მეტწილად პასუხისმგებელია სუნთქვით ჯაჭვში ელექტრონთა ეფექტურ ტრანსპორტზე და ატფ-ის სინთეზზე. თუ ნობილეტინის მოქმედება განაპირობებს I კომპლექსის დათრგუნვას და ეს ეფექტი დაკავშირებულია ატფ-ის პროდუქციის შემცირებასთან, ამ ნაერთს არ ექნება დადებითი გავლენა მიტოქონდრიის ბიოენერგეტიკაზე, რადგანაც ატფ-ის სინთეზის შემცირება კრიტიკულ და გადამწყვეტ როლს თამაშობს მიტოქონდრიის დაზიანების მექანიზმში და აპოპტოზის ჩართვაში. ამგვარად,

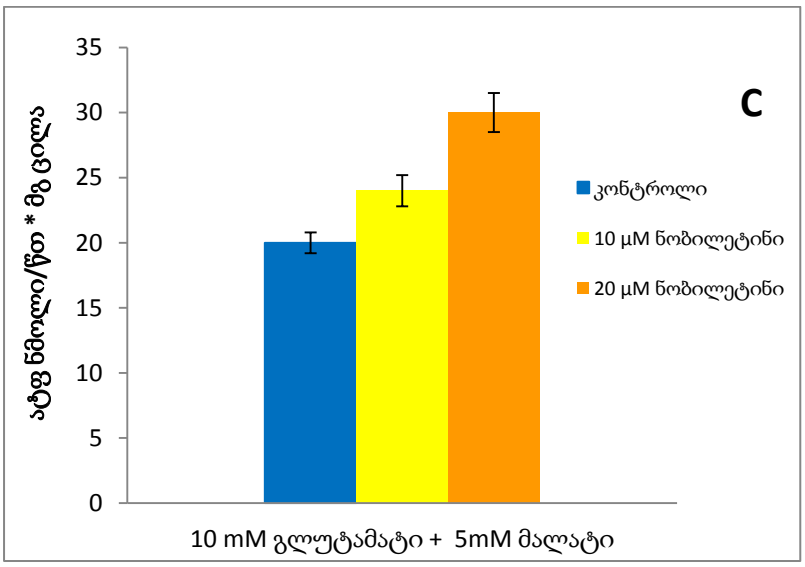
მნიშვნელოვანია დადგინდეს ნობილეტინის ეფექტი მიტოქონდრიის მიერ ატფ-ის პროდუქციაზე.

1.3. მიტოქონდრიების მიერ ატფ-ის პროდუქციის განსაზღვრა

იმისათვის, რომ შეგვესწავლა ჟანგბადის მოხმარების შემცირება კორელირებს თუ არა თავის ტვინის იზოლირებულ მიტოქონდრიებში ჟანგვით ფოსფორილირების ცვლილებასთან, განვსაზღვრეთ მიტოქონდრიის მიერ ატფ-ის პროდუქცია. ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ნობილეტინი არ ამცირებს, არამედ პირიქით, დოზა-დამოკიდებულად ზრდის მიტოქონდრიების მიერ ატფ-ის პროდუქციას პირველი კომპლექსის სუბსტრატების დამატებისას (სურ. 13 C) და ეს მომატება როტენონ არამგრძნობიარე ხასიათს ატარებს.

როტენონის დამატება საინკუბაციო არეში მნიშვნელოვნად ამცირებს ატფ-ის სინთეზს მხოლოდ საკონტროლო სინჯებში და თითქმის არ ცვლის ატფ-ის პროდუქციას ნობილეტინთან თანადროული ინკუბაციის დროს (სურ. 13).





სურათი 13: 10 μM ნობილეტინის ეფექტი ხარის თავის ტვინიდან იზოლირებული მიტოქონდრიების ატფ-ის პროდუქციაზე (A) - 10 mM გლუტამატის, 5 mM მალატის და (B) - 5mM სუქცინატის თანაობისას, (C) - ატფ-ის პროდუქციის ცვლილება ნობილეტინის დოზაზე დამოკიდებულებით. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, t test შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

ნობილეტინის მასტიმულირებელი ეფექტი ატფ-ის პროდუქციაზე მხოლოდ ნაწილობრივ იხსნება II კომპლექსის ინჰიბიტორის - 3-ნიტროპროპიონის მჟავის თანაობისას, რაც სავარაუდოდ განპირობებულია II კომპლექსიდან ელექტრონთა ტრანსპორტის ეფექტურობის ზრდით რევერსიული ტრანსპორტის დათრგუნვის პირობებში. ამის გარდა, III კომპლექსის ჩართულობაზე ამ ეფექტში ჩვენ ვიმსჯელეთ მისი ინჰიბიტორის - ანტიმიცინის გავლენით ნობილეტინით გამოწვეული ატფ-ის სინთეზის მომატებაზე. ჩვენ ვნახეთ, რომ ანტიმიცინ A მნიშვნელოვნად ამცირებს ატფ-ის პროდუქციას ნობილეტინთან ინკუბირებულ სინჯებშიც (სურ. 13A).

ამგვარად, ეს მონაცემები მიგვითითებს იმაზე, რომ ნობილეტინი ზრდის ატფ-ის პროდუქციას როგორც პირველი, ასევე მეორე კომპლექსების საშუალებით. აღნიშნული ეფექტის მექანიზმი შეიძლება მოიცავდეს როგორც მათ პირდაპირ გააქტიურებას, ასევე კომპლესების შესაბამისი სუბსტრატების დონის მატებას.

I და II კომპლექსებზე ნობილეტინის განსხვავებული ეფექტის გადასამოწმებლად მოვახდინეთ სუნთქვითი ჯაჭვის ამ კომპონენტების ფერმენტული

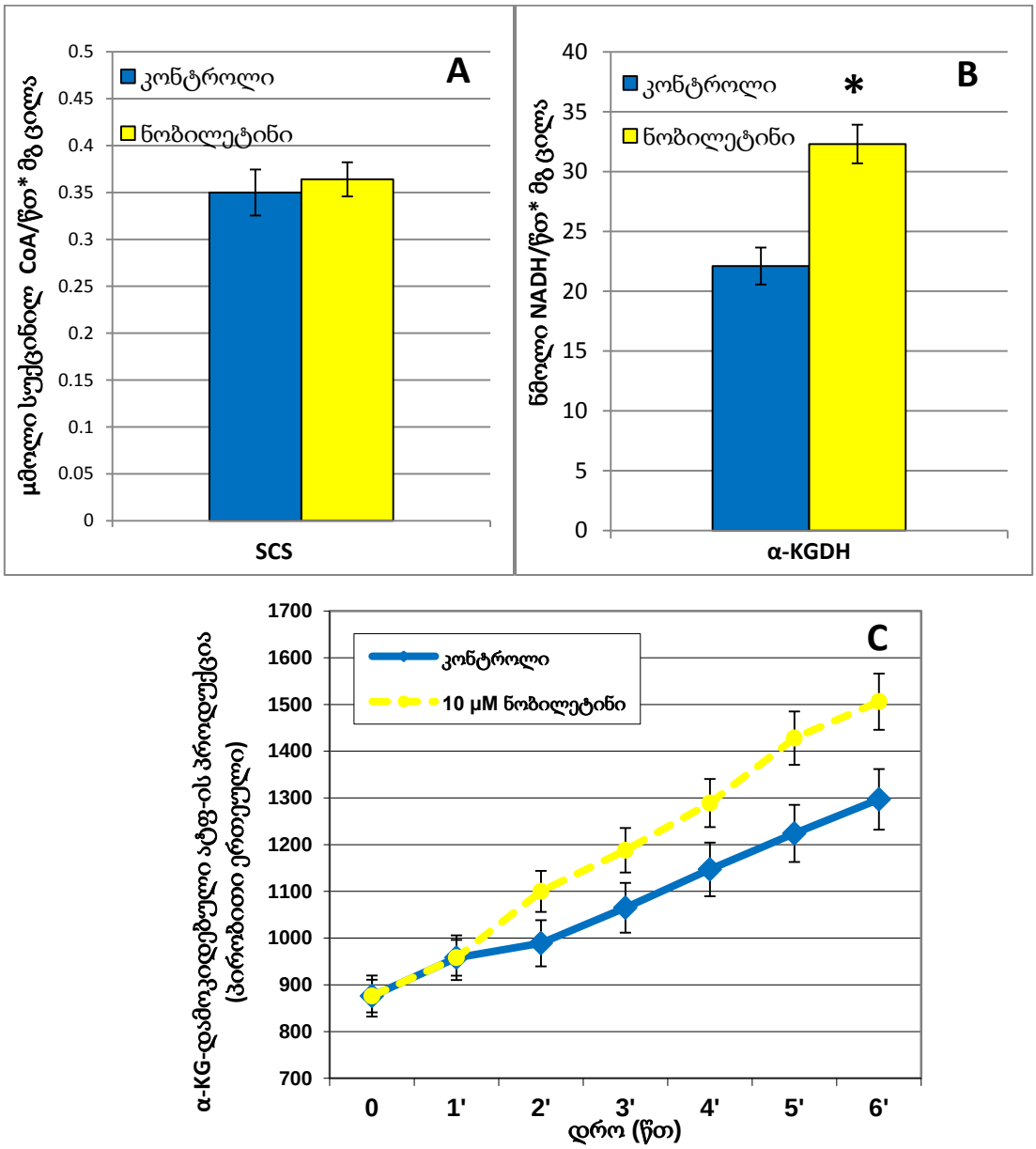
აქტივობის განსაზღვრა. პირველად შესწავლილი იყო ნობილეტინის ეფექტი NADH-დეჰიდროგენაზულ აქტივობაზე.

ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ნობილეტინი ზრდის NADH-დეჰიდროგენაზურ აქტივობას როგორც ინტაქტურ მიტოქონდრიებში, ასევე ულტრაბგერით დამუშავებულ სონიკატებში. გარდა ამისა, როტენონის მაინჰიბირებელი ეფექტი NADH-დეჰიდროგენაზურ აქტივობაზე მნიშვნელოვნად სუსტდება ნობილეტინის თანაობისას. აღმოჩნდა, რომ ანტიმიცინი მთლიანად ხსნის ნობილეტინით გამოწვეულ როტენონ-არამგრძნობიარე NADH-დეჰიდროგენაზურ აქტივობის მატებას, რაც მიგვითითებს III კომპლექსის მონაწილეობაზე ნობილეტინით განპირობებული ელექტრონთა გადაცემის ალტერნატიულ გზაში. შესაძლოა, რომ ნობილეტინის მოქმედება I კომპლექსზე მოიცავს მისი შემადგენელი ფერმენტის ალფა-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას აქტივობის ცვლილებასაც. აქედან გამომდინარე, კვლევის შემდეგ ეტაპზე განსაზღვრული იყო ნობილეტინის გავლენა აღნიშნული ფერმენტის ფუნქციონირებაზე.

1.4. ნობილეტინის მოქმედება α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზაზე

α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზული კომპლექსი წარმოადგენს ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს დეჰიდროგენაზას კრებსის ციკლის ფერმენტებს შორის, ასევე მთავარ NADH-ის წყაროს სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსისასთვის და სუქცინატის წყაროს II კომპლექსისათვის (Anatoly A Starkov 2013). ეს კომპლექსი აკატალიზებს α-კეტოგლუტარატის დეკარბოქსილირებას სუქცინილ-კოენზიმ A-მდე სუქცინილ-CoA-სა და ADP (ან GDP) გარდაქმნით CoASH-მდე, სუქცინატის და ატფ-ის მიღება კატალიზდება სუქცინილ-CoA-ლიგაზით (SCL). ამ ფერმენტების მონაწილეობის შესასწავლად ნობილეტინით გამოწვეულ ეფექტებში, ჩვენ გავზომეთ α-KGDH და SCL აქტივობა თავის ტვინის ქერქიდან იზოლირებულ მიტოქონდრიებში ნობილეტინის თანაობისას. აღმოჩნდა, რომ ნობილეტინი შერჩეული კონცეტრაციით (10μM) აძლიერებს α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზის აქტივობას, ხოლო SCL-ის აქტივობაზე არ აქვს არანაირი ეფექტი (სურ. 14 A და B). α-KGDH ფერმენტის

აქტივობის მომატება ნერვულ უჯრედში შეიძლება განიხილებოდეს როგორც სუბსტრატული ფოსფორილების ინტენსივობის მატებად და შესაბამისად ატფ-ის პროდუქციის დამატებით წყაროდ.



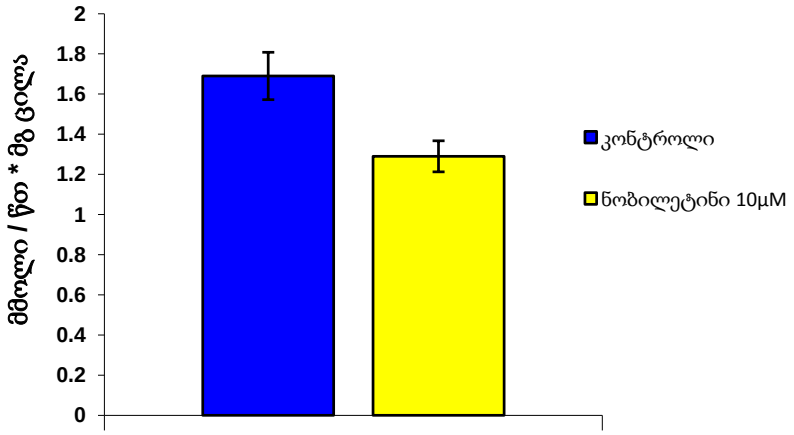
სურათი 14: ნობილეტინის მოქმედება α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზაზე. (A) 10 μM ნობილეინის ეფექტი SCS-ზე და (B) α-KGDH-ის აქტივობაზე თავის ტვინის მიტოქონდრიებში. (C) α-KG დამოკიდებული ატფ-ის პროდუქცია. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, t test შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზა ლიმონმჟავა ციკლის ფერმენტს წარმოადგენს და მისი პროდუქტი - სუქცინილ კოენზიმ A ფერმენტ თიოკინაზას მეშვეობით სწრაფად გარდაიქმნება სუქცინატად და ამ რეაქციის დროს ადფ-ისგან სინთეზირდება ატფ. ნობილეტინის სუსტრატულ ფოსფორილებაზე ეფექტის გადასამოწმებლად განსაზღვრული იყო α-კეტოგლუტარატ-განპირობებული ატფ-ის სინთეზი.

α-კეტოგლუტარად-დამოკიდებული NADH-ის დაჟანგვის გაზრდას მივყავართ KGDH-SCL შეუღლებული რეაქციის მიერ მიღებული პროდუქტების, ანუ ატფ-ისა და სუქცინატის რაოდენობის მატებასთან. ამის გადასამოწმებლად ცდების შემდგომ ეტაპზე განვსაზღვრეთ α-კეტოგლუტარატ-დამოკიდებული ატფ-ის პროდუქცია. შეუღლებული KGDH-SCL-ის რეაქციას ვსაზღვრავდით II კომპლექსის (SDH) შეუქცევადი ინჰიბიტორის 3-ნიტროპროპიონის მჟავის და როტენონის თანაობისას. რომ გამოგვერიცხა KGDH-SCL კომპლექსის აქტივობის ინჰიბირება რექაციის პროდუქტებით (მაგ. სუქცინატით), ფერმენტული რეაქციის მხოლოდ საწყის ეტაპს ვზომავდით. ექსპერიმენტის შედეგებიდან გამომდინარე აღმოჩნდა, რომ ნობილეტინი მნიშვნელოვნად ზრდის α-კეტოგლუტარად-დამოკიდებულ ატფ-ის პროდუქციას (სურ. 14C). აქედან გამომდინარე ვივარაუდეთ, რომ ნობილეტინს შეუძლია გაზარდოს ატფ-ის სინთეზი სუბსტრატული ფოსფორილირების გაზრდის გზით, რომელიც სუქცინატის მნიშვნელოვან წყაროს წარმოადგენს სუნთქვითი ჯაჭვის II კომპლექსისათვის.

სუნთქვითი ფოსფორილებისა და ჟანგბადის მოხმარების შემცირების ფონზე, ატფ-ის კომპენსატორულ წყაროდ (სუბსტრატული ფოსფორილების გარდა) ხშირად გვესახება გლიკოლიზური აქტივობის მატება, რასაც ადგილი აქვს მეტაბოლური დარღვევებისა (Jojua et al. 2015) და ავთვისებიანი სიმსივნის დროს. ამ პროცესების შესწავლის მიზნით განსაზღვრული გლიკოლიზური აქტივობის ერთ-ერთ მარკერის - ფერმენტ ჰექსოკინაზას აქტივობა.

1.5. ნობილეტინის გავლენა ჰექსოკინაზის აქტივობაზე



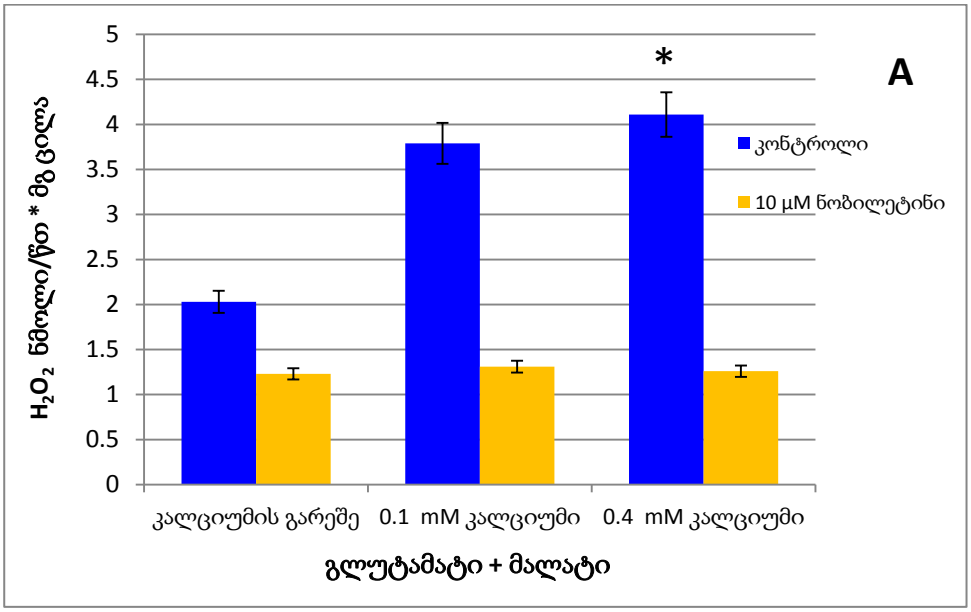
სურათი 15: 10 μM ნობილეტინის გავლენა ჰექსოკინაზის აქტივობაზე. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის (თითოში სამ-სამი პარალელური სინჯები) შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, ANOVA პროგრამით შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

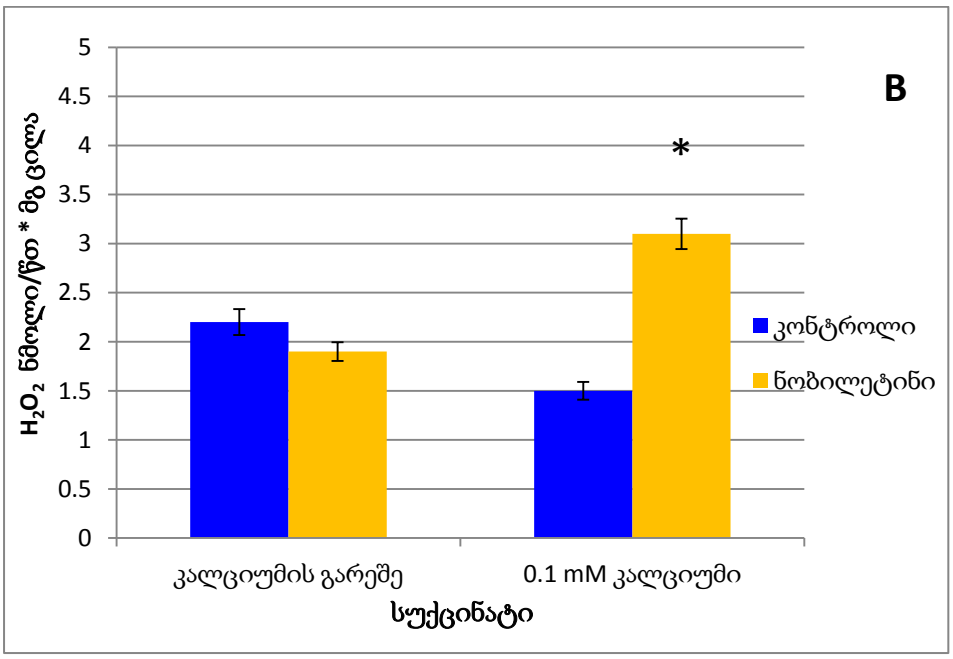
ნობილეტინი გამოყენებული კონცენტრაციით განაპირობებს მიტოქონდრიული ჰექსოკინაზური აქტივობის სუსტ ინჰიბირებას (სურ. 15), რაც კიდევ ერთხელ ამტკიცებს ნობილეტინის ანტისიმსივნურ პოტენციალს. ამასთან ერთად, ნობილეტინი მოქმედებს როგორც ერთგვარი შეუღლების „გამთიშველი“, რომელიც α-კეტოგლუტარატ დეჰიდროგენაზის აქტივობისა (α-KGDH-კომპლექსის) და მატრიქსის სუბსტრატული ფოსფორილირების გაზრდით ხელს უწყობს მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის შენარჩუნებას ნორმალურ დონეზე. მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის ამ ტიპის გადართვამ შესაძლებელია გაზარდოს სუქცინატით გამოწვეული ჟანგბადის მოხმარება, რაც საფუძვლად უდევს ნობილეტინის როგორც პრო ასევე ანტი - აპოპტოზურ ეფექტს.

მიტოქონდრიის სუნთქვითი ჯაჭვის ინტენსივობის ცვლილებას ხშირად თან ახლავს ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნის გაძლიერება. აღნიშნულ პროცესს გარკვეული სასიგნალო ფუნქცია აკისრია და ჩართულია პრო- და ანტი აპოპტოზურ მექანიზმებშიც.

KGDHC კომპლექსი წარმოადგენს კალციუმ-მგრძნობიარე მეტაბოლიზმის ცენტრალურ კომპლექს, რომელიც წარმოქმნის თავისუფალ რადიკალებს (ROS) და ამავდროულად კონტროლდება მათი კონცენტრაციით (Han, Williams, and Cadenas 2001; A. A. Starkov et al. 2004; Tretter and Adam-Vizi 2004). მიტოქონდრიის მიერ ROS-ის პროდუქცია ძირითადად კონტროლდება Ca^{2+}-ით (Adam-Vizi and Starkov 2010). აქედან გამომდინარე, შემდეგ ექსპერიმენტებში განსაზღვრული იყო ნობილეტინის გავლენა მიტოქონდრიების მიერ წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნაზე Ca^{2+}-ის თანაობისას.

1.6. ნობილეტინის გავლენა მიტოქონდრიების მიერ წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნაზე Ca^{2+}-ის თანაობისას



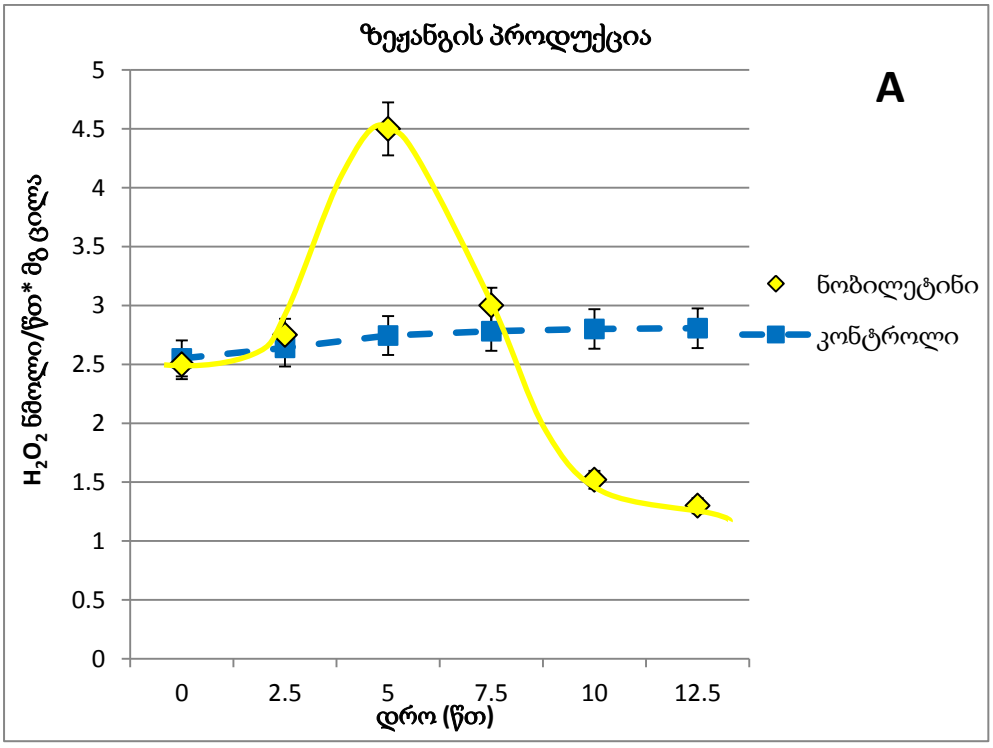


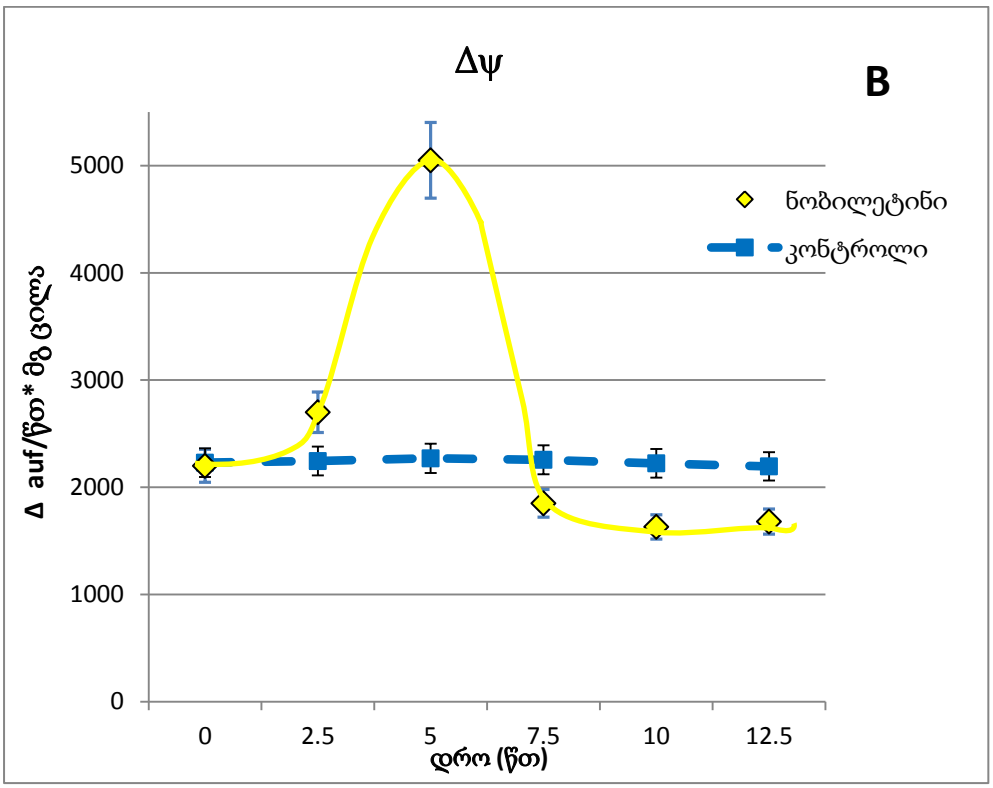
სურათი 16: თავის ტვინის მიტოქონდრიებზე ნობილეტინის 10μM ეფექტი Ca^{2+}-ით გამოწვეულ პეროქსიდების პროდუქციაზე (A) სუნთქვითი ჯაჭვის პირველი კომპლექსის სუბსტრატების გლუტამატი+მალატისა და (B) მეორე კომპლექსის სუბსტრატის სუქცინატის თანაობისას. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის (თითოში სამ-სამი პარალელური სინჯები) შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, ANOVA პროგრამით შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

ჩვენი კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე აღმოჩნდა, რომ Ca^{2+} 0.1 mM კონცენტრაციით ზრდის თავისუფალი რადიკალების პროდუქციას როდესაც სუბსტრატებად გამოყენებული გვქონდა გლუტამატი/მალატი, სუთქვითი ჯაჭვის ე.წ. state 3, ხოლო ნობილეტინი Ca^{2+}-ის თანაობისას ამცირებს ROS-ის პროდუქციას (სურ. 16A). ნობილეტინი მცირედით ზრდის სუქცინატ-დამოკიდებულ ROS-ის პროდუქციას (სურ. 16B) როგორც როტენონის დამატებისას, ასევე მისი არყოფნის შემთხვავაშიც. ეს მონაცემები მიუთითებს იმაზე, რომ ნობილეტინი ამცირებს Ca2+-ის მაღალი კონცენტრაციით გამოწვეულ წყალბადის ზეჟანგის პროდუქციას, მხოლოდ I კომპლექსის სუბსტრატების თანაობისას, რაც ნიშნავს იმას, რომ ნობილეტინი ამცირებას პეროქსიდების წარმოქმნას სუნთქვითი ჯაჭვის პირველ კომპლექსზე მოქმედებით (სურ. 16).

1.7. ზეჟანგის პროდუქციის და მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის ცვლილება

გაირკვა, რომ წყალბადის ზეჟანგის პროდუქცია დამოკიდებულია მიტოქონდრიასთან ნობილეტინის ინკუბაციის დროზე. ნობილეტინის ინკუბაციის საწყის პერიოდში (3-5 წთ) ნობილეტინი ზრდის ROS-ის წარმოქმნას, მაშინ როცა ინკუბაციის პერიოდის გაზრდისას (7-10 წთ) მცირდება პეროქსიდის წარმოქმნის რაოდენობა.



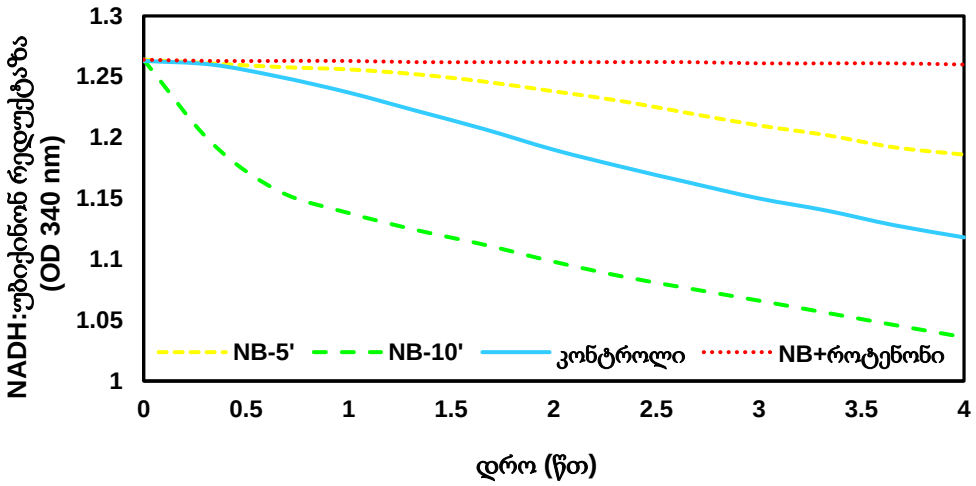


სურათი 17: ნობილეტინთან ინკუბაციის ხანგრძლივობის გავლენა წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნაზე (A) და მიტოქონდრიული მემბრანული პოტენციალი (B) 10 μM ნობილეტინთან ინკუბაციის შემდგომ. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის (თითოში ორი პარალელური სინჯები) შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, t test შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

თავისუფალი რადიკალების ამ ტრანზიტორულ მომატებას თან სდევს მემბრანული პოტენციალის (ΔΨm) სწრაფი ცვლილება. ნობილეტინი აგრეთვე მცირედით, ტრანზიტორულად ზრდის მიტოქონდრიების მემბრანულ პოტენციალს. მემბრანული პოტენციალის (ΔΨm) ასეთი ტრანზიტორული ხასიათი დროში ემთხვევა წყალბადის გენერაციის ინტენსივობის ცვლილებას (სურ. 17A). ნობილეტინის დამატების შემდგომ უწყვეტად იზრდებოდა ΔΨm-ის დონე პირველი 5 წუთის განმავლობაში, შემდგომში კი აღინიშნა საწყის დონემდე შემცირება (სურ. 17B).

გამომდინარე იქიდან, რომ სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი შესაძლებელია წარმოადგენდეს პეროქსიდების ძირითად წყაროს, შემდგომ ექსპერიმენტში განვსაზღვრეთ NADH: უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობის დამოკიდებულება ნობილეტინთან ინკუბაციის ხანგრძლივობაზე.

1.8. NADH:უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობა



სურათი 18: NADH: უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობა 10 μM ნობილეტინის 5 წთ და 10 წთ-იანი პრე-ინკუბაციის შემდეგ. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, t test შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

ჩვენს მიერ ნანახი იყო, რომ იზოლირებულ მიტოქონდრიასთან ფლავონოიდის 5 წუთიანმა ინკუბაციამ გამოიწვია NADH:უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობის ინჰიბირება, როდესაც 10 წუთამდე ინკუბაციის დროის გაზრდამ მოგვცა საპირისპირო შედეგი - NADH:უბიქინონ რედუქტაზის აქტივობა გაიზარდა (სურ. 18). ნათელია, რომ ნობილეტინის მოქმედების შედეგად თავისუფალი რადიკალების პროდუქციის მიღებული დროებითი ცვლილება, ისევე როგორც, საწყის ეტაპზე NADH-ის დაჟანგვის ინჰიბირებამ შესაძლებელია გამოიწვიოს I კომპლექსების სუბერთეულების რეორიენტაცია.

ასევე გასაზღვრული იყო NADH-დეჰიდროგენაზური აქტივობა, ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ნობილეტინი ზრდის NADH-დეჰიდროგენაზურ აქტივობას როგორც ინტაქტურ მიტოქონდრიებში, ასევე ულტრაბგერით დამუშავებულ სონიკატებში. გარდა ამისა, როტენონის მაინჰიბირებელი ეფექტი NADH-დეჰიდროგენაზურ აქტივობაზე მნიშვნელოვნად სუსტდება ნობილეტინის თანაობისას. აღმოჩნდა, რომ ანტიმიცინი მთლიანად ხსნის

ნობილეტინით გამოწვეულ როტენონ-არამგრძნობიარე NADH-დეჰიდროგენაზურ აქტივობის მატებას, რაც მიგვითითებს III კომპლექსის მონაწილეობაზე ნობილეტინით განპირობებული ელექტრონთა გადაცემის ალტერნატიულ გზაში. შესაძლოა, რომ ნობილეტინის მოქმედება I კომპლექსზე მოიცავს მისი შემადგენელი ფერმენტის ალფა-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას აქტივობის ცვლილებასაც. აქედან გამომდინარე, კვლევის შემდეგ ეტაპზე განსაზღვრული იყო ნობილეტინის გავლენა აღნიშნული ფერმენტის ფუნქციონირებაზე.

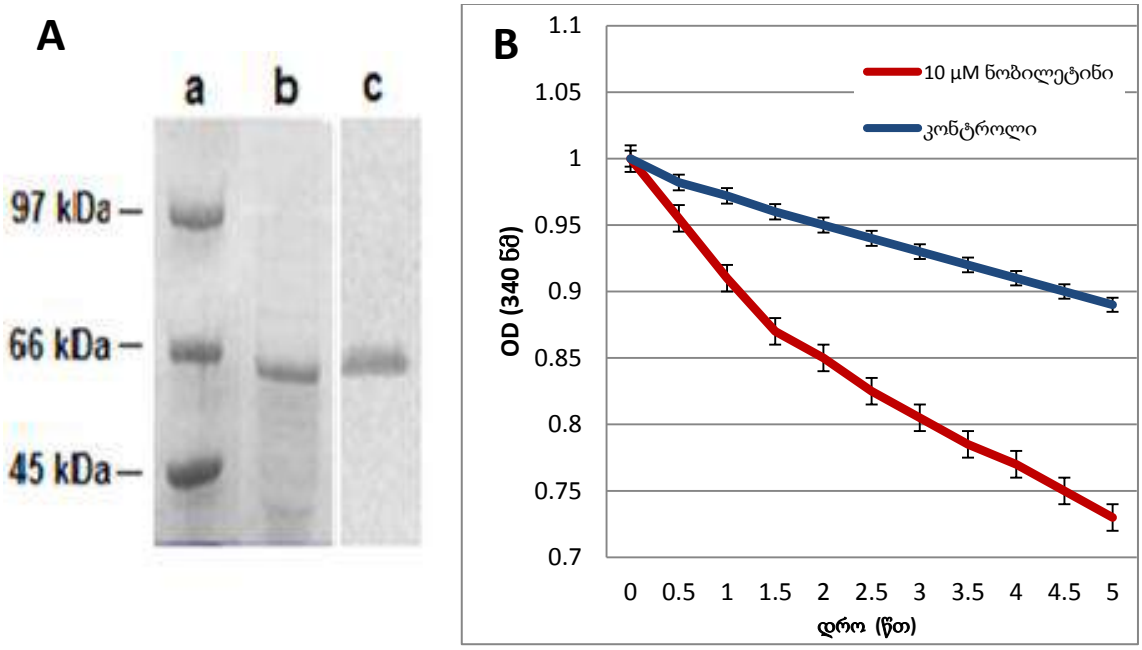
ნობილეტინის მიტოქონდრიაში პირდაპირი სამიზნის იდენტიფიცირებისათვის, ჩვენ გამოვიყენეთ აფინური ქრომატოგრაფიის სვეტი სეფაროზა-4B (Sepharose-4B), რომელზეც მიბმული იყო 3-ჰიდროქსინობილეტინი.

1.9. აფინური ქრომატოგრაფია და ვესტერნ ბლოტინგი

გამოყოფილ მიტოქონდრიულ მემბრანებში აფინური ქრომატოგრაფიის ექსპერიმენტმა გამოავლინა ერთი ძირითადი - ნობილეტინ- დამაკავშირებელი ცილა მოლეკულური მასით 52 kD-ით და რამოდენიმე დაბალი მოლეკულური წონის მქონე მცირე პეპტიდები (სურ. 19A, ხაზი b). აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული ცილოვანი ფრაქცია ვესტერნ ბლოტინგის ექსპერიმენტების საშუალებით კი იმუნოლოგიურად მონიშნული იყო ანტი-NDUFV1 (NADH დეჰიდროგენაზა (უბიქინონი) ფლავოპროტეინი 1) ანტისხეულით (სურ. 19A, ხაზი c). ამ ფრაქციის სპექტროსკოპულმა ანალიზმა გვაჩვენა, რომ ულტრაიისფერი-ხილული შთანთქმის სპექტრი ხასიათდებოდა [4Fe-4S] კლასტერით (Orme-Johnson and Orme-Johnson 1978), შთანთქმის წერტილით დაახლოებით 400 nm (მონაცემები არ არის წარმოდგენილი). ეს ცილოვანი კომპლექსი აკატალიზებს NADH:უბიქინონ რედუქტაზის რეაქცია, რომელიც იზრდებოდა ნობილეტინის დამატებისას (სურ. 19B). ეს მონაცემები მიგვითითებას იმაზე, რომ ნობილეტინის ერთ-ერთ სავარაუდო სამიზნეს სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის NDUFV1 სუბერთეული წარმოადგენს.

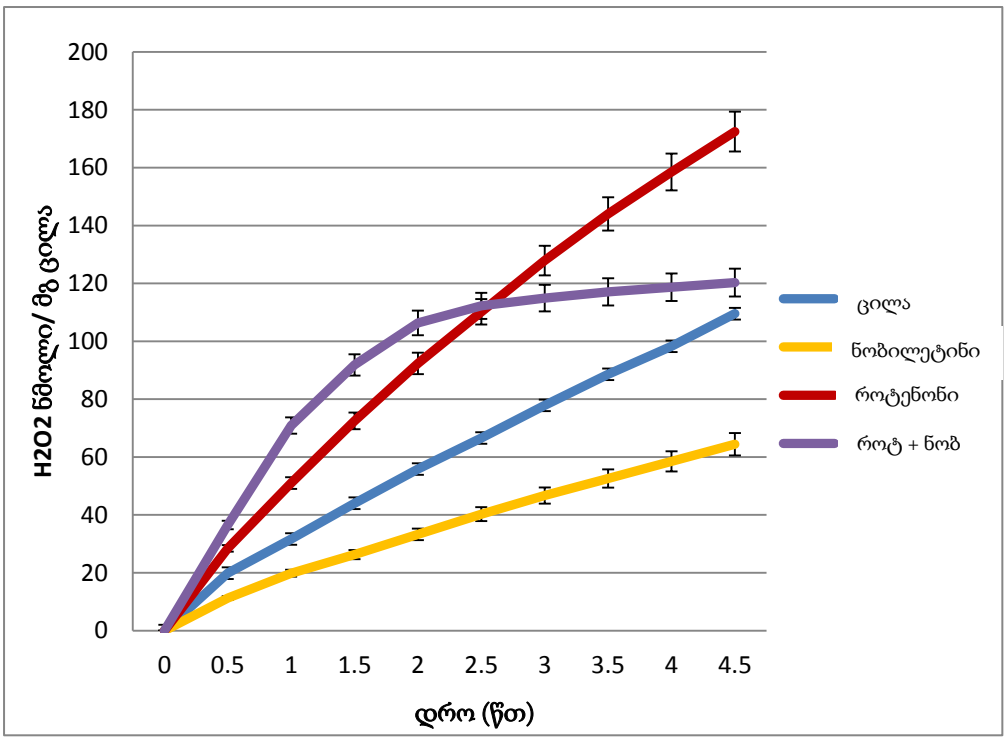
როგორც უკვე ავღნიშნეთ, სუნთქვთი ჯაჭვის I კომპლექსი წარმოადგენს თავისუფალი რადიკალების პროდუქციის ერთ-ერთ ძირითად წყაროს. აქედან

გამომდინარე საინტერესო გახდა განგვესაზღვრა აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული ფრაქციის პეროქსიდების წარმოქმნის აქტივობა. აღმოჩნდა, რომ ეს ცილა წარმოქმნის პეროქსიდებს და ROS-ის აღნიშნული პროდუქცია იზრდება როტენონის დამატებისას.



სურათი 19: ცილების შემადგენლობა და ნობილეტინ დამაკავშირებელი ცილის NADH: უბიქინონ რედუქტაზული აქტივობა. (A) მიტოქონდრიული ცილის ფრაქცია, რომელიც გასუფთავებულია 3-ჰიდროქსინობილეტინით - სეფაროზის აფინურ სვეტზე და განსაზღვრული იყო SDSPAGE გელზე. გელი შეღებილია კუმასის ლურჯით (Coomassie Brilliant Blue) G-250 (a ხაზი - ცილების სტანდარტი, b ხაზი - აფინურად გასუფთავებული ცილა), ან იმუნოლოგიურად მონიშნულია პოლიკლონური ანტი-NDUFV1 ანტისხეულით (ხაზი c). (B) აფინურად გასუფთავებული ცილის NADH: უბიქინონ რედუქტაზული აქტივობის ცვლილება დროში როგორც ნობილეტინის თანაობისას ასევე მის გარეშე.

გარდა ამისა, ფრაქციაში ნობილეტინის დამატება მნიშვნელოვნად ამცირებს როტენონ-მგრძნობიარე, ისევე როგორც როტენონ-არამგრძნობიარე H_2O_2-ის სინთეზს. საინტერესოა, რომ ნობილეტინი ხსნის როტენონის ეფექტს მხოლოდ დროის გარკვეული ინტერვალის შემდეგ (სურ. 20). ეს მონაცემები, კიდევ ერთხელ ამტკიცებს იმ მოსაზრებას, რომ ნობილეტინს შეუძლია I კომპლექსის სუბერთეულების რეორიენტაცია.



სურათი 20. მიტოქონდრიული ნობილეტინ დამაკავშირებელი ცილის პეროქსიდების პროდუქცია.

თავი 2. საფუარის ორ სხვადასხვა შტამზე მიღებული შედეგები

ზემოთ ხსენებული შედეგებიდან გამომდინარე ვივარაუდეთ, რომ ნობილეტინი უბისემიქინონის ფორმაციის გარეშე ცვლის ელექტრონთა გადაცემას სუნთქვითი ჯაჭვის I და III კომპლექსებს შორის. დღეს-დღეობით მსგავსი ტიპის მექანიზმი ძუძუმწოვართა უჯრედებში არ არის ცნობილი, თუმცა საფუარების შემთხვევაში არსებობს საკმაოდ დიდი მონაცემები. ძუძუმწოვართა უჯრედებისაგან განსხვავებით Saccharomyces cerevisiae-ს არ გააჩნია სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი და მის ნაცვლად იგი შეიცავს ერთ, როტენონ არამგრძნობიარე NADH:უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზას (Ndi1p) სუბერთეულს, რომელიც პროტონების გადატუმბვაში არ მონაწილეობს. Ndi1p უზრუნველყოფს ალტერნატიულ გზას ელექტრონთა გადაცემას NADH-დან სუნთქვით ჯაჭვში. ეს ფერმენტი აკატალიზებს ორ ელექტრონთა გადაცემის რეაქციას უბისემიქინონის ფორმაციის გარეშე, რითიც მინიმალურად ამცირებს ელექტრონების გაჟონვას და ROS-ების პროდუქციას.

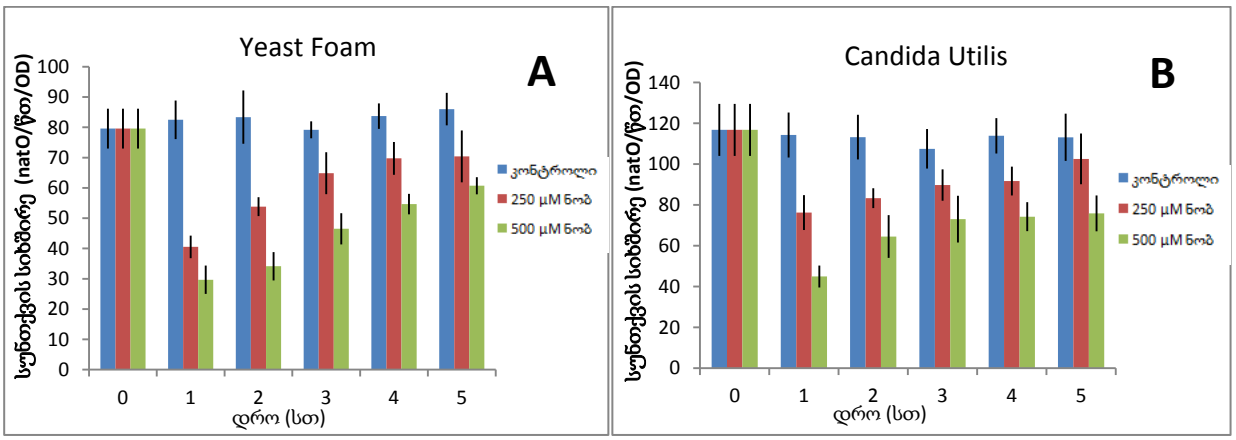
ნობილეტინის მოქმედების და მიტოქონდრიაში მისი მოლეკულური სამიზნის უფრო დეტალურად გამოსაკვლევად ჩვენ გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა ნობილეტინის ეფექტი საფუარის ორ ერთმანეთისაგან ბიოენერგეტიკული მახასიათებლებით განსხვავებულ შტამზე. საფუარის ერთ შტამს - Saccharomyces cerevisiae-ს არ გააჩნია ფოსფორილირების საიტი, ანუ სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი, მაშინ როდესაც, მეორე საფუარის შტამი - Candida Utilis შეიცავს როგორც ელექტონების გადასატუმბ I კომპლექსს, ასევე სუნთქვითი ჯაჭვის ოთხივე კომპლექსს (მსგავსად ძუძუმწოვართა უჯრედებისა).

ორივე ტიპის საფუარის უჯრედები კულტივირებული იყო როგორც ნობილეტინის დამატებისას ასევე მის გარეშე, სფეროპლასტები და მიტოქონდრიები გამოვყავით ორივე შტამის საფუარიდან ნობილეტინის ეფექტის შესასწავლად, რომ გამოგვერიცხა საფუარის უჯრედული კედელის და ციტოზოლური კომპონენტების ფაქტორი. ამ ექსპერიმენტული ნაწილით ჩვენ ვცდილობდით გაგვერკვია ნობილეტინისა და ფლავონოიდების მოქმედების ზუსტი მოლეკულური სამიზნე და მისი ეფექტი საფუარის უჯრედებზე.

2.1. ჟანგბადის მოხმარების გაზომვა საფუარის ინტაქტურ უჯრედებში

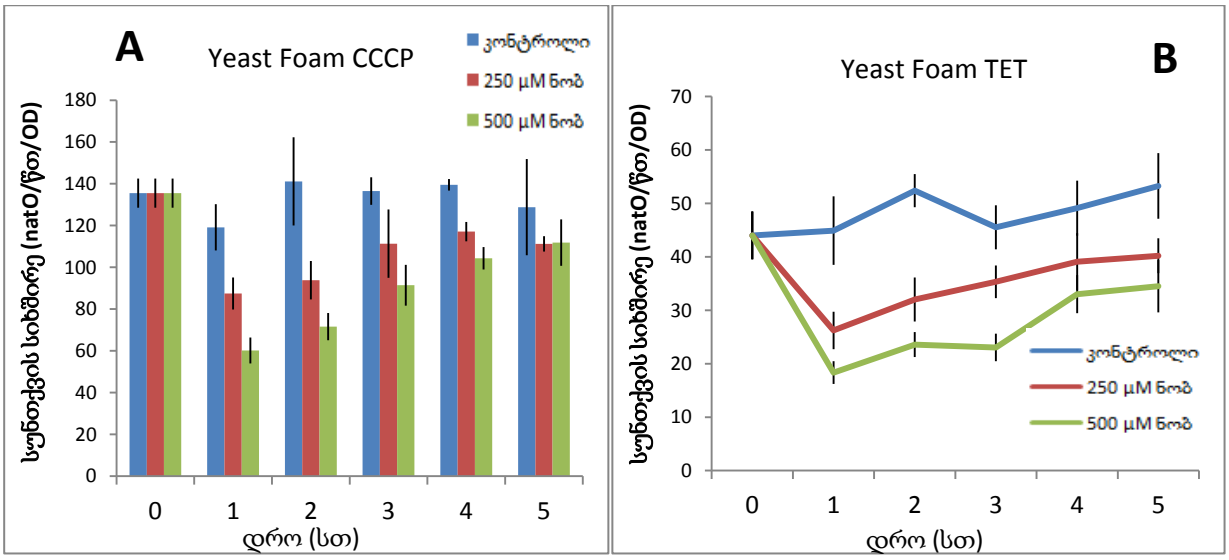
ჩვენი კვლევის პირველ ეტაპზე გავზომეთ ჟანგბადის მოხმარება საფუარის ორივე შტამში როგორც ნობილეტინის თანაობისას, ასევე მის გარეშე. თავდაპირველად განსაზღვრული იყო ორივე შტამის - როგორც Saccharomyces cerevisiae (Yeast Foam), ასევე Candida Utilis ინტაქტური უჯრედების სუნთქვა. საფუარის Candida utilis-ის შტამს გააჩნია პროტონული ტუმბო, სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსი (Avéret et al. 2015) , მაშინ როდესაც საფუარის მეორე შტამს - yeast foam-ს გააჩნია 2 გარეთა და ერთი შიდა NADH დეჰიდროგენაზა. საწყის ეტაპზე, იმისათვის, რომ შეგვერჩია ნობილეტინის ოპტიმალური კონცენტრაცია მისი ეფექტის სანახავად გამოვიყენეთ სხვადასხვა კონცენტრაციები: 1μM; 10μM; 100μM; 200μM; 250μM; 500μM; 1mM. გამოყენებული კონცენტრაციებიდან 250μM და 500μM აღმოჩნდა ეფექტური კონცენტრაცია.

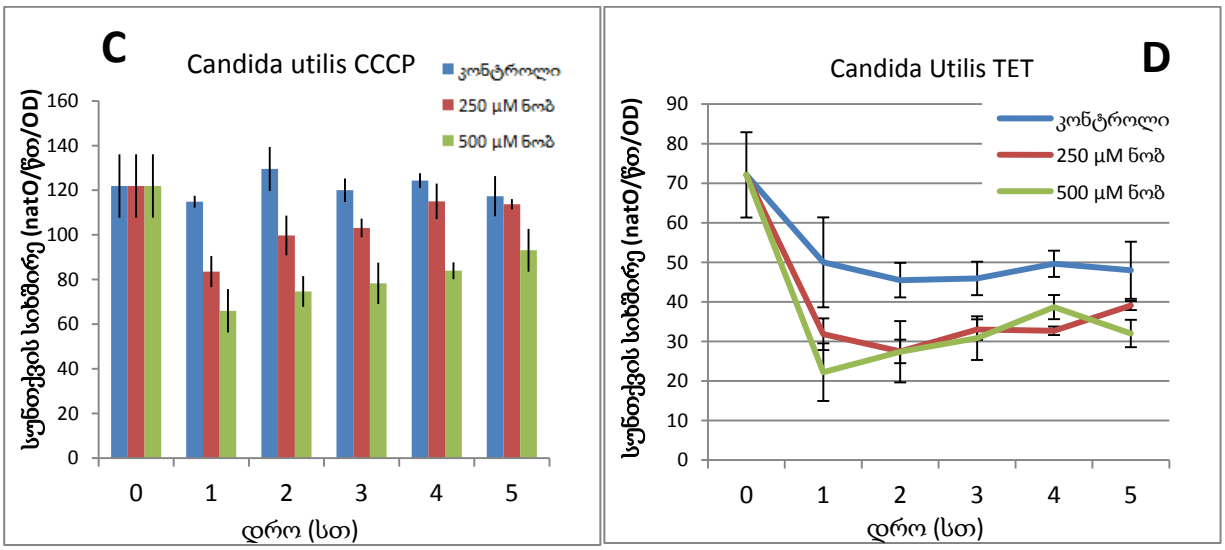
ნობილეტინის თანაობისას ვნახეთ, რომ საფუარის უჯრედული სუნთქვა (ჟანგბადის მოხმარება) იყო სტაბილური მთელი ექსპერიმენტების განმავლობაში (სურ. 21 A და B). ნობილეტინის დამატებისას კი (250 და 500μM კონცენტრაციით), ორივე საფუარის შტამში სპონტანური უჯრედული სუნთქვა მცირდებოდა (დაახლოებით 65%-ით) (სურ. 21 A და B). ნობილეტინთან 1 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ, ინჰიბირებული სპონტანური უჯრედული სუნთქვა მცირედით იზრდებოდა, ხოლო 5 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ კი საწყისი ინჰიბირების ძალიან მცირე ნაწილი ფასდებოდა საფუარის ორივე უჯრედულ შტამებში (სურ. 21 A და B).



სურათი 21: ნობილეტინის გავლენა Yeast foam-ისა და Candida utilis-ის უჯრედულ სუნთქვაზე. სუნთქვის სიხშირე ფასდებოდა მინიმალურ საკვებ არეზე (რომელიც შეიცავდა 2% (w/v) DL-ლაქტატს) აერობულად გაზრდილ საფუარის ინტაქტურ უჯრედებზე. სპონტანური სუნთქვითი სიხშირე ფასდებოდა პირდაპირ უჯრედების ზრდის არეში. (A) - Yeast foam (B) - Candida utilis. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ მინიმუმ სამ დამოუკიდებელ ექსპერიმენტს, რომელიც შესრულებულია სამი დამოუკიდებელი საფუარის უჯრედული კულტურით, შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. ANOVA, *P<0.05, შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

იმისათვის, რომ გაგვერკვია სპონტანური უჯრედული სუნთქვის ინჰიბირება გამოწვეული იყო მიტოქონდრიული სუნთქვითი ჯაჭვის ინჰიბირებით და/ან მაფოსფორილებელი სისტემებით, კვლევის შემდგომ ეტაპზე განვსაზღვრეთ საფუარის ორივე შტამში სუნთქვითი აქტივობა მაღალეფექტური შეუღლების გამთიშველის (uncoupler) – CCCP-ის თანაობისას.





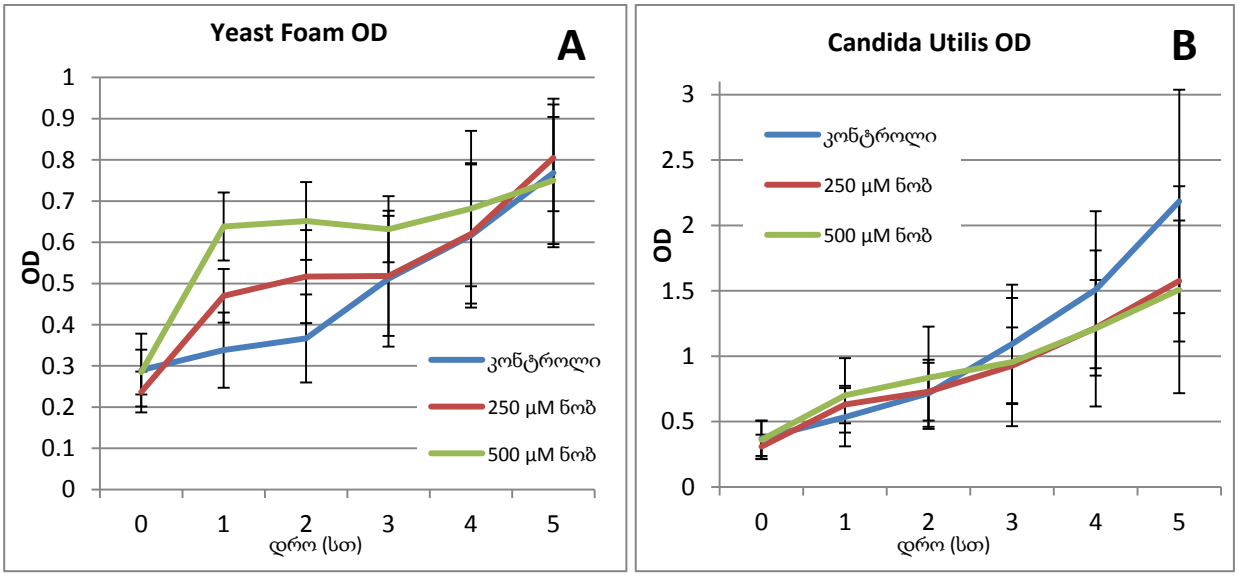
სურათი 22: ნობილეტინის გავლენა საფუარის Yeast Foam-ისა და Candida Utilis-ის ჟანგბადის მოხმარებაზე ატფ-აზის ინჰიბიტორ TET-ისა და შეუღლების გამთიშავის CCCP-ის თანაობისას. სუნთქვის სიხშირე ფასდებოდა მინიმალურ საკვებ არეზე (რომელიც შეიცავდა 2% (w/v) DL-ლაქტატს) აერობულად გაზრდილ საფუარის ინტაქტურ უჯრედებზე. სუნთქვის სიხშირე ფასდებოდა 0.2 mM ტრიეთილთინის (რომელიც აღნიშნულია როგორც TET) და შეუღლების გამთიშავის 10 µM კარბონილ ციანიდ p-ქლოროფენილჰიდრაზონის (CCCP) თანაობისას. (A) - Yeast foam-ის მიერ ჟანგბადის მოხმარება შეუღლების გამთიშავის თანაობისას (B) - Yeast foam-ის არაფოსფორილირებადი სუნთქვის სიხშირე (TET) (C) - Candida utilis-ის -ის მიერ ჟანგბადის მოხმარება შეუღლების გამთიშავის თანაობისას, (D) - Candida Utilis-ის არაფოსფორილირებადი სუნთქვის სიხშირე (TET). სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ მინიმუმ სამ დამოუკიდებელ ექსპერიმენტს, რომელიც შესრულებულია სამი დამოუკიდებელი საფუარის უჯრედული კულტურით, შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. ANOVA, *P<0.05, შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

ექსპერიმენტში ნობილეტინის არარსებობისას შეუღლებული სუნთქვითი სიხშირე ყველა ექპერიმენტში იყო თითქმის ერთნაირად სტაბილური (სურ. 22 A და B). ვნახეთ, რომ ნობილეტინი კონცენტრაციაზე და დროზე დამოკიდებულებით ამცირებს ჟანგბადის მოხმარებას საფუარის ორივე შტამის შემთხვევაში. ნობილეტინის დამატებისას (250 µM და 500 µM კონცენტრაციით), შეუღლებული სუნთქვის სიხშირე (uncoupled respiratory rate) ძალზედ მცირდებოდა (Yeast Foam-ის უჯრედულ ხაზში დაახლოებით 60%-ით ხოლო Candida Utilis-ის უჯრედებში დაახლოებით 50%-ით) (სურ. 22 A და C). ნობილეტინთან 1 საათიანი ინკუბაციის შემდგომ სპონტანური უჯრედული სუნთქვა ნელ-ნელა უბრუნდება საწყის

მდგომარეობას, იწყებს ზრდას და 5 საათის შემდგომ თითქმის უბრუნდება სუნთქვის საწყის სიხშირეს (სურ. 22 A და B).

არა-ფოსფორილირებად სუნთქვის პირობებში (TET, სურ. 22 B) ნობილეტინის თანაობისას Yeast Foam-ის უჯრედების სუნთქვა ინჰიბირებულია, მსგავსი შედეგი მივიღეთ სპრონტანურ და შეუღლების გამთიშველის (ანქაფლერის) დამატების დროს მიღებულ ექსპერიმენტულ შედეგებში, ანალოგიური შედეგები მივიღეთ Candida Utilis-ის უჯრედულ ხაზზეც (სურ. 22 C და D).

ჟანგბადის მოხმარების გაზომვის პარალელურად ვზომავდით უჯრედების რაოდენობას, რომლის სარწმუნო მაჩვენებელს უჯრედების 600 nm ტალღის სიგრძეზე ოპტიკური სიმკვრივის (OD-ს) მნიშვნელობა წამოადგენს (Devin et al. 2006).



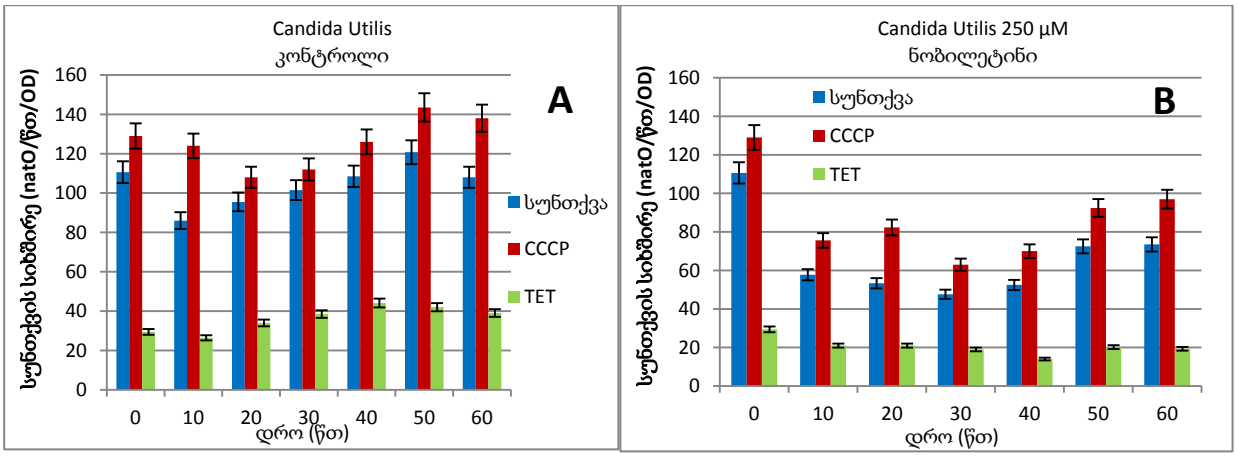
სურათი 23. ინტაქტური უდრედების რაოდენობა (OD) 5 საათის განმავლობაში. (A) - Yeast Foam-ის ინტაქტური უჯრედების რაოდენობა, (B) - Candida Utilis-ის ინტაქტური უჯრედების რაოდენობა. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ ექვს დამოუკიდებელ ექსპერიმენტს, რომელიც შესრულებულია ექვსი დამოუკიდებელი საფუარის უჯრედული კულტურით, შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. ANOVA, *P<0.05, შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

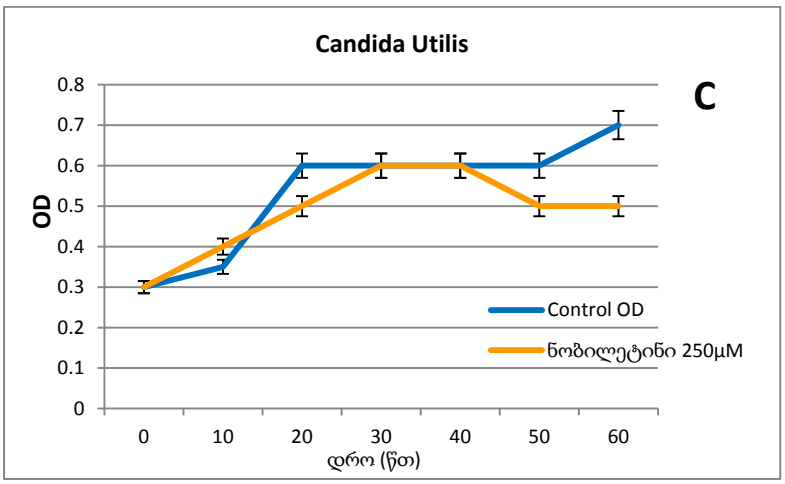
მიუხედავად იმისა, რომ ნობილეტინთან ინკუბირებულ სინჯებში (250μM და 500μM) ჟანგბადის მოხმარება მცირდებოდა, ამის საპირისპიროდ ამ სინჯებში უჯრედების რაოდენობა (Cells OD) გაიზარდა კონტროლთან შედარებით (სურ. 23 A და B). აღნიშნული ეფექტი კონცენტრაცია-დამოკიდებულ ხასიათს ატარებს. აღსანიშნავია, რომ უჯრედების რაოდენობის მატება განსაკუთრებით გამოიკვეთა Yeast Foam საფუარის უჯრედულ ხაზში პირველი 1 საათის განმავლობაში (სურ. 23A).

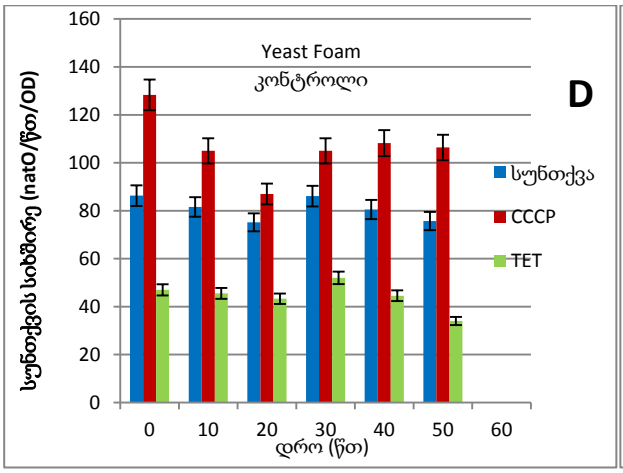
გამომდინარე იქიდან, რომ უჯრედების რაოდენობა განსაკუთრებით სწრაფად იზრდებოდა ნობილეტინთან ინკუბაციის პირველი საათის განმავლობაში, აგრეთვე იმისათვის, რომ უფრო ზუსტად შეგვესწავლა ნობილეტინით გამოწვეული სუნთქვის ინჰიბირება, ჩვენს შემდგომ ექსერიმენტებში გადავწყვიტეთ გაგვეზომა როგორ იცვლება ჟანგბადის მოხმარება და უჯრედების რაოდენობა პირველი 1 საათის განმავლობაში 10 წუთიანი ინტერვალით.

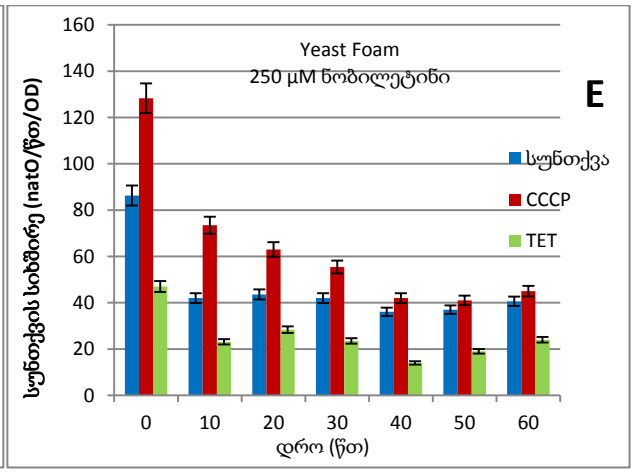
1 საათიანი გაზომვის დროს ვნახეთ, რომ ჟანგბადის მოხმარების ნობილეტინით გამოწვეული ინჰიბირება თავის მაქსიმუმს Candida Utilis-ის უჯრედებში აღწევდა 30 წუთზე (სურ. 24B), რაც ემთხვევა უჯრედების რაოდენობის მაქსიმალურ ზრდას (სურ. 24C), ამ პერიოდის შემდგომ OD გადის პლატოზე, ხოლო შემდგომ ისევ მცირდება.

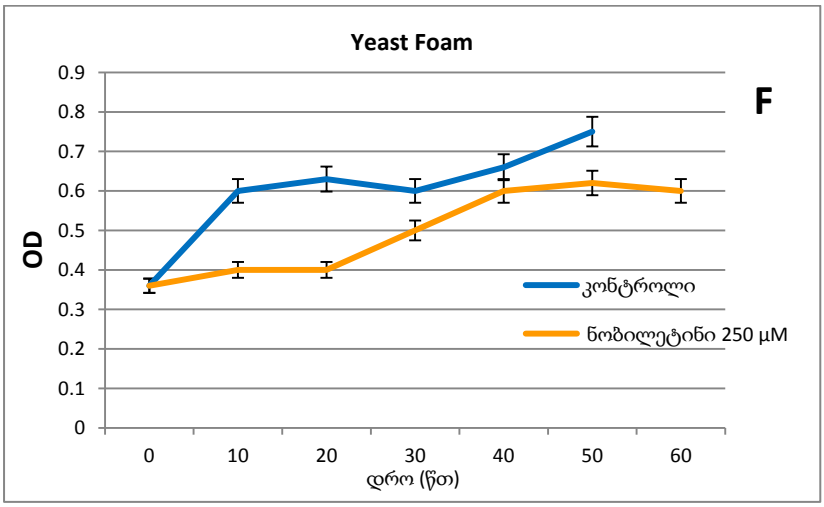
რაც შეეხება Yeast Foam საფუარის შტამის ინტაქტურ უჯრედებს, მათ შემთხვევაში 1 საათიანი გაზომვისას, ვნახეთ რომ ნობილეტინის მიერ ჟანგბადის მოხმარების ინჰიბირება მაქსიმუმს აღწევდა 40 წუთზე (სურ. 24 E), რაც ასევე ემთხვევა უჯრედების პროლიფერაციის მაქსიმუმს, ხოლო ამ პერიოდის შემდგომ უჯრედების რაოდენობა გადის პლატოზე (სურ. 24 F).









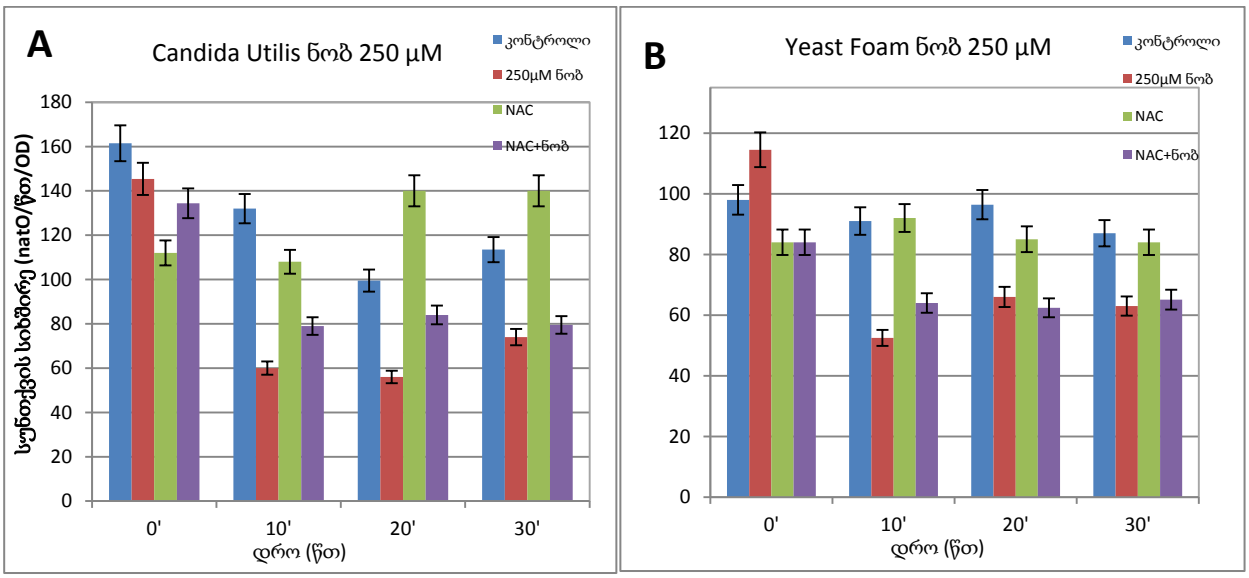


სურათი 24. ნობილეტინის გავლენა საფუარის Candida Utilis-ისა და Yeast Foam-ის უჯრედების ჟანგბადის მოხმარებაზე და უჯრედების რაოდენობაზე 1 საათის განმავლობაში, გაზომილი ყოველ 10 წუთში. სუნთქვის სიხშირე ფასდებოდა მინიმალურ საკვებ არეზე (რომელიც შეიცავდა 2% (w/v) DL-ლაქტატს) აერობულად გაზრდილ საფუარის ინტაქტურ უჯრედებზე. სპონტანური სუნთქვითი სიხშირე ფასდებოდა 0.2 mM ტრიეთილთინის (TET) და შეუღლების გამთიშავის 10 μM კარბონილ ციანიდ p-ქლოროფენილჰიდრაზონის (CCCP) თანაობისას. (A) - Candida Utilis-ის უჯრედების

კონტროლი, (B) - Candida Utilis-ის უჯრედები 250μM ნობილეტინის თანაობისას, (C) - Candida Utilis-ის უჯრედების რაოდენობა (OD), (D) - Yeast Foam-ის უჯრედების კონტროლი, (E) - Yeast Foam-ის უჯრედები 250μM ნობილეტინის თანაობისას, (F) - Yeast Foam-ის უჯრედების რაოდენობა (OD). სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ მინიმუმ სამ დამოუკიდებელ ექსპერიმენტს, რომელიც შესრულებულია სამი დამოუკიდებელი საფუარის უჯრედული კულტურით, შედეგების საშუალო ± S.D. მაჩვენებელს.

საფუარის ორივე შტამზე მიღებული ექსპერიმენტული შედეგებიდან გამომდინარე, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ნობილეტინს თავისი ეფექტის მისაღწევად სჭირდება დაახლოებით 30-40 წუთი ინტაქტურ უჯრედებში.

ჩვენს წინა კვლევებში ნანახი იყო, რომ თავის ტვინის იზოლირებულ მიტოქონდრიებში ნობილეტინი ამცირებს პეროქსიდების წარმოქმნას I კომპლექსის სუბსტრატების არსებობის შემთხვევაში და მცირედით ზრდის სუქცინატით გამოწვეულ წყალბადის ზეჟანგის პროდუქციას (Sharikadze N., Jojua N., Sepashvili M., Zhuravliova E. 2016). იმისათვის, რომ გაგვერკვია ნობილეტინით გამოწვეული სუნთქვის დათრგუნვა გამოწვეული იყო თუ არა თავისუფალი რადიკალების დიდი რაოდენობით წარმოქმნით, კვლევის შემდგომ ეტაპზე მოვახდინეთ უჯრედების ინკუბაცია ანტიოქსიდანტურ ნაერთთან - 5mM NAC (N-acetyl-L-Cysteine) და განვსაზღვრეთ ინტაქტური უჯრედების სუნთქვა. გამოვიყენეთ ნობილეტინის სამი განსხვავებული კონცენტრაცია: 50μM; 100μM; (მონაცემები არ არის ნაჩვენები) და 250μM, იმისათვის, რომ გვენახა რომელი კონცენტრაციის შემთხვევაში მივიღებდით ნობილეტინის ეფექტს. ექსპერიმენტის შედეგად ვნახეთ, რომ ნობილეტინით გამოწვეული ჟანგბადის მოხმარების შემცირება არ იყო გამოწვეული თავისუფალი რადიკალების პროდუქციით (სურ. 25 A და B).

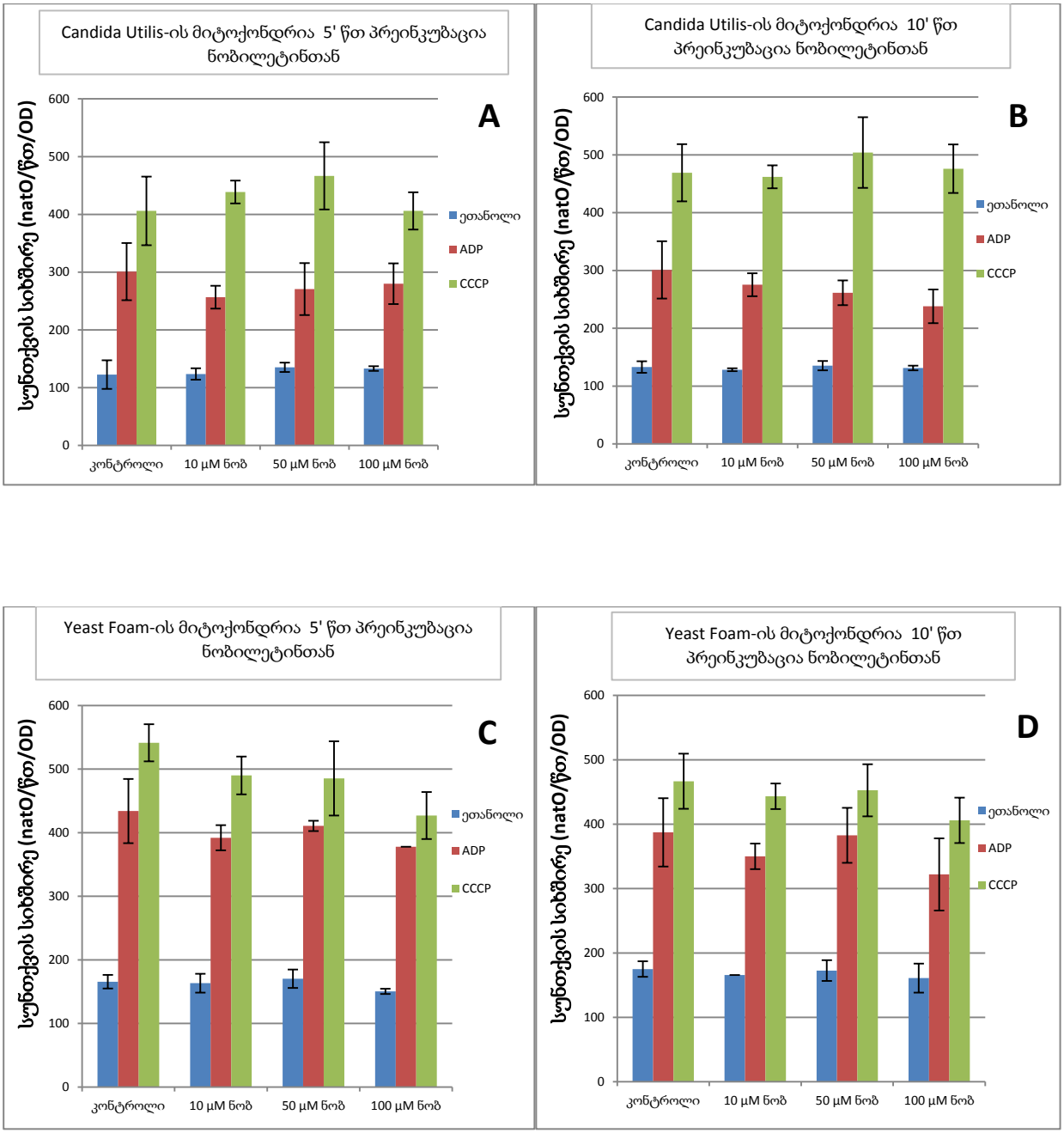


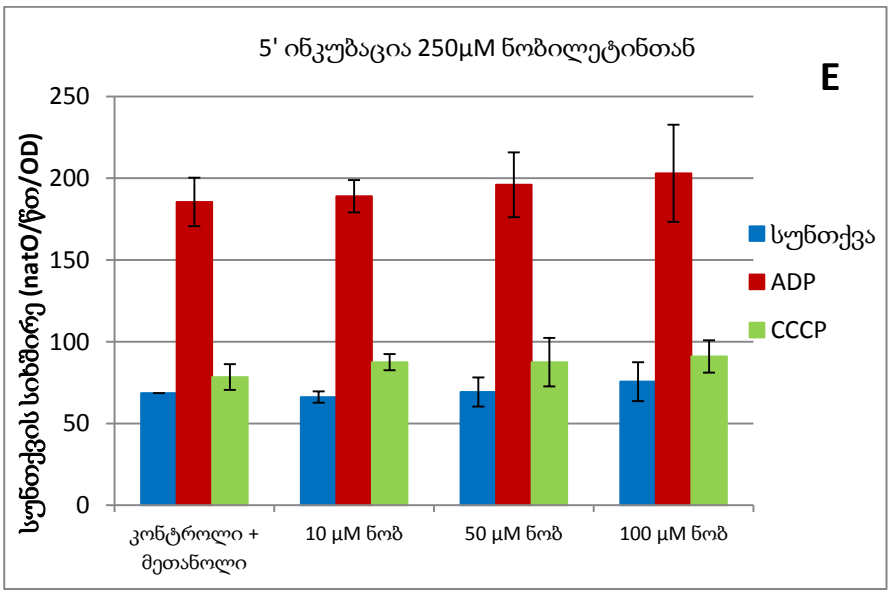
სურათი 25. პეროქსიდების პროდუქციის განსაზღვრა (A) - Candida Utilis-ისა და (B) – Yeast Foam-ის შტამში, ანტიოქსიდანტ NAC-ის და 250 μM ნობილეტინის თანაობისას. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± SEM მაჩვენებელს. *P<0.05, t test შედარებული შესაბამის კონტროლთან.

2.2. საფუარიდან იზოლირებული მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარება ნობილეტინის თანაობისას

საფუარის ინტაქტურ უჯრედებზე მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, საინტერესო გახდა დაგვედგინა იყო თუ არა ნობილეტინის ეფექტი გაშუალებული შიდაუჯრედული სარეგულაციო სასიგნალო სისტემებით, თუ მას პირდაპირი გავლენა ქონდა საფუარის მიტოქონდრიებზე. ამის გარდა, იმისათვის რომ ზუსტად გაგვერკვია ნობილეტინის მოლეკულური სამიზნე სუნთქვით ჯაჭვში, ჩვენ გავზომეთ როგორც Yeast Foam ასევე Candida Utilis-ის უჯრედებიდან იზოლირებული მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარება. ნობილეტინის პირდაპირი დამატებით იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე (სადაც ვგულისხმობთ, რომ ნობილეტინს ვამატებდით პირდაპირ ოქსიგრაფის სარეაქციო არეში), სუნთქვის ინჰიბირება არ მიგვიღია (სურ. 26 E). იზოლირებული მიტოქონდრიების შემთხვევაში გავზომეთ სამი სხვადასხვა: არა-ფოსფორილებადი (როდესაც სუნთქვის სუბსტრატად ეთანოლს ვიყენებდით), ფოსფორილირებადი (ADP-ის დამატებისას) და შეუღლების

გამთიშავის (CCCP-ის დამატებისას) ჟანგბადის მოხმარების სიხშირე. აღნიშნული ექსპერიმენტები ჩავატარეთ ნობილეტინთან 5 და 10 წუთიანი პრეინკუბაციის პირობებში და ნობილეტინის სამი განსხვავებული კონცენტრაციით: 10 μM; 50 μM ; 100 μM, იმისათვის რომ შეგვერჩია ნობილეტინის ეფექტური კონცენტრაცია (სურ. 26 A,B,C,D).





სურათი 26: საფუარის ორივე შტამიდან (Candida Utilis, Yeast Foam) იზოლირებული მიტოქონდრიების ჟანგბადის მოხმარება. (A და B) - Candida Utilis-ის მიტოქონდრია ნობილეტინთან 5 და 10 წუთიანი ინკუბაციის პირობებში, (C და D) - Yeast Foam-ის მიტოქონდრიების ნობილეტინთან 5 და 10 წუთიანი პრეინკუბაცია, (E) - 5 წუთიანი ინკუბაცია პირველი კომპლექსის სხვა სუბსტრატებთან (პირუვატი 10mM + მალატი 5mM). სუნთქვითი სიხშირე ფასდებოდა სუბსტრატად ეთანოლის (100mM) გამოყენებით. არაფოსფორილირებადი სუნთქვითი სიხშირე ფასდებოდა ეთანოლის თანაობისას, ფოსფორილირებადი სუნთქვითი სიხშირე 1mM ADP-ის დამატებით და 10μM CCCP შეუღლების გამთიშავის თანაობისას. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ მინიმუმ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± S.D მაჩვენებელს, რომელიც შესრულებულია სამი დამოუკიდებელი საფუარის იზოლირებული მიტოქონდრიებით.

ინტაქტური უჯრედებისაგან განსხვავებით იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად ჩვენ ვერ მივიღეთ ჟანგბადის მოხმარების მნიშვნელოვანი ცვლილება ნობილეტინის სხვადასხვა კონცენტრაციის ზემოქმედების შემთხვევაში, ასევე პრეინკუბაციის დროის ცვლილებასაც არ მოუცია რაიმე ეფექტი აღნიშნულ მაჩვენებელზე (სურ. 26).

ლიმონმჟავა ციკლის მიმდინარეობაზე ნობილეტინის ეფექტის შესასწავლად ცდების შემდგომ სერიებში გამოვიყენეთ ეთანოლის ალტერნატიული სუბსტრატები, როგორებიცაა: პირუვატი და მალატი, α-კეტოგლუტარის მჟავა. ამ შემთხვევაშიც ვერ მივიღეთ ვერანაირი ცვლილება ჟანგბადის მომხმარების მხრივ (მონაცემები არ არის წარმოდგენილი).

ამგვარად, ნობილეტინის ეფექტი საფუარზე მოითხოვს უჯრედში არსებული ექსტრამიტოქონდრიული სამიზნეს/ების ჩართვას. ამ კუთხით საინტერესო ხდება, ჩართულია თუ არა ამ პროცესში მხოლოდ უჯრედის სტრქუტურები, თუ ადგილი აქვს უჯრედული კედლის, როგორც დამატებით ფაქტორის ჩართულობას. საფუარს აქვს პოლისაქარიდული უჯრედული კედელი, რომელიც შესაძლებელია მოცილებულ იქნას მრავალი სხვადასხვა ექსპერიმენტული პროცედურით. იმისათვის, რომ გამოგვერიცხა საფუარის უჯრედული კედლის ეფექტი ნობილეტინით გამოწვეულ ცვლილებებში და ასევე ზუსტად გაგვერკვია რატომ ვერ მივიღეთ იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე ნობილეტინით გამოწვეული სუნთქვითი ჯაჭვის ინჰიბირება, ჩვენ გავიმეორეთ ექსპერიმენტები საფუარიდან გამოყოფილ სფეროპლასტებზე. სფეროპლასტები წარმოადგენენ საფუარის ინტაქტურ უჯრედს, საფუარის უჯრედული კედლის გარეშე. ჩვენი ექსპერიმენტისთვის გამოვიყენეთ Candida Utilis-ის უჯრედული ხაზი სფეროპლასტების მისაღებად, სფეროპლასტები მიღებული იყო უჯრედული კედლის ფერმენტული დაშლის შედეგად - ფერმენტ ციტოჰელიკაზას საშუალებით (Avéret N., 2015).

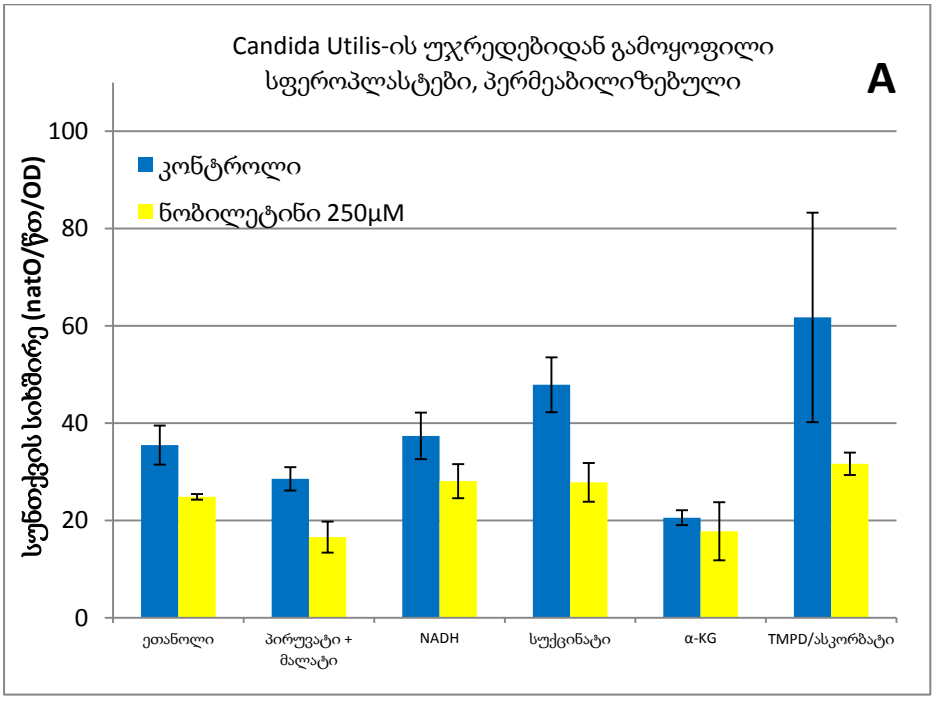
2.3. საფუარის უჯრედებიდან გამოყოფილ სფეროპლასტებზე ჩატარებული ექსპერიმენტები

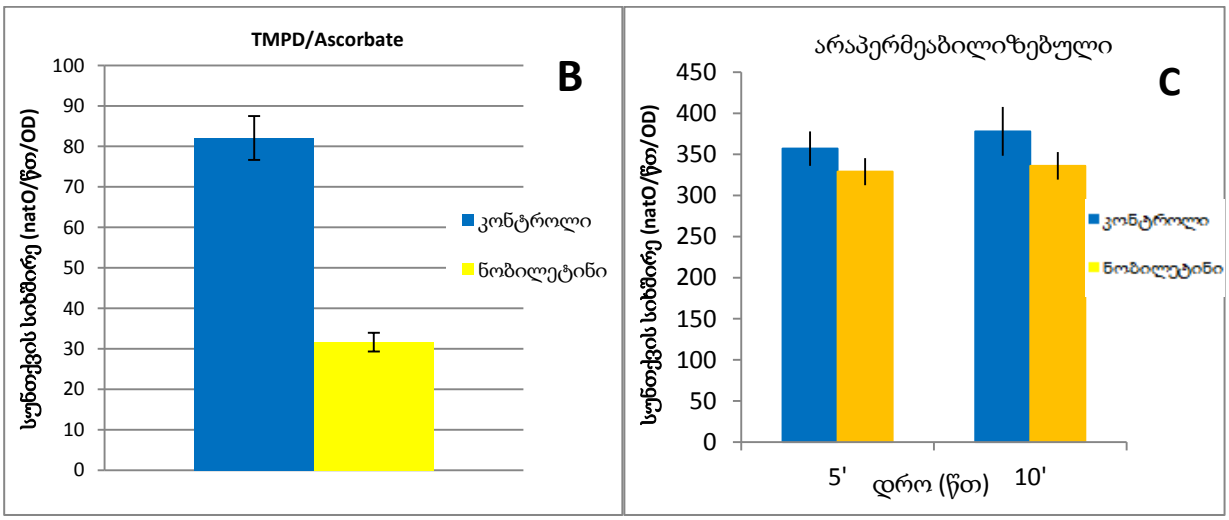
ჩვენს ექსპერიმენტში სფეროპლასტებზე ნობილეტინის ეფექტის შესასწავლად გამოვიყენეთ ორი სხვადასხვა მეთოდი:

1. პირველ შემთხვევაში, სფეროპლასტებს ვყოფდით უჯრედებიდან, გამოყოფის შემდგომ მათ ვაინკუბირებდით ნობილეტინთან 250μM საბოლოო კონცენტრაციით, პრეინკუბაციის დრო გვქონდა 5 და 10 წუთი ამის შემდგომ კი ვიწყებდით ჟაგბადის მოხმარების გაზომვას. ამ ტიპის ექსპერიმენტულ ნაწილში ჩვენ ვერ მივიღეთ ვერანაირი განსხვავება კონტროლსა და ნობილეტინიან სინჯებს შორის.
2. შემდგომ შევცვალეთ ექსპერიმენტის სტრატეგია და მეორე შემთხვევაში ინტაქტურ უჯრედებს ვაიკუბირებდით 30 წუთის განმავლობაში ნობილეტინთან

(250μM საბოლოო კონცენტრაცია) (ექსპერიმენტის საწყისად ვიღებდით უჯრედების რაოდენობას, როდესაც უჯრედების OD იყო დაახლოებით 0.3 თითოეულ ნიმუშში), ამის შემდგომ კი ინკუბირებული Candida Utilis-ის უჯრედებიდან ვყოფდით სფეროპლასტებს.

ჩვენი წინა კვლევების საფუძველზე ვნახეთ, რომ ინტაქტურ უჯრედებში ნობილეტინს დაახლოებით 30 წუთი სჭირდება მისი ეფექტის (სუნთქვის ინჰიბირების) მისაღწევად, ამიტომ გადავწყვიტეთ გამოგვეყენებინა ზემოთ აღწერილი მეორე მეთოდი, ნობილეტინი დაგვემატებინა ინტაქტური Candida Utilis-ის უჯრედებისთვის, გვეინკუბირებინა 30 წუთით და შემდგომში ამ უჯრედებიდან გამოგვეყო სფეროპლასტები. ნობილეტინთან 30 წუთიანი ინკუბაციის შემდგომ ვიწყებდით სფეროპლასტების გამოყოფას და პერმეაბილიზებას პროტოკოლის მიხედვით. ამის შემდგომ, ვზომავდით გამოყოფილ სფეროპლასტებში ჟანგბადის მოხმარებას სხვადასხვა სუნთქვითი ჯაჭვის სუბსტრატების თანაობისას (ნობილეტინის შემდგომი დამატების გარეშე).





სურათი 27: Candida Utilis-ის ინტაქტური უჯრედებიდან გამოყოფილი სფეროპლასტები. (A) - 250μM ნობილეტინის თანაობისას სფეროპლასტების სუნთქვითი აქტივობა სუნთქვითი ჯაჭვის სხავდასხვა სუბსტრატების დამატებით; (B) - 250μM ნობილეტინის თანაობისას სფეროპლასტების სუნთქვითი აქტივობა სუნთქვითი ჯაჭვის IV კომპლექსის სუბსტრატით; (C) - არაპერმეაბილიზებული სფეროპლასტების ჟანგბადის მოხმარება 250μM ნობილეტინთან 5 და 10 წუთიანი პრეინკუბაციის პირობებში. სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ მინიმუმ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± S.D მაჩვენებელს, რომელიც შესრულებულია სამი დამოუკიდებელი იზოლირებული სფეროპლასტებით.

პერმეაბილიზებულ სფეროპლასტებზე გავზომეთ სუნთქვითი ჯაჭვის პირველ და მეორე კომპლექსების სუბსტრატების თანაობისას ჟანგბადის მოხმარება, სუბსტრატებად გამოყენებული გვქონდა, NADH; პირუვატი+მალატი; სუქცინატი; α-KG; ეთანოლი. სურათი 27A გვაჩვენებს, რომ სფეროპლასტების ინკუბირებირება ნობილეტინთან 250μM კონცენტრაციით 30 წუთის განმავლობაში გვაძლევდა ჟანგბადის მოხმარების სუსტ ინჰიბირებას სუნთქვითი ჯაჭვის პირველი და მეორე კომპლექსების სუბსტრატების თანაობისას.

ამის შემდგომ გადავწყვიტეთ განგვესაზღვრა სუნთქვითი ჯაჭვის IV კომპლექსი, გამოვიყენეთ IV კომპლექსის სუბსტრატები, როგორებიცაა TMPD (0,25mM); ასკორბატი (1mM); და III კომპლექსის ინჰიბიტორი Antimycin A (4,56μM). ციტოქრომ c ოქსიდაზის აქტივობის განსაზღვრამ ნობილეტინთან 250μM 30 წუთიანი ინკუბაციით, ნათლად გვაჩვენა, რომ ეს ფერმენტი კონტროლთან შედარებით თითქმის 50% არის ინჰიბირებული (სურ. 27 B).

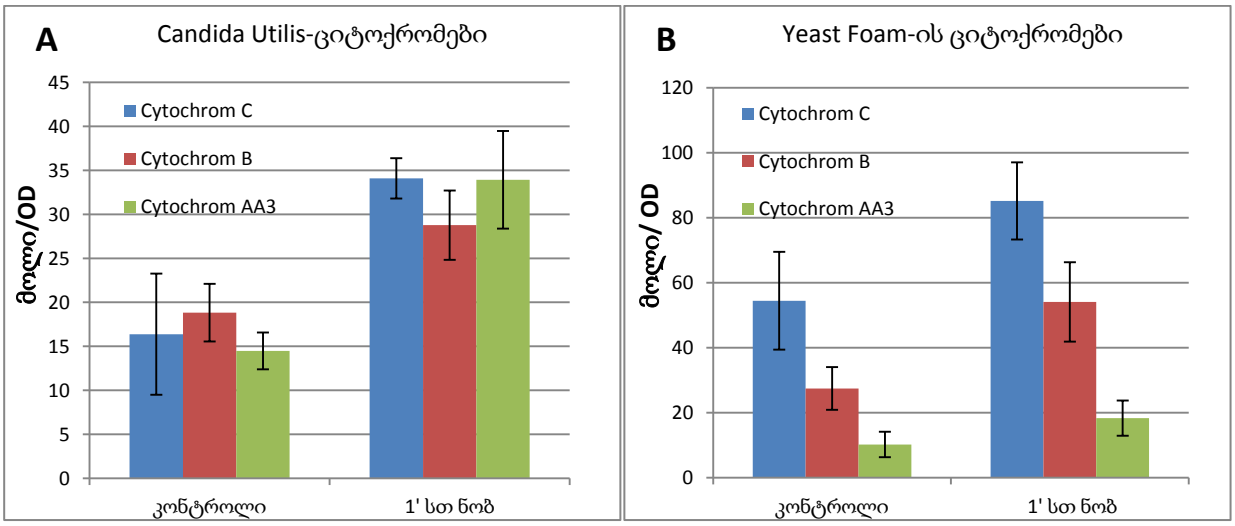
ამის გარდა, ჩვენ განვსაზღვრეთ პერმეაბილიზებული და არაპერმეაბილიზებული სფეროპლასტები. პერმეაბილიზაციას ვახდენდით ნისტატინის მოქმედების შედეგად (20μg/ml). პერმეაბილიზება არის პროცესი, როდესაც სფეროპლასტების მემბრანა იხვრიტება და წარმოიქმნება ერთგვარი ღრუები (ფორები), რომლის შედეგადაც საფუარის სფეროპლასტები ხდება მეტად განვლადი. სუნთქვის ინჰიბირება არ აღინიშნებოდა, როდესაც პერმეაბილიზებულ სფეროპლასტებს პირდაპირ ვამატებდით ნობილეტინს 250μM კონცენტრაციით (რაც ნიშნავს, რომ ნობილეტინს ვამატებდით პირდაპირ ოქსიგრაფის სარეაქციო არეში) მიუხედავად გამოყენებული სხვადასხვა სუბსტრატებისა. მსგავსი შედეგები მივიღეთ, როდესაც ნობილეტინს (250μM კონცენტრაციით) ვამატებდით არაპერმეაბილიზებულ სფეროპლასტებს 5 და 10 წუთიანი პრეინკუბაციის პირობებში (სურ. 27 C) ან ნობილეტინთან ინკუბაციის გარეშე (მონაცემები არ არის ნაჩვენები).

არაპერმეაბილიზებულ სფეროპლასტებში ჩვენ არ გვქონდა ჟანგბადის მოხმარების რაიმე მნიშვნელოვანი ცვლილება კონტროლთან შედარებით.

ჩვენი კვლევის შედეგად მივიღეთ ნობილეტინის მიერ IV კომპლექსის საკმაოდ მაღალი ინჰიბირება ექსპერიმენტში შესაბამისი სუბსტრატების გამოყენებისას. იგივე ექსპერიმენტი გავიმეორეთ დაახლოებით 5-ჯერ და ერთი და იგივე შედეგი მივიღეთ, ინჰიბირება გვქონდა დაახლოებით ნახევარი (50%) (სურ. 27 B). ამ ექსპერიმენტის შედეგად შეგვიძლია ნაწილობრივ დავასკვნათ, რომ ნობილეტინი საფუარის სუნთქვით ჯაჭვზე მოქმედებს სუნთქვითი ჯაჭვის IV კომპლექსზე ინჰიბირების გზით, რაც თავის მხრივ სავარაუდოდ საჭიროებს ექსტრამიტოქონდრიული, მეტაბოლური და/ან სასიგნალო გზების ჩართვას. ამ მხრივ გარკვეულ ინტერესს წარმოადგენს საფუარის მეტაბოლიზმის სარეგულაციო სისტემები, რომლებიც ჩართულია სხვადასხვა სტრესული ფაქტორების საპასუხოდ ადაპტაციის მექანიზმებში. ასე მაგალითად, ნანახია მიტოქონდრიული ციტოქრომების რაოდენობის მკვეთრი ზრდა ჰიპოქსიური პირობების საპასუხოდ (Burke et al. 1997).

რადგანაც ჟანგბადის მოხმარება ინტაქტურ უჯრედებში იკლებდა, მაშინ როდესაც უჯრედების რაოდენობა (OD) მატულობდა და ნობილეტინს არ ჰქონდა პირდაპირი ზემოქმედება იზოლირებულ მიტოქონდრიებზე. ჩვენ ვივარაუდეთ, რომ ნობილეტინის ეფექტი შესაძლოა გაშუალებული იყოს გარკვეული უჯრედშიდა სასიგნალო სისტემებით, რომლებიც საბოლოოდ ახდენენ მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის ოპტიმიზაციას. საფუარის მიტქონდრიული მეტაბოლიზმის ცვლილების ერთ-ერთ მექანიზმს ციტოქრომების რაოდენობის კონტროლი წარმოადგენს. კვლევის შემდგომ ეტაპზე, გადავწყვიტეთ გაგვეზომა ციტოქრომების რაოდენობა.

2.4. საფუარის უჯრედებში ციტოქრომების რაოდენობის განსაზღვრა



სურათი 28: ციტოქრომების (C/B/AA3) განსაზღვრა ორივე საფუარის ხაზში. უჯრედული და მიტოქონდრიული ციტოქრომების c_c1, b, და a_a3 რაოდენობის განსაზღვრა ხდებოდა მეთოდით რომელიც აღწერილია (Dejean et al. 2000), (A) – Candida Utilis; (B) – Yeast Foam, შესაბამისი მოლარული კოეფიციენტის გათვალისწინებით და შემცირებულს გამოკლებული დაჟანგული სპექტრის გამოთვლით ორმაგი სხივის სპექტროფოტომეტრზე (Aminco DW2000). სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები წარმოადგენენ მინიმუმ სამი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± S.D მაჩვენებელს.

ციტოქრომების განსაზღვრა ხდებოდა საფუარის ორივე შტამში (Candida Utilis და Yeast Foam). ციტოქრომების რაოდენობის განსაზღვრამდე ვახდენდით უჯრედების 1

საათიან პრეინკუბირებაციას ნობილეტინთან (საბოლოო კონცენტრაციით 250μM). როგორც სურათი 28-დან (სურ. 28 A და B) ჩანს ყველა განსაზღვრული (c_c1, b, და a_a3) ციტოქრომების რაოდენობა მომატებულია კონტროლთან შედარებით დაახლოებით 40%-ით საფუარის ორივე შტამში.

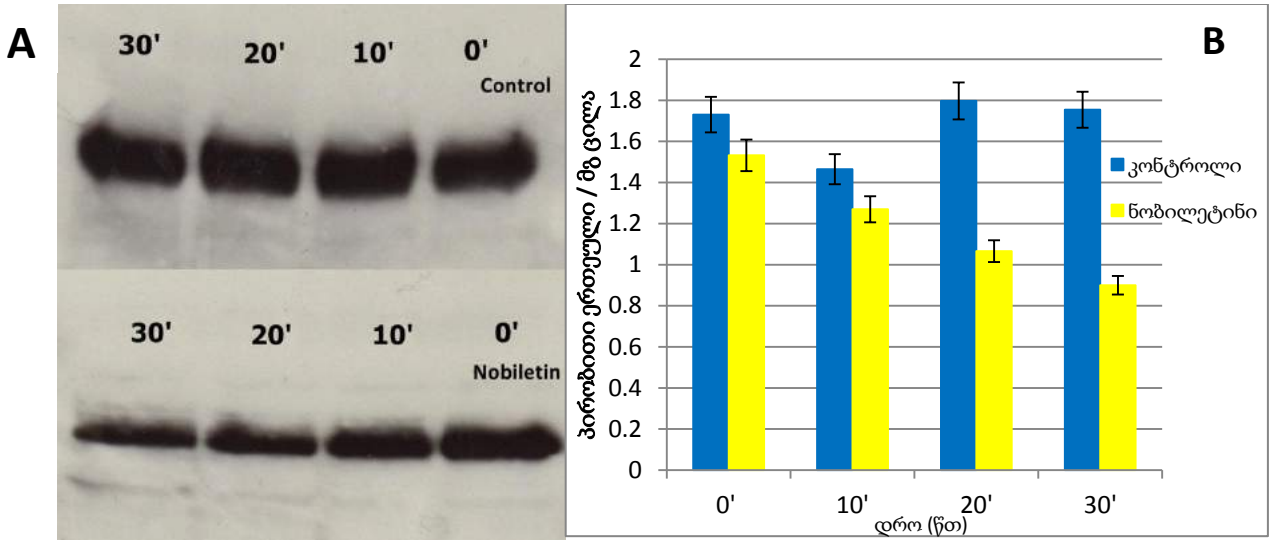
ცნობილია, რომ ციტოქრომების მომატებული რაოდენობა შესაძლებელია მიტოქონდრიული ბიოგენეზის ზრდის შედეგი იყოს ან კომპენსატორულ ხასიათს ატარებდეს სტრესული ფაქტორების ზემოქმედების საპასუხოდ. აღწერილია მექანიზმი, სადაც ჟანგბადის რეაქტიული ფორმები ახდენენ სიგნალის გადაცემას მიტოქონდრიიდან ბირთვამდე და იწვევენ HAP2/3/4/5 კომპლექსის - ტრანსკრიპციის ფაქტორის აქტივობის შემცირებას, HAP2/3/4/5 კომპლექსი თავის მხრივ ჩართულია საფუარის მიტოქონდრიულ ბიოგენეზში (Chevtzoff et al. 2010). ცნობილია, რომ ნორმოქსიულ პირობებში, COX-ის ბირთვულ გენების ექსპრესია, COX5a-ის ჩათვლით, Hap2/3/4/5 კომპლექსით რეგულირდება (Bourens et al. 2013).

ზემოთხსენებულიდან გამომდინარე, კვლევის შემდგომ ეტაპზე გადავწყვიტეთ განგვესაზღვრა ვესტერნ ბლოტინგის საშუალებით ცილა HAP4, რომელიც საფუარის მიტოქონრიული ბიოგენეზის ინდიკატორ ცილას წარმოადგენს (Chevtzoff et al. 2010) და დაგვედგინა მისი შესაძლო როლი ნობილეტინის ეფექტში.

2.5. Hap4 ცილის ვესტერნ ბლოტინგი

საწყის ეტაპზე ჩატარებულმა ვესტერნ ბლოტინგის ანალიზმა გვანახა, რომ Hap4 ცილა საფუარის მხოლოდ Yeast Foam უჯრედულ ხაზში იყო წარმოდგენილი (მონაცემები არ არის წარმოდგენილი) და სავარაუდოდ არ ექსპრესირდება საფუარის მეორე შტამში (Candida Utilis). აქედან გამომდინარე, ვესტერნ ბლოტინგის შემდგომი ექსპერიმენტები ჩავატარეთ მხოლოდ Yeast Foam უჯრედულ ხაზზე. როგორც უკვე ავღნიშნეთ Hap4 ცილა ცნობილია, როგორც მიტოქონდრიული ბიოგენეზის ინდიკატორი ცილა, HAP4-ით ოვერექსპრესირებული უჯრედები შეიცავენ მეტ მიტოქონდრიულ სტრუქტურებს, მიტოქონდრიული ცილებისა და ციტოქრომების

გაცილებით მეტ რაოდენობას, აგრეთვე გაძლიერებულია მიტოქონდრიული გენომის ტრანსკრიპციაც. ეს მონაცემები მიგვითითებს, იმაზე, რომ HAP4 ცილის ოვერექსპრესია ზოგადად იწვევს მიტოქონდრიის ბიოგენეზის გაზრდას (Lascaris et al. 2003).



სურათი 29: ნობილეტინის (250 μM) გავლენა HAP4 ცილის ექსპრესიაზე. (A) - ვესტერნ ბლოტინგის ტიპიური სურათი, (B) - Hap 4 ცილის კონცენტრაციის ცვლილება ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდით. მონაცემები წარმოადგენენ ხუთი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის საშუალო მაჩვენებელს ±SEM და ნორმალიზებულია α-PGK ცილის რაოდენობის მიხედვით.

კვლევის შედეგად ვნახეთ, დროზე დამოკიდებული შემცირება HAP4 ცილის რაოდენობისა 250μM ნობილეტინიან სინჯში, რაც შესაძლებელია აიხსნას შემცირებული ჟანგბადის მოხმარების პირობებში ალტერნატიული სასიგნალო გზის გააქტიურებით. საფუარში ბირთვული COX-ის გენებით ჟანგბადის კონცენტრაციის რეგულაცია გაშუალებულია ჰემით, რომელიც მოქმედებს როგორც გარემო სიგნალის შიდაუჯრედული ეფექტორი ორი ჰემ-დამოკიდებული ტრანსკრიპციის აქტივატორების გზით (Bourens et al. 2013). Hap-ების ცილების კომპლექსი (Hap2/3/4/5) გარემო სტიმულების საპასუხოდ, როგორებიცაა ჟანგბადის კონცენტრაცია და ნახშირბადის წყაროს არსებობა ახდენს ჟანგბადის კონცენტრაციის რეგულაციას.

შედეგების განხილვა

ნობილეტინი წარმოადგენს O-მეთილირებულ ფლავონოიდს, რომელიც დიდი რაოდენობითაა წარმოდგენილი ციტრუსების გარეკანში, მას გააჩნია ანტისიმსივნური, ანტივირუსული, ნეიროპროტექტორული, ანთების საწინააღმდეგო აქტივობა და უჯრედულ ტიპზე დამოკიდებულებით ავლენს როგორც პრო ასევე ანტი-აპოპტოზურ შესაძლებლობებს. ნობილეტინს შეუძლია შეაფერხოს სიმსივნური უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა მრავალი სხავდასხვა კონცენტრაცია-დამოკიდებული გზით (VEGF, HIF-1α, Akt ფოსფორილირება, cMyc, და NF-κB) (Shi et al. 2013; Chen et al. 2014). ამავდროულად ამ ნაერთს გააჩნია ანტი-აპოპტოზური ეფექტი, მას შემდეგ რაც cAMP-დამოკიდებული გზის გააქტიურებით იცავს ნეირონს უჯრედული სიკვდილისაგან (Nagase et al. 2005). ნობილეტინის ფართო სპექტრის მოქმედება, რაც მოიცავს მის როგორც ანტი, ასევე პრო-აპოპტოზურ მოქმედებას მიგვითითებს იმაზე, რომ ამ ნაერთის ეფექტი გაცილებით კომპლექსურია და მოიცავს მრავალ შიდაუჯრედულ სარეგულაციო სისტემებს. მრავალი ფლავონოიდი ამცირებს მიტოქონდრიული პეროქსიდების წარმოქმნას სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის ინჰიბირებით (Lagoa et al. 2011).

ჩვენი კვლევის შედეგად ვნახეთ, რომ ნობილეტინი ამცირებს ჟანგბადის მოხმარებას გლუტამატი/მალატის დამატების შემდგომ, ხოლო სუქცინატის თანაობისას ზრდის, როგორც სუნთქვითი ჯაჭვის მოსვენების მდგომარეობაში ასევე მდგომარეობა 3-ში (state 3), პარალელურად ნობილეტინი ტრანზიტორულად ამცირებს როტენონ-სენსიტიურ NADH: კოენზიმ Q10 რედუქტაზას აქტივობას, მაგრამ ზრდის α-კეტოგლუტარატდამოკიდებულ ატფ-ის პროდუქციას.

ასევე, დადგინდა, რომ ნობილეტინი იწვევს მემბრანული პოტენციალის ტრანზიტორულად გაზრდას (ჰიპერპოლარიზაციას), რომელსაც თან სდევს სუსტი დეპოლარიზაცია. ასეთ 'სუსტ მიტოქონდრიულ შეუღლების დამრღვევის' სტიმულს შეუძლია შეამციროს ციტოტოქსიური Ca^{2+}-ის შემოდინება ექსციტოტოქსიური დაზიანების დროს და დაიცვას ნეირონი ოქსიდაციური სტრესის საპასუხოდ (Budd and Nicholls 1996; Weisová et al. 2012). ეს ეფექტი ასევე შესაძლებელია წარმოიქმნას

ჟანგბადის მოხმარების შემცირებისას ნობილეტინის მოქმედების შედეგად. გაუგებარია ის ფაქტი, რომ ნობილეტინი ასევე აძლიერებს KGDH/SCS კომპლექსის აქტივობას, შესაძლებელია ეს წარმოადგენდეს კომპენსატორულ, დამცველობით მექანიზმს, ენერგიის მეტაბოლიზმის ცვლილებას მატრიქსული სუბსტრატული ფოსფორილირების გაზრდის გზით. KGDH ქმნის სამკომპონენტიან კომპლექსს SCS და NADH:უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზასთან (Porpaczy, Sumegi, and Alkonyi 1987), ამიტომ არ არის გამორიცხული, რომ ნობილეტინი მოქმედებდეს ცილა-ცილოვან ურთიერთობაზე. გარდა ამისა, შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ სუნთქვითი ჯაჭვის არასრული ინჰიბირების ან შეუღლების ნაწილობრივი დარღვევის დროს მემბრანული პოტენციალის შენარჩუნებისა და უჯრედის სიკვდილის ასაცილებლად აქტიურად ჩაერთვება მატრიქსული სუბსტრატული ფოსფორილირება, რაც წარმოადგენს პირველადი ენერგიის, ატფ-ის უმნიშვნელოვანეს წყაროს რევერსული F0F1-ატფ-აზისათვის (Chinopoulos et al. 2010). აქედან გამომდინარე, ნობილეტინმა შესაძლებელია ითამაშოს შეუღლების გამთიშავის - 'uncoupler'-ის როლი, რომელიც იწვევს სუსტ მემბრანულ დეპოლარიზაციას და მატრიქსული სუბსტრატული ფოსფორილირების გააქტივებას.

ტრანზიტორულ ჰიპერპოლარიზაციას თან სდევს პეროქსიდების პროდუქციის დროებითი მომატება, რომელიც ვნახეთ მიტოქონდრიასთან ნობილეტინის 5 წუთიანი პრეინკუბაციის დროს. ინკუბაციის დროის გახანგრძლივება იწვევს დეპოლარიზაციას და პეროქსიდების პროდუქციის შემდგომ შემცირებას. ზუსტი მოლეკულური მექანიზმი, რომელიც მონაწილეობს ნობილეტინით გამოწვეულ ტრანზიტორულ ჰიპერპოლარიზაციაში დღეს-დღეობით უცნობია. ვვარაუდობთ, რომ ჰიპერპოლარიზაციის ფაზა შესაძლებელია გაშუალებული იყოს რევერსულად მომუშავე ოლიგომიცინ-მგრძნობიარე მიტოქონდრიული F1F0-ატფ-აზის მიერ, რომლის გააქტიურებისათვის სუბსტრატული ფოსფორილირება უმნიშვნელოვანესია. ჰიპერპოლარიზაციის ფაზას, ემთხვევა დიდი რაოდენობით ROS-ების გენერაცია, რაც ნაწილობრივ შესაძლებელია აიხსნას მიტოქონდრიაში ელექტრონთა გადაცემის ხანმოკლე შეწყვეტით (Zorov, Juhaszova, and Sollott 2006). აშკარაა, რომ ტრანზიტორული ჰიპერპოლარიზაცია და პეროქსიდების სპაიკები იწვევს მიტოქონდრიული ფუნქციების გადაპროგრამირებას ისეთ ფენომენზე,

რომელსაც „იშემიური პრეკონდიციის“ ანუ ჰორმეზისის ფენომენი ეწოდება. ამ ფენომენის არსი მდგომარეობს იმაში, რომ ხანმოკლე იშმიური ინსულტები ან დროებითი მცირე სტრესი იცავს უჯრედს ძლიერი დაზიანებისაგან. მიტოქონდრიის რეენერგიზაცია ამ დროს საკმაოდ სწრაფად მიმდინარეობს და სუნთქვითი ჯაჭვი 5-6 წუთის განმავლობაში მაღალ მაჩვენებლებს უბრუნდება. მაგრამ, მემბრანული პოტენციალის ნორმალური დონის ფორმირებას ვერ ახერხებს და დროებით, ჰიპერაქტიურ ფაზაში გადადის. შედეგად მემბრანული პოტენციალი ($\Delta\Psi\mu$) 120mV-ის ნაცვლად 160-180mV ხდება. მიტოქონდრიული მემბრანის ასეთი ჰიპერპოლარიზაცია თავისუფალი რადიკალების ინტენსიურ წარმოქმნას იწვევს, რაც ამ დროს ძირითად დესტრუქციულ კომპონენტს წარმოადგენს. დაახლოებით 8-10წთ-ის შემდეგ $\Delta\Psi\mu$ ბალანსირდება ნორმალურ პოტენციალამდე და თავისუფალი რადიკალების ფორმირება წყდება. დღეისათვის დადგენილია, რომ ასეთი გარდამავალი ჰიპერპოლარიზაცია, არის იშემიური ინსულტების ერთ-ერთი ძირითადი პათოგენური კომპონენტი. როგორც უკვე აღინიშნა გარდამავალი ჰიპერპოლარიზაციის შემცირება, შესაძლებელია მოხდეს ე.წ. იშემიური პრეკონდიციით „გავარჯიშების“ შედეგად, რაც მნიშვნელოვან დამცველობით ფენომენს წარმოადგენს. საინტერესოა აღინიშნოს, რომ ე.წ. „გამთიშველები“, ნაერთები, რომლებიც აცალკევებენ სუნთქვით ჯაჭვში ელექტრონთა ტრანსპორტის სისტემას პროტონების გრადიენტის ფორმირებისაგან და დროებით, გარდამავალ ჰიპერპოლარიზაციას იწვევენ, საკმაოდ დიდი თერაპიული პოტენციალით ხასიათდებიან გულ-სისხლძარღვოვანი დაავადებების მკურნალობაში, რადგან მათი საშუალებით ხდება მიტოქონდრიების „ტრენირება“ ჰიპერპოლარიზებული მდგომარეობიდან ნორმალურ პოტენციალამდე სწრაფი დაბრუნებისა.

NDUFV1, რომელიც ნობილეტინის მოქმედების ერთ-ერთ სავარაუდო სამიზნედ გვევლინება, წარმოადგენს NADH: უბიქინონოქსიდორედუქტაზის შვიდი მნიშვნელოვანი სუბერთეულიდან, ე.წ. “core subunits” ერთ-ერთს, რომელიც აკატალიზებს NADH-ის დაჟანგვას და ელექტრონთა გადაცემას (R. J. R. J. Janssen et al. 2006). მრავალი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების დროს ნანახია მნიშვნელოვან სუბერთეულებში (“core subunits”) მომხდარი დეფექტები (Mimaki et al. 2012). ეს

კომპლექსი მოიცავს როტენონ-არამგრძნობიარე NADH-ის დაჟანგვის საიტს, რომელიც წარმოქმნის ROS-ებს (King, Sharpley, and Hirst 2009) და შესაძლებელია წარმოადგენდეს სხვადასხვა ფლავონოიდების მოქმედების სამიზნეს (Lagoa et al. 2011).

გამომდინარე იქიდან, რომ ნობილეტინი ჰიდროფობული ბუნების ნაერთია, იგი მარტივად გადის ბიოლოგიურ მემბრანებს და შესაძლებელია ცვლიდეს როგორც პირდაპირ, ასევე სხვა მარეგულირებელ ცილებთან ურთიერთქმედების გზით I კომპლექსის აწყობას მიტოქონდრიულ მატრიქსში. ნობილეტინი, ცხიმოვანი მჟავების მსგავსად შესაძლებელია ურთიერთქმედებდეს ნეირონულ შეუღლების გამთიშველებთან (ანქაფლერი ცილები - uncoupling proteins) (UCP2, UCP4, and UCP5) და ამცირებდეს ROS-ის წარმოქმნას პროტონული გრადიენტის გაქრობისა და სუსტი გათიშვის-ის გზით (Andrews, Diano, and Horvath 2005).

მეორეს მხრივ, ნობილეტინის ეფექტი გამთიშველ ცილებზე შესაძლებელია გაშუალებული იყოს მიტოქონდრიული პროტეინ კინაზა A-თი (PKA). ნანახია, რომ ნობილეტინი ციტოპლაზმური PKA-დამოკიდებული სინაფსური ცილების ფოსფორილირების გზით აუმჯობესებს მეხსიერებას დემენციის სხავადასხვა ცხოველურ მოდელებში (Akira Nakajima, Ohizumi, and Yamada 2014). PKA, ისევე როგორც ადენილატ ციკლაზა ნანახია მიტოქონდრიაში. მიტოქონდრიულ მატრიქსში PKA აფოსფორილებს სუნთქვითი ჯაჭვის I და IV კომპლექსების სხავდასხვა სუბერთეულებს, თუმცა ფოსფორილირების ფუნქციური ეფექტი სრულად არ არის ცნობილი (Valsecchi et al. 2013). PKA-დამოკიდებული პირველი კომპლექსის სუბერთეულების ფოსფორილირება შესაძლებელია თამაშობდეს მთავარ როლს კომპლექსის ერთობლიობაში (assembly), მაშინ როდესაც IV კომლექსის ფოსფორილირება მონაწილეობს მიტოქონდრიული ბიოენერგეტიკის რეგულაციაში და ROS-ების პროდუქციაში (Covian and Balaban 2012; Hüttemann et al. 2012). მნიშვნელოვანია, რომ მიტოქონდრიული ადენილატციკლაზა აქტიურდება α-კეტოგლუტარად დეჰიდროგენაზული რეაქციის (α-KGDH) პროდუქტის - ნახშირორჟანგის მიერ (Valsecchi et al. 2013). მაშასადამე, α-KGDH კომპლექსის აქტივაციამ, რომელიც ჩვენს ექსპერიმენტებში ვნახეთ, შესაძლებელია cAMP-ის პროდუქცია და შესაბამისად PKA-ის გააქტივება გამოიწვიოს.

აღსანიშნავია, რომ ანქაფლერი ცილის (uncoupling protein 2 (UCP2) ნეიროპროტექტორული ეფექტი მოითხოვს cAMP-დამოკიდებულ პროტეინ კინაზას აქტივაციას (Hwang et al. 2014). ეს ცილა ოქსიდაციური ფოსფორილირების გზით აღადგენს ბალანსს სიმსივნურ უჯრედებში და ახდენს ავთვისებიანი ფენოტიპების რეპრესიას (Esteves et al. 2014).

ამგვარად, ნობილეტინი ახდენს ჟანგბადის მოხმარების შემცირებას და პეროქსიდების პროდუქციას I კომპლექსის საშუალებით, ასევე ძალიან მნიშვნელოვანია, რომ იგი იწვევს მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის რეპროგრამირებას სიმსივნურ უჯრედებში გლიკოლიზიდან სუქცინატით გამოწვეულ ოქსიდაციურ ფოსფორილირებამდე. ნობილეტინის ძლიერი პოტენციალის გათვალისწინებით სიმსივნური უჯრედების მეტაბოლიზმის კორექციისა, ისევე როგორც უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის რეგულაციისა, ნობილეტინის მოქმედების ზუსტი მოლეკულური მექანიზმების შესწავლას ექნება ეფექტი თერაპიულ მიდგომებში მრავალი პათოლოგიების შემთხვევაში.

ჩვენი შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ნობილეტინით გამოწვეული სუნთქვითი ჯაჭვის ინჰიბირება საფუარის უჯრედებში მოითხოვს ნობილეტინის უჯრედულ მეტაბოლიზმს, ასევე მისი ეფექტი შესაძლებელია აიხსნას საფუარის შიდაუჯრედული სარეგულაციო სისტემების ჩართულობით. ერთ-ერთ შესაძლო კანდიდატს შესაძლებელია წარმოადგენდებს cAMP-დამოკიდებული პროტეინ კინაზები, გამომდინარე იქიდან, რომ ისინი ნობილეტინის ერთ-ერთ ძირითად სამიზნედ არიან ცნობილნი (Akira Nakajima, Ohizumi, and Yamada 2014). ამ ტიპის პროტეინ კინაზები მონაწილეობენ მიტოქონდრიულ ციტოქრომ c-ს რეგულაციაში და ციტოქრომ c ოქსიდაზის აქტივობაში (Chevtzoff et al. 2005).

ამგვარად, ნობილეტინი ორივე მოდელის (საფუარი, ხარის თავის ტვინი) ახდენს ჟანგბადის მოხმარების დათრგუნვას, სისცოცხლისუნარიანობის გაზრდის და ატფ-ის დონის შენარჩუნების ფონზე, რაც თავის თავად შეიძლება განხილულ იქნას, როგორც

ერთგვარი ადაპტაციური მექანიზმი სტრესული და ჰიპოქსიური პირობების მიმართ. აღსანიშნავია, რომ აღნიშნული ეფექტი სხვადასხვა მოდელებში გაშუალებულია განსხვავებული სასიგნალო გზებისა და მოლეკულური სამიზნეებით, რაც მოითხოვს დამატებით შესწავლას ნობილეტინის ზუსტი თერაპიული ეფექტის მოლეკულური მექანიზმების სრული დახასიათების მიზნით.

დასკვნები

1. ნობილეტინი ამცირებს ხარის თავის ტვინის მიტოქონდრიების მიერ ჟანგბადის მოხმარებას გლუტამატის და მალატის თანაობისას და ზრდის ამ მაჩვენებელს სუქცინატის თანაობისას; აგრეთვე ზრდის NADH-ის დაჟანგვას, α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზურ აქტივობას და აძლიერებს ატფ-ის პროდუქციას α-კეტოგლუტარატ-დამოკიდებული გზით.
2. ნობილეტინი ხარის თავის ტვინის მიტოქონდრიებში ამცირებს ზეჟანგის გენერაციას I კომპლექსის სუბსტრატების თანაობისას და სუსტად აძლიერებს სუქცინატით გამოწვეულ H2O2 პროდუქციას; პარალელურად იწვევს მემბრანული პოტენციალის ტრანზიტორულ მატებას, რომელსაც მოჰყვება სუსტი დეპოლარიზაცია.
3. ხარის თავი ტვინის მიტოქონდრიის ცილოვან სპექტრში ნობილეტინ-დამაკავშირებელ უნარს ავლენს ერთი ცილა მოლეკულური წონით 52 კდა, რომელსაც ანტი-NDUFV1 ანტისხეულზე დადებითი სიგნალი და NADH:უბიქინონ ოქსიდორედუქტაზური აქტივობა აქვს; ამ ფრაქციას შეუძლია ზეჟანგის პროდუქცია, რომელიც ითრგუნება ნობილეტინით.
4. ნობილეტინი ახდენს საფუარის ორი უჯრედული ხაზის (Candida Utilis და Yeast Foam) მიერ ჟანგბადის მოხმარების შემცირებას რასაც თან ახლავს სუნთქვითი ჯაჭვის მეოთხე კომპლექსის დათრგუნვა, მიტოქონდრიული ციტოქრომების რაოდენობის მატება და უჯრედული ზრდის სტიმულირება (პირველი საათის განმავლობაში).
5. აღნიშნული ეფექტი არ არის გაშუალებული მიტოქონდრიებზე ნობილეტინის პირდაპირი ზემოქმედებით და არ მოიცავს HAP2/3/4/ ტრანსკრიფციის ფაქტორების სასიგნალო გზების აქტივაციას.
6. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ხარის თავის ტვინის მიტოქონდრიებში ნობილეტინი მოქმედებს, როგორც „შეუღლების სუსტი გამთიშველი“ (“uncoupler”), რომელიც α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას (a-KGDH)-კომპლექსის აქტივაციის და მატრიქსის სუბსტრატული ფოსფორილების

გაძლიერების გზით ახდენს მემბრანული პოტენციალის შენარჩუნებას ფიზიოლოგიურ დონეზე. აღნიშნული ფლავონოიდის საფუარზე მოქმედებისათვის აუცილებელია ექსტრამიტოქონდრიული სასიგნალო და/ან ფერმენტული სისტემების ჩართულობა, რაც სავარაუდოდ მოიცავს მეოთხე კომპლექსის დათრგუნვის ფონზე მიტოქონდრიული ციტოქრომების რაოდენობის მატებას.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Abe, Takashi, Hideo Tohgi, Chiaki Isobe, Takahiko Murata, and Chigumi Sato. 2002. "Remarkable Increase in the Concentration of 8-Hydroxyguanosine in Cerebrospinal Fluid from Patients with Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience Research* 70 (3):447–50. https://doi.org/10.1002/jnr.10349.
2. Abou-Sleiman, Patrick M., Miratul M. K. Muqit, and Nicholas W. Wood. 2006. "Expanding Insights of Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Nature Reviews Neuroscience* 7 (3):207–19. https://doi.org/10.1038/nrn1868.
3. Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, and Jose Antonio Enriquez. 2008. "Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes." *Molecular Cell* 32 (4). Elsevier:529–39. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021.
4. Adam-Vizi, Vera, and Anatoly A. Starkov. 2010. "Calcium and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation: How to Read the Facts." Edited by Xiongwei Zhu, M. Flint Beal, Xinglong Wang, George Perry, and Mark A. Smith. *Journal of Alzheimer's Disease* 20 (s2):S413–26. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100465.
5. Akinyemi, Rufus O, Elizabeta B Mukaetova-Ladinska, Johannes Attems, Masafumi Ihara, and Raj N Kalaria. 2013. "Vascular Risk Factors and Neurodegeneration in Ageing Related Dementias: Alzheimer's Disease and Vascular Dementia." *Current Alzheimer Research* 10 (6):642–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23627757.
6. Aksenov, M Y, M V Aksenova, D A Butterfield, J W Geddes, and W R Markesbery. 2001. "Protein Oxidation in the Brain in Alzheimer's Disease." *Neuroscience* 103 (2):373–83. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11246152.
7. Albers, E, C Larsson, G Lidén, C Niklasson, and L Gustafsson. 1996. "Influence of the Nitrogen Source on Saccharomyces Cerevisiae Anaerobic Growth and Product Formation." *Applied and Environmental Microbiology* 62 (9). American Society for Microbiology (ASM):3187–95. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8795209.
8. Alle, H., A. Roth, and J. R. P. Geiger. 2009. "Energy-Efficient Action Potentials in Hippocampal Mossy Fibers." *Science* 325 (5946):1405–8.

https://doi.org/10.1126/science.1174331.

9. Anandatheerthavarada, Hindupur K., and Latha Devi. 2007. "Amyloid Precursor Protein and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease." *The Neuroscientist* 13 (6):626–38. https://doi.org/10.1177/1073858407303536.
10. Andreasen, A. A., and T. J. B. Stier. 1954. "Anaerobic Nutrition of Saccharomyces Cerevisiae. II. Unsaturated Fatty and Requirement for Growth in a Defined Medium." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 43 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company:271–81. https://doi.org/10.1002/jcp.1030430303.
11. ANDREASEN, A A, and T J B STIER. 1953. "Anaerobic Nutrition of Saccharomyces Cerevisiae. I. Ergosterol Requirement for Growth in a Defined Medium." *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 41 (1):23–36. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13034889.
12. Andrews, Zane B., Sabrina Diano, and Tamas L. Horvath. 2005. "Mitochondrial Uncoupling Proteins in the Cns: In Support of Function and Survival." *Nature Reviews Neuroscience* 6 (11):829–40. https://doi.org/10.1038/nrn1767.
13. Arumugam, Thiruma V., Terry M. Phillips, Aiwu Cheng, Christopher H. Morrell, Mark P. Mattson, and Ruiqian Wan. 2010. "Age and Energy Intake Interact to Modify Cell Stress Pathways and Stroke Outcome." *Annals of Neurology* 67 (1):41–52. https://doi.org/10.1002/ana.21798.
14. Atamna, Hani, and William H. Frey. 2007. "Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction and Energy Deficiency in Alzheimer's Disease." *Mitochondrion* 7 (5):297–310. https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.06.001.
15. Attardi, G, A Chomyn, R F Doolittle, P Mariottini, and C I Ragan. 1986. "Seven Unidentified Reading Frames of Human Mitochondrial DNA Encode Subunits of the Respiratory Chain NADH Dehydrogenase." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 Pt 1 (January). Cold Spring Harbor Laboratory Press:103–14. https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.013.
16. Attwell, David, and Simon B. Laughlin. 2001. "An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 21 (10):1133–45. https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001.

17. Atwood, Craig S, Mark E Obrenovich, Tianbing Liu, Hsien Chan, George Perry, Mark A Smith, and Ralph N Martins. 2003. "Amyloid-Beta: A Chameleon Walking in Two Worlds: A Review of the Trophic and Toxic Properties of Amyloid-Beta." *Brain Research. Brain Research Reviews* 43 (1):1–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14499458.
18. Avéret, Nicole, Marie-Lise Jobin, Anne Devin, and Michel Rigoulet. 2015. "Proton Pumping Complex I Increases Growth Yield in Candida Utilis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847 (10). Elsevier:1320–26. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2015.07.001.
19. Bakker, B M, K M Overkamp, van Maris AJ, P Kötter, M A Luttik, van Dijken JP, and J T Pronk. 2001. "Stoichiometry and Compartmentation of NADH Metabolism in Saccharomyces Cerevisiae." *FEMS Microbiology Reviews* 25 (1):15–37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152939.
20. Baranova, Ekaterina A, David J Morgan, and Leonid A Sazanov. 2007. "Single Particle Analysis Confirms Distal Location of Subunits NuoL and NuoM in Escherichia Coli Complex I." *Journal of Structural Biology* 159 (2):238–42. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.01.009.
21. Barber-Singh, Jennifer, Byoung Boo Seo, Eiko Nakamaru-Ogiso, Yuen-Sum Lau, Akemi Matsuno-Yagi, and Takao Yagi. 2009. "Neuroprotective Effect of Long-Term NDI1 Gene Expression in a Chronic Mouse Model of Parkinson Disorder." *Rejuvenation Research* 12 (4). Mary Ann Liebert, Inc.:259–67. https://doi.org/10.1089/rej.2009.0854.
22. Barnard, Neal D., Ashley I. Bush, Antonia Ceccarelli, James Cooper, Celeste A. de Jager, Kirk I. Erickson, Gary Fraser, et al. 2014. "Dietary and Lifestyle Guidelines for the Prevention of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 35 (September):S74–78. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.033.
23. Barsoum, Mark J, Hua Yuan, Akos A Gerencser, Géraldine Liot, Yulia Kushnareva, Simone Gräber, Imre Kovacs, et al. 2006. "Nitric Oxide-Induced Mitochondrial Fission Is Regulated by Dynamin-Related GTPases in Neurons." *The EMBO Journal* 25 (16):3900–3911. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601253.
24. Benard, G., N. Bellance, D. James, P. Parrone, H. Fernandez, T. Letellier, and R. Rossignol. 2007. "Mitochondrial Bioenergetics and Structural Network Organization."

Journal of Cell Science 120 (5):838–48. https://doi.org/10.1242/jcs.03381.

25. Bender, Andreas, Kim J Krishnan, Christopher M Morris, Geoffrey A Taylor, Amy K Reeve, Robert H Perry, Evelyn Jaros, et al. 2006. "High Levels of Mitochondrial DNA Deletions in Substantia Nigra Neurons in Aging and Parkinson Disease." *Nature Genetics* 38 (5):515–17. https://doi.org/10.1038/ng1769.
26. Bengtson, C. Peter, and Hilmar Bading. 2012. "Nuclear Calcium Signaling." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970:377–405. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_17.
27. Berg, M A Van den, and H Y Steensma. 1995. "ACS2, a Saccharomyces Cerevisiae Gene Encoding Acetyl-Coenzyme A Synthetase, Essential for Growth on Glucose." *European Journal of Biochemistry* 231 (3):704–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7649171.
28. Bindoff, L A, M Birch-Machin, N E Cartlidge, W D Parker, and D M Turnbull. 1989. "Mitochondrial Function in Parkinson's Disease." *Lancet (London, England)* 2 (8653):49. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2567823.
29. Blomberg, Anders, Christer Larsson, and Lena Gustafsson. 1988. "Microcalorimetric Monitoring of Growth of Saccharomyces Cerevisiae: Osmotolerance in Relation to Physiological State." *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 170 (10):4562–68. http://jb.asm.org/content/170/10/4562.full.pdf.
30. Bose, Anindita, and M. Flint Beal. 2016. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Journal of Neurochemistry* 139 (October):216–31. https://doi.org/10.1111/jnc.13731.
31. Bosetti, Francesca, Francesca Brizzi, Silvia Barogi, Michelangelo Mancuso, Gabriele Siciliano, Elisabetta A Tendi, Luigi Murri, Stanley I Rapoport, and Giancarlo Solaini. 2002. "Cytochrome c Oxidase and Mitochondrial F1F0-ATPase (ATP Synthase) Activities in Platelets and Brain from Patients with Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 23 (3):371–76. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959398.
32. Bourens, Myriam, Flavia Fontanesi, Iliana C Soto, Jingjing Liu, and Antoni Barrientos. 2013. "Redox and Reactive Oxygen Species Regulation of Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Biogenesis." *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (16). Mary Ann Liebert, Inc.:1940–52. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4847.

33. Boveris, A, E Martino, and A O Stoppani. 1977. “Evaluation of the Horseradish Peroxidase-Scopoletin Method for the Measurement of Hydrogen Peroxide Formation in Biological Systems.” *Analytical Biochemistry* 80 (1):145–58. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/883627.
34. Bruinenberg, P. M., J. P. Van Dijken, and W. A. Scheffers. 1983. “An Enzymic Analysis of NADPH Production and Consumption in Candida Utilis.” *Microbiology* 129 (4):965–71. https://doi.org/10.1099/00221287-129-4-965.
35. Bruinenberg, Peter M. 1986. “The NADP(H) Redox Couple in Yeast Metabolism.” *Antonie van Leeuwenhoek* 52 (5). Kluwer Academic Publishers:411–29. https://doi.org/10.1007/BF00393469.
36. Bubber, Parvesh, Vahram Haroutunian, Gene Fisch, John P. Blass, and Gary E. Gibson. 2005. “Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer Brain: Mechanistic Implications.” *Annals of Neurology* 57 (5):695–703. https://doi.org/10.1002/ana.20474.
37. Budd, S L, and D G Nicholls. 1996. “Mitochondria, Calcium Regulation, and Acute Glutamate Excitotoxicity in Cultured Cerebellar Granule Cells.” *Journal of Neurochemistry* 67 (6):2282–91. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8931459.
38. Burke, P V, D C Raitt, L A Allen, E A Kellogg, and R O Poyton. 1997. “Effects of Oxygen Concentration on the Expression of Cytochrome c and Cytochrome c Oxidase Genes in Yeast.” *The Journal of Biological Chemistry* 272 (23). American Society for Biochemistry and Molecular Biology:14705–12. https://doi.org/10.1074/JBC.272.23.14705.
39. Burns, R S, C C Chiueh, S P Markey, M H Ebert, D M Jacobowitz, and I J Kopin. 1983. “A Primate Model of Parkinsonism: Selective Destruction of Dopaminergic Neurons in the Pars Compacta of the Substantia Nigra by N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (14):4546–50. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6192438.
40. Butterfield, D. Allan, and Rukhsana Sultana. 2007. “Redox Proteomics Identification of Oxidatively Modified Brain Proteins in Alzheimer’s Disease and Mild Cognitive Impairment: Insights into the Progression of This Dementing Disorder.” Edited by Patrizia Mecocci. *Journal of Alzheimer’s Disease* 12 (1). IOS Press:61–72. https://doi.org/10.3233/JAD-2007-12107.

41. Butterfield, D A, J Drake, C Pocernich, and A Castegna. 2001. “Evidence of Oxidative Damage in Alzheimer’s Disease Brain: Central Role for Amyloid Beta-Peptide.” *Trends in Molecular Medicine* 7 (12):548–54. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733217.
42. Calabrese, Edward J., Kenneth A. Bachmann, A. John Bailer, P. Michael Bolger, Jonathan Borak, Lu Cai, Nina Cedergreen, et al. 2007. “Biological Stress Response Terminology: Integrating the Concepts of Adaptive Response and Preconditioning Stress within a Hormetic Dose–response Framework.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 222 (1):122–28. https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.015.
43. Camarasa, C., Jean-Philippe Grivet, and Sylvie Dequin. 2003. “Investigation by 13C-NMR and Tricarboxylic Acid (TCA) Deletion Mutant Analysis of Pathways for Succinate Formation in Saccharomyces Cerevisiae during Anaerobic Fermentation.” *Microbiology* 149 (9). Microbiology Society:2669–78. https://doi.org/10.1099/mic.0.26007-0.
44. Cardoso, Sandra M., Isabel Santana, Russell H. Swerdlow, and Catarina R. Oliveira. 2004. “Mitochondria Dysfunction of Alzheimer’s Disease Cybrids Enhances Aβ Toxicity.” *Journal of Neurochemistry* 89 (6):1417–26. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02438.x.
45. Carroll, Joe, Ian M Fearnley, Richard J Shannon, Judy Hirst, and John E Walker. 2003. “Analysis of the Subunit Composition of Complex I from Bovine Heart Mitochondria.” *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 2 (2). American Society for Biochemistry and Molecular Biology:117–26. https://doi.org/10.1074/mcp.M300014-MCP200.
46. Caspersen, C., Ning Wang, Jun Yao, Alexander Sosunov, Xi Chen, Joyce W Lustbader, Hong Wei Xu, David Stern, Guy McKhann, and Shi Du Yan. 2005. “Mitochondrial A : A Potential Focal Point for Neuronal Metabolic Dysfunction in Alzheimer’s Disease.” *The FASEB Journal* 19 (14):2040–41. https://doi.org/10.1096/fj.05-3735fje.
47. Cassis, Paola, Sara Conti, Giuseppe Remuzzi, and Ariela Benigni. 2010. “Angiotensin Receptors as Determinants of Life Span.” *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 459 (2):325–32. https://doi.org/10.1007/s00424-009-0725-4.
48. Castegna, Alessandra, Michael Aksenov, Marina Aksenova, Visith Thongboonkerd, Jon B Klein, William M Pierce, Rosemarie Booze, William R Markesbery, and D Allan Butterfield. 2002. “Proteomic Identification of Oxidatively Modified Proteins in

Alzheimer's Disease Brain. Part I: Creatine Kinase BB, Glutamine Synthase, and Ubiquitin Carboxy-Terminal Hydrolase L-1." *Free Radical Biology & Medicine* 33 (4):562–71. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160938.

49. Castegna, Alessandra, Michael Aksenov, Visith Thongboonkerd, Jon B Klein, William M Pierce, Rosemarie Booze, William R Markesbery, and D Allan Butterfield. 2002. "Proteomic Identification of Oxidatively Modified Proteins in Alzheimer's Disease Brain. Part II: Dihydropyrimidinase-Related Protein 2, Alpha-Enolase and Heat Shock Cognate 71." *Journal of Neurochemistry* 82 (6):1524–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354300.
50. Cavanagh, Elena MV de, Marcelo Ferder, Felipe Inserra, and Leon Ferder. 2009. "Angiotensin II, Mitochondria, Cytoskeletal, and Extracellular Matrix Connections: An Integrating Viewpoint." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 296 (3):H550–58. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01176.2008.
51. Chang, Diane T.W., and Ian J. Reynolds. 2006. "Mitochondrial Trafficking and Morphology in Healthy and Injured Neurons." *Progress in Neurobiology* 80 (5):241–68. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.09.003.
52. Chen, Chen, Misaki Ono, Mikako Takeshima, and Shuji Nakano. 2014. "Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Activity of Nobiletin against Three Subtypes of Human Breast Cancer Cell Lines." *Anticancer Research* 34 (4):1785–92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24692711.
53. Cheng, Aiwu, Ruiqian Wan, Jenq-Lin Yang, Naomi Kamimura, Tae Gen Son, Xin Ouyang, Yongquan Luo, Eitan Okun, and Mark P. Mattson. 2012. "Involvement of PGC-1α in the Formation and Maintenance of Neuronal Dendritic Spines." *Nature Communications* 3 (December):1250. https://doi.org/10.1038/ncomms2238.
54. Chevtzoff, Cyrille, Julie Vallortigara, Nicole Avéret, Michel Rigoulet, and Anne Devin. 2005. "The Yeast cAMP Protein Kinase Tpk3p Is Involved in the Regulation of Mitochondrial Enzymatic Content during Growth." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706 (1–2). Elsevier:117–25. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2004.10.001.
55. Chevtzoff, Cyrille, Edgar D Yoboue, Anne Galinier, Louis Casteilla, Bertrand Daignan-

Fornier, Michel Rigoulet, and Anne Devin. 2010. “Reactive Oxygen Species-Mediated Regulation of Mitochondrial Biogenesis in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae.” *The Journal of Biological Chemistry* 285 (3). American Society for Biochemistry and Molecular Biology:1733–42. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019570.

56. Chinopoulos, Christos, Akos A Gerencser, Miklos Mandi, Katalin Mathe, Beata Töröcsik, Judit Doczi, Lilla Turiak, et al. 2010. “Forward Operation of Adenine Nucleotide Translocase during F0F1-ATPase Reversal: Critical Role of Matrix Substrate-Level Phosphorylation.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (7). The Federation of American Societies for Experimental Biology:2405–16. https://doi.org/10.1096/fj.09-149898.
57. Choi, Soo-Youn, Joon-Ho Hwang, Hee-Chul Ko, Ji-Gweon Park, and Se-Jae Kim. 2007. “Nobiletin from Citrus Fruit Peel Inhibits the DNA-Binding Activity of NF-κB and ROS Production in LPS-Activated RAW 264.7 Cells.” *Journal of Ethnopharmacology* 113 (1):149–55. https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.021.
58. Chomyn, Anne, Michael W. J. Cleeter, C. Ian Ragan, Marcia Riley, Russell F. Doolittle, and Giuseppe Attardi. 1986. “URF6, Last Unidentified Reading Frame of Human mtDNA, Codes for an NADH Dehydrogenase Subunit.” *Science*. American Association for the Advancement of Science. https://doi.org/10.2307/1697865.
59. Ciriacy, Michael. 1979. “Isolation and Characterization of Further Cis- and Trans-Acting Regulatory Elements Involved in the Synthesis of Glucose-Repressible Alcohol Dehydrogenase (ADHII) in Saccharomyces Cerevisiae.” *MGG Molecular & General Genetics* 176 (3). Springer-Verlag:427–31. https://doi.org/10.1007/BF00333107.
60. Clarke, Donald D, and Louis Sokoloff. 1999. *Circulation and Energy Metabolism of the Brain*. Lippincott-Raven. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20413/.
61. Comte, Blandine, Geneviève Vincent, Bertrand Bouchard, Mohamed Benderdour, and Christine Des Rosiers. 2002. “Reverse Flux through Cardiac NADP $^{+}$ -Isocitrate Dehydrogenase under Normoxia and Ischemia.” *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283 (4). American Physiological SocietyBethesda, MD :H1505–14. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00287.2002.
62. Covian, Raul, and Robert S Balaban. 2012. “Cardiac Mitochondrial Matrix and

Respiratory Complex Protein Phosphorylation." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 303 (8). American Physiological Society:H940-66. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00077.2012.

63. DABRUNDASHVILI, NINO G., EKA B. KVARATSKHELIA, MAIA GAGUA, EKATERINE MAISURADZE, IRAKLI CHKHIKVISHVILI, ELENE I. ZHURAVLIOVA, and DAVID G. MIKELADZE. 2011. "NOBILETIN TRANSIENTLY INCREASES THE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND CHANGES THE ACTIVITY OF SUCCINATE DEHYDROGENASE IN HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES." *Journal of Food Biochemistry* 35 (2):638–49. https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00407.x.
64. Das, D K. 1994. "Naturally Occurring Flavonoids: Structure, Chemistry, and High-Performance Liquid Chromatography Methods for Separation and Characterization." *Methods in Enzymology* 234:410–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7808313.
65. Datla, K P, M Christidou, W W Widmer, H K Rooprai, and D T Dexter. 2001. "Tissue Distribution and Neuroprotective Effects of Citrus Flavonoid Tangeretin in a Rat Model of Parkinson's Disease." *Neuroreport* 12 (17):3871–75. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726811.
66. Davis, Laurie M., Jong M. Rho, and Patrick G. Sullivan. 2008. "UCP-Mediated Free Fatty Acid Uncoupling of Isolated Cortical Mitochondria from Fasted Animals: Correlations to Dietary Modulations." *Epilepsia* 49 (November):117–19. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01854.x.
67. Degli Esposti, M. 1998. "Inhibitors of NADH-Ubiquinone Reductase: An Overview." *Biochimica et Biophysica Acta* 1364 (2):222–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593904.
68. Dejean, L, B Beauvoit, B Guérin, and M Rigoulet. 2000. "Growth of the Yeast Saccharomyces Cerevisiae on a Non-Fermentable Substrate: Control of Energetic Yield by the Amount of Mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta* 1457 (1–2):45–56. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10692549.
69. DEKEN, R. H. DE. 1966. "The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast." *Journal of General Microbiology* 44 (2):149–56. https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149.
70. Devi, L., Badanavalu M Prabhu, Domenico F Galati, Narayan G Avadhani, and Hindupur

K Anandatheerthavarada. 2006. “Accumulation of Amyloid Precursor Protein in the Mitochondrial Import Channels of Human Alzheimer’s Disease Brain Is Associated with Mitochondrial Dysfunction.” *Journal of Neuroscience* 26 (35):9057–68. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006.

71. Devin, Anne, Laurent Dejean, Bertrand Beauvoit, Cyrille Chevtzoff, Nicole Avéret, Odile Bunoust, and Michel Rigoulet. 2006. “Growth Yield Homeostasis in Respiring Yeast Is due to a Strict Mitochondrial Content Adjustment.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (37). American Society for Biochemistry and Molecular Biology:26779–84. https://doi.org/10.1074/jbc.M604800200.
72. Dietrich, M. O., Z. B. Andrews, and T. L. Horvath. 2008. “Exercise-Induced Synaptogenesis in the Hippocampus Is Dependent on UCP2-Regulated Mitochondrial Adaptation.” *Journal of Neuroscience* 28 (42):10766–71. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2744-08.2008.
73. Dijken, Johannes P., and W.Alexander Scheffers. 1986. “Redox Balances in the Metabolism of Sugars by Yeasts.” *FEMS Microbiology Letters* 32 (3–4). Blackwell Publishing Ltd:199–224. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01194.x.
74. Dikalova, A. E., A. T. Bikineyeva, K. Budzyn, R. R. Nazarewicz, L. McCann, W. Lewis, D. G. Harrison, and S. I. Dikalov. 2010. “Therapeutic Targeting of Mitochondrial Superoxide in Hypertension.” *Circulation Research* 107 (1):106–16. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214601.
75. Duan, Wenzhen, and Mark P. Mattson. 1999. “Dietary Restriction and 2-Deoxyglucose Administration Improve Behavioral Outcome and Reduce Degeneration of Dopaminergic Neurons in Models of Parkinson’s Disease.” *Journal of Neuroscience Research* 57 (2):195–206. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990715)57:2<195::AID-JNR5>3.0.CO;2-P.
76. Eckert, Anne, Susanne Hauptmann, Isabel Scherping, Virginie Rhein, Franz Müller-Spahn, Jürgen Götz, and Walter E Müller. 2008. “Soluble Beta-Amyloid Leads to Mitochondrial Defects in Amyloid Precursor Protein and Tau Transgenic Mice.” *Neuro-Degenerative Diseases* 5 (3–4). Karger Publishers:157–59. https://doi.org/10.1159/000113689.
77. Egert, Sarah, and Gerald Rimbach. 2011. “Which Sources of Flavonoids: Complex Diets or

Dietary Supplements?" *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)* 2 (1). American Society for Nutrition:8–14. https://doi.org/10.3945/an.110.000026.

78. Eriksson, P, L André, R Ansell, A Blomberg, and L Adler. 1995. "Cloning and Characterization of GPD2, a Second Gene Encoding Sn-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase (NAD+) in Saccharomyces Cerevisiae, and Its Comparison with GPD1." *Molecular Microbiology* 17 (1):95–107. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7476212.
79. Esteves, P., C. Pecqueur, C. Ransy, C. Esnous, V. Lenoir, F. Bouillaud, A.-L. Bulteau, et al. 2014. "Mitochondrial Retrograde Signaling Mediated by UCP2 Inhibits Cancer Cell Proliferation and Tumorigenesis." *Cancer Research* 74 (14):3971–82. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3383.
80. Flikweert, M T, L Van Der Zanden, W M Janssen, H Y Steensma, J P Van Dijken, and J T Pronk. 1996. "Pyruvate Decarboxylase: An Indispensable Enzyme for Growth of Saccharomyces Cerevisiae on Glucose." *Yeast (Chichester, England)* 12 (3):247–57. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19960315)12:3<247::AID-YEA911>3.0.CO;2-I.
81. Flores, C L, C Rodríguez, T Petit, and C Gancedo. 2000. "Carbohydrate and Energy-Yielding Metabolism in Non-Conventional Yeasts." *FEMS Microbiology Reviews* 24 (4):507–29. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978549.
82. Formentini, L., M. P. Pereira, L. Sanchez-Cenizo, F. Santacatterina, J. J. Lucas, C. Navarro, A. Martinez-Serrano, and J. M. Cuezva. 2014. "In Vivo Inhibition of the Mitochondrial H+-ATP Synthase in Neurons Promotes Metabolic Preconditioning." *The EMBO Journal* 33 (7):762–78. https://doi.org/10.1002/embj.201386392.
83. Franko, Andras, Olivier R Baris, Eva Bergschneider, Christine Von Toerne, Stefanie M Hauck, Michaela Aichler, Axel K Walch, et al. 2013. "Efficient Isolation of Pure and Functional Mitochondria from Mouse Tissues Using Automated Tissue Disruption and Enrichment with Anti-TOM22 Magnetic Beads." https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082392.
84. Friedrich, T, and D Scheide. 2000. "The Respiratory Complex I of Bacteria, Archaea and Eukarya and Its Module Common with Membrane-Bound Multisubunit Hydrogenases." *FEBS Letters* 479 (1–2):1–5. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10940377.

85. Gaki, Georgia S., and Athanasios G. Papavassiliou. 2014. “Oxidative Stress-Induced Signaling Pathways Implicated in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease.” *NeuroMolecular Medicine* 16 (2):217–30. https://doi.org/10.1007/s12017-014-8294-x.
86. Geisler, J. G. 2011. “Targeting Energy Expenditure via Fuel Switching and beyond.” *Diabetologia* 54 (2):237–44. https://doi.org/10.1007/s00125-010-1932-4.
87. Gibson, G. E., K.-F. R. Sheu, and J. P. Blass. 1998. “Abnormalities of Mitochondrial Enzymes in Alzheimer Disease.” *Journal of Neural Transmission* 105 (8–9):855–70. https://doi.org/10.1007/s007020050099.
88. Gibson, G E, L C Park, K F Sheu, J P Blass, and N Y Calingasan. 2000. “The Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex in Neurodegeneration.” *Neurochemistry International* 36 (2):97–112. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676873.
89. Gibson, Gary E., Anatoly Starkov, John P. Blass, Rajiv R. Ratan, and M. Flint Beal. 2010. “Cause and Consequence: Mitochondrial Dysfunction Initiates and Propagates Neuronal Dysfunction, Neuronal Death and Behavioral Abnormalities in Age-Associated Neurodegenerative Diseases.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (1):122–34. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.010.
90. Giralt, Marta, and Francesc Villarroya. 2017. “Mitochondrial Uncoupling and the Regulation of Glucose Homeostasis.” *Current Diabetes Reviews* 13 (4):386–94. https://doi.org/10.2174/1573399812666160217122707.
91. Golozoubova, V., E Hohtola, A Matthias, A Jacobsson, B Cannon, and J Nedergaard. 2001. “Only UCP1 Can Mediate Adaptive Nonshivering Thermogenesis in the Cold.” *The FASEB Journal* 15 (11):2048–50. https://doi.org/10.1096/fj.00-0536fje.
92. Gonzalez-Lima, F., Bryan R. Barksdale, and Julio C. Rojas. 2014. “Mitochondrial Respiration as a Target for Neuroprotection and Cognitive Enhancement.” *Biochemical Pharmacology* 88 (4):584–93. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.11.010.
93. González Siso, M.I., M.A. Freire Picos, and M.E. Cerddn. 1996. “Reoxidation of the NADPH Produced by the Pentose Phosphate Pathway Is Necessary for the Utilization of Glucose by Kluyveromyces Lactis rag2 Mutants.” *FEBS Letters* 387 (1). No longer published by Elsevier:7–10. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00390-0.
94. Grigorieff, N. 1998. “Three-Dimensional Structure of Bovine NADH:ubiquinone

Oxidoreductase (Complex I) at 22 Å in Ice." *Journal of Molecular Biology* 277 (5):1033–46. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1668.

95. Groot, H de, and U Rauen. 1998. "Tissue Injury by Reactive Oxygen Species and the Protective Effects of Flavonoids." *Fundamental & Clinical Pharmacology* 12 (3):249–55. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9646056.
96. Guénebaut, V, A Schlitt, H Weiss, K Leonard, and T Friedrich. 1998. "Consistent Structure between Bacterial and Mitochondrial NADH:ubiquinone Oxidoreductase (Complex I)." *Journal of Molecular Biology* 276 (1):105–12. https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1518.
97. Guérin, B, P Labbe, and M Somlo. 1979. "Preparation of Yeast Mitochondria (Saccharomyces Cerevisiae) with Good P/O and Respiratory Control Ratios." *Methods in Enzymology* 55:149–59. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/379498.
98. Guerrero, Erika, P. Vasudevaraju, Muralidhar L. Hegde, G. B. Britton, and K. S. Rao. 2013. "Recent Advances in α-Synuclein Functions, Advanced Glycation, and Toxicity: Implications for Parkinson's Disease." *Molecular Neurobiology* 47 (2):525–36. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8328-z.
99. Halagappa, Veerendra Kumar Madala, Zhihong Guo, Michelle Pearson, Yasuji Matsuoka, Roy G. Cutler, Frank M. LaFerla, and Mark P. Mattson. 2007. "Intermittent Fasting and Caloric Restriction Ameliorate Age-Related Behavioral Deficits in the Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Disease* 26 (1):212–20. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.019.
100. Han, D, E Williams, and E Cadenas. 2001. "Mitochondrial Respiratory Chain-Dependent Generation of Superoxide Anion and Its Release into the Intermembrane Space." *The Biochemical Journal* 353 (Pt 2). Portland Press Ltd:411–16. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139407.
101. Harborne, J B, and C A Williams. 2000. "Advances in Flavonoid Research since 1992." *Phytochemistry* 55 (6):481–504. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130659.
102. Hardy, John, Patrick Lewis, Tamas Revesz, Andrew Lees, and Coro Paisan-Ruiz. 2009. "The Genetics of Parkinson's Syndromes: A Critical Review." *Current Opinion in Genetics & Development* 19 (3):254–65. https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.03.008.

103. Hauptmann, S., I. Scherping, S. Dröse, U. Brandt, K.L. Schulz, M. Jendrach, K. Leuner, A. Eckert, and W.E. Müller. 2009. "Mitochondrial Dysfunction: An Early Event in Alzheimer Pathology Accumulates with Age in AD Transgenic Mice." *Neurobiology of Aging* 30 (10):1574–86. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.005.

104. Hausenloy, D., Abigail Wynne, Michael Duchen, and Derek Yellon. 2004. "Transient Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening Mediates Preconditioning-Induced Protection." *Circulation* 109 (14):1714–17. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000126294.81407.7D.

105. Heerde, E., and F. Radler. 1978. "Metabolism of the Anaerobic Formation of Succinic Acid bySaccharomyces Cerevisiae." *Archives of Microbiology* 117 (3). Springer-Verlag:269–76. https://doi.org/10.1007/BF00738546.

106. Heikkila, R E, L Manzino, F S Cabbat, and R C Duvoisin. 1984. "Protection against the Dopaminergic Neurotoxicity of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridine by Monoamine Oxidase Inhibitors." *Nature* 311 (5985):467–69. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6332989.

107. Herrero-Mendez, Angel, Angeles Almeida, Emilio Fernández, Carolina Maestre, Salvador Moncada, and Juan P. Bolaños. 2009. "The Bioenergetic and Antioxidant Status of Neurons Is Controlled by Continuous Degradation of a Key Glycolytic Enzyme by APC/C–Cdh1." *Nature Cell Biology* 11 (6):747–52. https://doi.org/10.1038/ncb1881.

108. Hirai, K, G Aliev, A Nunomura, H Fujioka, R L Russell, C S Atwood, A B Johnson, et al. 2001. "Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (9):3017–23. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312286.

109. Hirsch, E C, G Höglinger, E Rousselet, T Breidert, K Parain, J Feger, M Ruberg, A Prigent, C Cohen-Salmon, and J M Launay. 2003. "Animal Models of Parkinson's Disease in Rodents Induced by Toxins: An Update." *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, no. 65:89–100. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946051.

110. Ho, Philip WL, Jessica WM Ho, Hui-Fang Liu, Danny HF So, Zero HM Tse, Koon-Ho Chan, David B Ramsden, and Shu-Leong Ho. 2012. "Mitochondrial Neuronal Uncoupling Proteins: A Target for Potential Disease-Modification in Parkinson's Disease."

Translational Neurodegeneration 1 (1):3. https://doi.org/10.1186/2047-9158-1-3.

111. Holt, Peter J., David J. Morgan, and Leonid A. Sazanov. 2003. "The Location of NuoL and NuoM Subunits in the Membrane Domain of the *Escherichia Coli* Complex I." *Journal of Biological Chemistry* 278 (44):43114–20. https://doi.org/10.1074/jbc.M308247200.

112. Hu, Q., B. Li, R. Xu, D. Chen, C. Mu, E. Fei, and G. Wang. 2012. "The Protease Omi Cleaves the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase MEK1 to Inhibit Microglial Activation." *Science Signaling* 5 (238):ra61-ra61. https://doi.org/10.1126/scisignal.2002946.

113. Hu, Qingsong, and Guanghui Wang. 2016. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Translational Neurodegeneration* 5 (1). BioMed Central:14. https://doi.org/10.1186/s40035-016-0060-6.

114. Hüttemann, Maik, Stefan Helling, Thomas H. Sanderson, Christopher Sinkler, Lobelia Samavati, Gargi Mahapatra, Ashwathy Varughese, et al. 2012. "Regulation of Mitochondrial Respiration and Apoptosis through Cell Signaling: Cytochrome c Oxidase and Cytochrome c in Ischemia/reperfusion Injury and Inflammation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817 (4):598–609. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.07.001.

115. Hwang, Ran-Der, Lyle Wiemerslage, Christopher J. LaBreck, Munzareen Khan, Kavitha Kannan, Xinglong Wang, Xiongwei Zhu, Daewoo Lee, and Yih-Woei C. Fridell. 2014. "The Neuroprotective Effect of Human Uncoupling Protein 2 (hUCP2) Requires cAMP-Dependent Protein Kinase in a Toxin Model of Parkinson's Disease." *Neurobiology of Disease* 69 (September):180–91. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.032.

116. Hyder, Fahmeed, Anant B Patel, Albert Gjedde, Douglas L Rothman, Kevin L Behar, and Robert G Shulman. 2006. "Neuronal–Glial Glucose Oxidation and Glutamatergic–GABAergic Function." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 26 (7):865–77. https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600263.

117. J. A. Barnett, R. W. Payne and D. Yarrow ; photomicrographs by Linda Barnett. 2000. *Yeasts : Characteristics and Identification*. 3rd ed. Cambridge, U.K. ; New York, NY,

USA : Cambridge University Press. https://trove.nla.gov.au/work/5635020?q&sort=holdings+desc&_=1516194349307&versionId=45684471.

118. Jackson, J. Baz. 2012. "A Review of the Binding-Change Mechanism for Proton-Translocating Transhydrogenase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817 (10). Elsevier:1839–46. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2012.04.006.

119. Jagow, Gebhard, and Martin Klingenberg. 1970. "Pathways of Hydrogen in Mitochondria of Saccharomyces Carlsbergensis." *European Journal of Biochemistry* 12 (3). Blackwell Publishing Ltd:583–92. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1970.tb00890.x.

120. Janssen, Antoon J M, Frans J M Trijbels, Rob C A Sengers, Jan A M Smeitink, Lambert P van den Heuvel, Liesbeth T M Wintjes, Berendien J M Stoltenborg-Hogenkamp, and Richard J T Rodenburg. 2007. "Spectrophotometric Assay for Complex I of the Respiratory Chain in Tissue Samples and Cultured Fibroblasts." *Clinical Chemistry* 53 (4). Clinical Chemistry:729–34. https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.078873.

121. Janssen, Rolf J. R. J., Leo G. Nijtmans, Lambert P. van den Heuvel, and Jan A. M. Smeitink. 2006. "Mitochondrial Complex I: Structure, Function and Pathology." *Journal of Inherited Metabolic Disease* 29 (4):499–515. https://doi.org/10.1007/s10545-006-0362-4.

122. Jenner, Peter. 2003. "Oxidative Stress in Parkinson's Disease." *Annals of Neurology* 53 (S3):S26–38. https://doi.org/10.1002/ana.10483.

123. Johnson, Michaela E., and Larisa Bobrovskaya. 2015. "An Update on the Rotenone Models of Parkinson's Disease: Their Ability to Reproduce the Features of Clinical Disease and Model Gene–environment Interactions." *NeuroToxicology* 46 (January):101–16. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.12.002.

124. Jojua, Natia, Nino Sharikadze, Elene Zhuravliova, Elnari Zaalishvili, and David G. Mikeladze. 2015. "Nobiletin Restores Impaired Hippocampal Mitochondrial Bioenergetics in Hypothyroidism through Activation of Matrix Substrate-Level Phosphorylation." *Nutritional Neuroscience* 18 (5). Taylor & Francis:225–31. https://doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000120.

125. Kandaswami, C, E Perkins, D S Soloniuk, G Drzewiecki, and E Middleton. 1991.

"Antiproliferative Effects of Citrus Flavonoids on a Human Squamous Cell Carcinoma in Vitro." *Cancer Letters* 56 (2):147–52. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1998943.

126. Keeney, P. M., Jing Xie, Roderick A Capaldi, and James P Bennett. 2006. "Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled." *Journal of Neuroscience* 26 (19):5256–64. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0984-06.2006.

127. Keil, Uta, Astrid Bonert, Celio A. Marques, Isabel Scherping, Jörg Weyermann, Joanna B. Strosznajder, Franz Müller-Spahn, et al. 2004. "Amyloid β-Induced Changes in Nitric Oxide Production and Mitochondrial Activity Lead to Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 279 (48):50310–20. https://doi.org/10.1074/jbc.M405600200.

128. Keller, J. N., F. A. Schmitt, S. W. Scheff, Q. Ding, Q. Chen, D. A. Butterfield, and W. R. Markesbery. 2005. "Evidence of Increased Oxidative Damage in Subjects with Mild Cognitive Impairment." *Neurology* 64 (7):1152–56. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156156.13641.BA.

129. Khatri, Natasha, and Heng-Ye Man. 2013. "Synaptic Activity and Bioenergy Homeostasis: Implications in Brain Trauma and Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Neurology* 4 (December). Frontiers Media SA:199. https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00199.

130. Kiers, Janine, Anne-Marie Zeeman, Marijke Luttik, Claudia Thiele, Juan I. Castrillo, H. Y. Steensma, Johannes P. Van Dijken, and Jack T. Pronk. 1998. "Regulation of Alcoholic Fermentation in Batch and Chemostat Cultures ofKluyveromyces Lactis CBS 2359." *Yeast* 14 (5):459–69. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980330)14:5<459::AID-YEA248>3.0.CO;2-O.

131. King, Martin S, Mark S Sharpley, and Judy Hirst. 2009. "Reduction of Hydrophilic Ubiquinones by the Flavin in Mitochondrial NADH:ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) and Production of Reactive Oxygen Species." *Biochemistry* 48 (9). American Chemical Society:2053–62. https://doi.org/10.1021/bi802282h.

132. Kiss, G., C. Konrad, J. Doczi, A. A. Starkov, H. Kawamata, G. Manfredi, S. F. Zhang, et al. 2013. "The Negative Impact of -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Deficiency on Matrix Substrate-Level Phosphorylation." *The FASEB Journal* 27 (6):2392–2406.

https://doi.org/10.1096/fj.12-220202.

133. Ko, Li-wen, Kwan-Fu Rex Sheu, Howard T. Thaler, William R, Markesbury, and John P. Blass. 2001. "Selective Loss of KGDHC-Enriched Neurons in Alzheimer Temporal Cortex." *Journal of Molecular Neuroscience* 17 (3):361–70. https://doi.org/10.1385/JMN:17:3:361.

134. Kolata, G. 1983. "Monkey Model of Parkinson's Disease." *Science (New York, N.Y.)* 220 (4598). American Association for the Advancement of Science:705. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6403987.

135. Kondoh, Hiroshi. 2008. "Cellular Life Span and the Warburg Effect." *Experimental Cell Research* 314 (9):1923–28. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.03.007.

136. Kontush, A. 2001. "Amyloid-Beta: An Antioxidant That Becomes a pro-Oxidant and Critically Contributes to Alzheimer's Disease." *Free Radical Biology & Medicine* 31 (9):1120–31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11677045.

137. Kowaltowski, Alicia J., Nadja C. de Souza-Pinto, Roger F. Castilho, and Anibal E. Vercesi. 2009. "Mitochondria and Reactive Oxygen Species." *Free Radical Biology and Medicine* 47 (4):333–43. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004.

138. Lagoa, Ricardo, Ilaria Graziani, Carmen Lopez-Sanchez, Virginio Garcia-Martinez, and Carlos Gutierrez-Merino. 2011. "Complex I and Cytochrome c Are Molecular Targets of Flavonoids That Inhibit Hydrogen Peroxide Production by Mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807 (12):1562–72. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.09.022.

139. Lagunas, R. 1979. "Energetic Irrelevance of Aerobiosis for S. Cerevisiae Growing on Sugars." *Molecular and Cellular Biochemistry* 27 (3). Kluwer Academic Publishers:139–46. https://doi.org/10.1007/BF00215362.

140. Lagunas, Rasario. 1986. "Misconceptions about the Energy Metabolism ofSaccharomyces Cerevisiae." *Yeast* 2 (4). John Wiley & Sons, Ltd.:221–28. https://doi.org/10.1002/yea.320020403.

141. Lagunas, Rosario. 1981. "Is Saccharomyces Cerevisiae a Typical Facultative Anaerobe?" *Trends in Biochemical Sciences* 6 (January). Elsevier:201–3. https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90073-6.

142. Lai, Hui-Chi, Ming-Jiuan Wu, Pei-Yi Chen, Ting-Ting Sheu, Szu-Ping Chiu, Meng-Han Lin, Chi-Tang Ho, and Jui-Hung Yen. 2011. "Neurotrophic Effect of Citrus 5-Hydroxy-3,6,7,8,3′,4′-Hexamethoxyflavone: Promotion of Neurite Outgrowth via cAMP/PKA/CREB Pathway in PC12 Cells." Edited by Charleen T. Chu. *PLoS ONE* 6 (11). Public Library of Science:e28280. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028280.

143. Lambeth, David O., Kristin N. Tews, Steven Adkins, Dean Frohlich, and Barry I. Milavetz. 2004. "Expression of Two Succinyl-CoA Synthetases with Different Nucleotide Specificities in Mammalian Tissues." *Journal of Biological Chemistry* 279 (35):36621–24. https://doi.org/10.1074/jbc.M406884200.

144. Langston, J W, P Ballard, J W Tetrud, and I Irwin. 1983. "Chronic Parkinsonism in Humans due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis." *Science (New York, N.Y.)* 219 (4587):979–80. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6823561.

145. Larsson, K, F Böhl, I Sjöström, N Akhtar, D Strand, B M Mechler, R Grabowski, and L Adler. 1998. "The Saccharomyces Cerevisiae SOP1 and SOP2 Genes, Which Act in Cation Homeostasis, Can Be Functionally Substituted by the Drosophila lethal(2)giant Larvae Tumor Suppressor Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (50):33610–18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9837945.

146. Larsson, Katrin, Ricky Ansell, Peter Eriksson, and Lennart Adler. 1993. "A Gene Encoding Sn-glycerol 3-phosphate Dehydrogenase (NAD+) Complements an Osmosensitive Mutant of Saccharomyces Cerevisiae." *Molecular Microbiology* 10 (5). Blackwell Publishing Ltd:1101–11. https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1993.TB00980.X.

147. Lascaris, Romeo, Harmen J Bussemaker, André Boorsma, Matt Piper, Hans van der Spek, Les Grivell, and Jolanda Blom. 2003. "Hap4p Overexpression in Glucose-Grown Saccharomyces Cerevisiae Induces Cells to Enter a Novel Metabolic State." *Genome Biology* 4 (1). BioMed Central:R3. https://doi.org/10.1186/GB-2002-4-1-R3.

148. Le, Weidong. 2014. "Role of Iron in UPS Impairment Model of Parkinson's Disease." *Parkinsonism & Related Disorders* 20 (January):S158–61. https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70038-5.

149. Lenaz, Giorgio, Romana Fato, Maria Luisa Genova, Christian Bergamini, Cristina Bianchi, and Annalisa Biondi. 2006. "Mitochondrial Complex I: Structural and Functional

Aspects." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757 (9–10). Elsevier:1406–20. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2006.05.007.

150. Li, Rachel W., Andre G. Theriault, Karen Au, Teresa D. Douglas, Adele Casaschi, Elzbieta M. Kurowska, and Rinee Mukherjee. 2006. "Citrus Polymethoxylated Flavones Improve Lipid and Glucose Homeostasis and Modulate Adipocytokines in Fructose-Induced Insulin Resistant Hamsters." *Life Sciences* 79 (4):365–73. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.023.

151. Li, Shiming, Chih-Yu Lo, and Chi-Tang Ho. 2006. "Hydroxylated Polymethoxyflavones and Methylated Flavonoids in Sweet Orange (*Citrus Sinensis*) Peel." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (12):4176–85. https://doi.org/10.1021/jf060234n.

152. Li, Shiming, Min Hsiung Pan, Ching Shu Lai, Chih Yu Lo, Slavik Dushenkov, and Chi Tang Ho. 2007. "Isolation and Syntheses of Polymethoxyflavones and Hydroxylated Polymethoxyflavones as Inhibitors of HL-60 Cell Lines." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15 (10):3381–89. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.021.

153. Li, Zheng, Ken-Ichi Okamoto, Yasunori Hayashi, and Morgan Sheng. 2004. "The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses." *Cell* 119 (6):873–87. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.003.

154. Liu, Dong, Sic. L. Chan, Nadja C. de Souza-Pinto, John R. Slevin, Robert P. Wersto, Ming Zhan, Khadija Mustafa, Rafael de Cabo, and Mark P. Mattson. 2006. "Mitochondrial UCP4 Mediates an Adaptive Shift in Energy Metabolism and Increases the Resistance of Neurons to Metabolic and Oxidative Stress." *NeuroMolecular Medicine* 8 (3):389–414. https://doi.org/10.1385/NMM:8:3:389.

155. Liu, Dong, Chengbiao Lu, Ruiqian Wan, Wendy W. Auyeung, and Mark P. Mattson. 2002. "Activation of Mitochondrial ATP-Dependent Potassium Channels Protects Neurons against Ischemia-Induced Death by a Mechanism Involving Suppression of Bax Translocation and Cytochrome *c* Release." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 22 (4):431–43. https://doi.org/10.1097/00004647-200204000-00007.

156. Liu, Dong, Michael Pitta, Jong-Hwan Lee, Balmiki Ray, Debomoy K. Lahiri, Katsutoshi Furukawa, Mohamed Mughal, et al. 2010. "The KATP Channel Activator

Diazoxide Ameliorates Amyloid-β and Tau Pathologies and Improves Memory in the 3xTgAD Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 22 (2):443–57. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101017.

157. Liu, Dong, Yongqing Zhang, Robert Gharavi, Hee Ra Park, Jaewon Lee, Sana Siddiqui, Richard Telljohann, et al. 2015. "The Mitochondrial Uncoupler DNP Triggers Brain Cell mTOR Signaling Network Reprogramming and CREB Pathway up-Regulation." *Journal of Neurochemistry* 134 (4):677–92. https://doi.org/10.1111/jnc.13176.

158. Liu, Yajun, Lianbi Chen, Xiaoqun Xu, Eric Vicaut, and Richard Sercombe. 2009. "Both Ischemic Preconditioning and Ghrelin Administration Protect Hippocampus from Ischemia/reperfusion and Upregulate Uncoupling Protein-2." *BMC Physiology* 9 (1):17. https://doi.org/10.1186/1472-6793-9-17.

159. Lustbader, J. W., Maurizio Cirilli, Chang Lin, Hong Wei Xu, Kazuhiro Takuma, Ning Wang, Casper Caspersen, et al. 2004. "ABAD Directly Links A to Mitochondrial Toxicity in Alzheimer's Disease." *Science* 304 (5669):448–52. https://doi.org/10.1126/science.1091230.

160. Luttik, M A, K M Overkamp, P Kötter, S de Vries, J P van Dijken, and J T Pronk. 1998. "The Saccharomyces Cerevisiae NDE1 and NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the Oxidation of Cytosolic NADH." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (38):24529–34. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733747.

161. Mancuso, Michelangelo, Fabio Coppedè, Luigi Murri, and Gabriele Siciliano. 2007. "Mitochondrial Cascade Hypothesis of Alzheimer's Disease: Myth or Reality?" *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (10):1631–46. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1761.

162. Mancuso, Michelangelo, Gabriele Siciliano, Massimiliano Filosto, and Luigi Murri. 2006. "Mitochondrial Dysfunction and Alzheimer's Disease: New Developments." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 9 (2):111–17. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16873958.

163. Manczak, Maria, Thimmappa S. Anekonda, Edward Henson, Byung S. Park, Joseph Quinn, and P. Hemachandra Reddy. 2006. "Mitochondria Are a Direct Site of Aβ Accumulation in Alzheimer's Disease Neurons: Implications for Free Radical Generation

and Oxidative Damage in Disease Progression." *Human Molecular Genetics* 15 (9):1437–49. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl066.

164. Marres, C A, S de Vries, and L A Grivell. 1991. "Isolation and Inactivation of the Nuclear Gene Encoding the Rotenone-Insensitive Internal NADH: Ubiquinone Oxidoreductase of Mitochondria from Saccharomyces Cerevisiae." *European Journal of Biochemistry* 195 (3):857–62. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1900238.

165. Mastrogiacomo, F, C Bergeron, and S J Kish. 1993. "Brain Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Activity in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 61 (6):2007–14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245957.

166. Mathiesen, Cecilie, and Cecilia Hägerhäll. 2002. "Transmembrane Topology of the NuoL, M and N Subunits of NADH:quinone Oxidoreductase and Their Homologues among Membrane-Bound Hydrogenases and Bona Fide Antiporters." *Biochimica et Biophysica Acta* 1556 (2–3):121–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460669.

167. Matsuzaki, Kentaro, Kenichi Kenichi Miyazaki, Seiichiro Sakai, Hiromu Yawo, Norihito Nakata, Shigeki Moriguchi, Kohji Fukunaga, et al. 2008. "Nobiletin, a Citrus Flavonoid with Neurotrophic Action, Augments Protein Kinase A-Mediated Phosphorylation of the AMPA Receptor Subunit, GluR1, and the Postsynaptic Receptor Response to Glutamate in Murine Hippocampus." *European Journal of Pharmacology* 578 (2–3):194–200. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.09.028.

168. Mattiasson, Gustav, Mehrdad Shamloo, Gunilla Gido, Kavitha Mathi, Gregor Tomasevic, Saili Yi, Craig H. Warden, et al. 2003. "Uncoupling Protein-2 Prevents Neuronal Death and Diminishes Brain Dysfunction after Stroke and Brain Trauma." *Nature Medicine* 9 (8):1062–68. https://doi.org/10.1038/nm903.

169. Mattson, Mark P. 2012. "Energy Intake and Exercise as Determinants of Brain Health and Vulnerability to Injury and Disease." *Cell Metabolism* 16 (6):706–22. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.08.012.

170. Mattson, Mark P. 2015. "Lifelong Brain Health Is a Lifelong Challenge: From Evolutionary Principles to Empirical Evidence." *Ageing Research Reviews* 20 (March):37–45. https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.12.011.

171. Mazzio, Elizabeth A, Fran Close, and Karam F A Soliman. 2011. "The Biochemical and

Cellular Basis for Nutraceutical Strategies to Attenuate Neurodegeneration in Parkinson's Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 12 (1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI):506–69. https://doi.org/10.3390/ijms12010506.

172. McCammon, M. T., Charles B Epstein, Beata Przybyla-Zawislak, Lee McAlister-Henn, and Ronald A Butow. 2003. "Global Transcription Analysis of Krebs Tricarboxylic Acid Cycle Mutants Reveals an Alternating Pattern of Gene Expression and Effects on Hypoxic and Oxidative Genes." *Molecular Biology of the Cell* 14 (3):958–72. https://doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0422.

173. Mecocci, Patrizia, Usha MacGarvey, and M. Flint Beal. 1994. "Oxidative Damage to Mitochondrial DNA Is Increased in Alzheimer's Disease." *Annals of Neurology* 36 (5):747–51. https://doi.org/10.1002/ana.410360510.

174. Middleton, E, C Kandaswami, and T C Theoharides. 2000. "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer." *Pharmacological Reviews* 52 (4):673–751. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121513.

175. Middleton, Elliott, and Chithan Kandaswami. 1994. "The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer." In *The Flavonoids*, 619–52. Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2911-2_15.

176. Migliore, L., I. Fontana, R. Colognato, F. Coppede, G. Siciliano, and L. Murri. 2005. "Searching for the Role and the Most Suitable Biomarkers of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease and in Other Neurodegenerative Diseases." *Neurobiology of Aging* 26 (5):587–95. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.10.002.

177. Mimaki, Masakazu, Xiaonan Wang, Matthew McKenzie, David R. Thorburn, and Michael T. Ryan. 2012. "Understanding Mitochondrial Complex I Assembly in Health and Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817 (6):851–62. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2011.08.010.

178. Minard, K I, G T Jennings, T M Loftus, D Xuan, and L McAlister-Henn. 1998. "Sources of NADPH and Expression of Mammalian NADP+-Specific Isocitrate Dehydrogenases in Saccharomyces Cerevisiae." *The Journal of Biological Chemistry* 273

(47). American Society for Biochemistry and Molecular Biology:31486–93. https://doi.org/10.1074/JBC.273.47.31486.

179. Minners, J, E J van den Bos, D M Yellon, H Schwalb, L H Opie, and M N Sack. 2000. "Dinitrophenol, Cyclosporin A, and Trimetazidine Modulate Preconditioning in the Isolated Rat Heart: Support for a Mitochondrial Role in Cardioprotection." *Cardiovascular Research* 47 (1):68–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869531.

180. Mistur, Rachel, Lisa Mosconi, Susan De Santi, Marla Guzman, Yi Li, Wai Tsui, and Mony J de Leon. 2009. "Current Challenges for the Early Detection of Alzheimer's Disease: Brain Imaging and CSF Studies." *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)* 5 (4). Korean Neurological Association:153–66. https://doi.org/10.3988/jcn.2009.5.4.153.

181. Miyata, Yoshiki, Takashi Sato, Masamichi Yano, and Akira Ito. 2004. "Activation of Protein Kinase C BII/E-c-Jun NH 2 -Terminal Kinase Pathway and Inhibition of Mitogen-Activated Protein/extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Phosphorylation in Antitumor Invasive Activity Induced by the Polymethoxy Flavonoid, Nobiletin." *Molecular Cancer Therapeutics* 3 (7):839–47. http://mct.aacrjournals.org/content/molcanther/3/7/839.full.pdf.

182. Mizuno, Y, K Suzuki, and N Sone. 1990. "Inhibition of ATP Synthesis by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium Ion (MPP+) in Mouse Brain in Vitro and in Vivo." *Advances in Neurology* 53:197–200. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122644.

183. Moller, Ian M., Allan G. Rasmusson, and Kenneth M. Fredlund. 1993. "NAD(P)H-Ubiquinone Oxidoreductases in Plant Mitochondria." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 25 (4). Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers:377–84. https://doi.org/10.1007/BF00762463.

184. Montine, Thomas J, M Diana Neely, Joseph F Quinn, M Flint Beal, William R Markesbery, L Jackson Roberts, and Jason D Morrow. 2002. "Lipid Peroxidation in Aging Brain and Alzheimer's Disease." *Free Radical Biology & Medicine* 33 (5):620–26. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208348.

185. Moon, Hyo Eun, and Sun Ha Paek. 2015. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Experimental Neurobiology* 24 (2). Korean Society for Brain and Neural Science:103–16. https://doi.org/10.5607/en.2015.24.2.103.

186. Moreira, Paula I., Xiongwei Zhu, Xinglong Wang, Hyoung-gon Lee, Akihiko Nunomura, Robert B. Petersen, George Perry, and Mark A. Smith. 2010. "Mitochondria: A Therapeutic Target in Neurodegeneration." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (1):212–20. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.007.

187. Moreira, Paula I, Kazuhiro Honda, Quan Liu, Maria S Santos, Catarina R Oliveira, Gjumrakch Aliev, Akihiko Nunomura, Xiongwei Zhu, Mark A Smith, and George Perry. 2005. "Oxidative Stress: The Old Enemy in Alzheimer's Disease Pathophysiology." *Current Alzheimer Research* 2 (4):403–8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16248845.

188. Moreira, Paula I, Xiongwei Zhu, Quan Liu, Kazuhiro Honda, Sandra L Siedlak, Peggy L Harris, Mark A Smith, and George Perry. 2006. "Compensatory Responses Induced by Oxidative Stress in Alzheimer Disease." *Biological Research* 39 (1):7–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16629160.

189. Morgan, David J., and Leonid A. Sazanov. 2008. "Three-Dimensional Structure of Respiratory Complex I from Escherichia Coli in Ice in the Presence of Nucleotides." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777 (7–8). Elsevier:711–18. https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2008.03.023.

190. Mutisya, E M, A C Bowling, and M F Beal. 1994. "Cortical Cytochrome Oxidase Activity Is Reduced in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 63 (6):2179–84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7964738.

191. Nagase, Hiroyuki, Tohru Yamakuni, Kentaro Matsuzaki, Yuji Maruyama, Jiro Kasahara, Yoshimi Hinohara, Shunzo Kondo, et al. 2005. "Mechanism of Neurotrophic Action of Nobiletin in PC12D Cells." *Biochemistry* 44 (42):13683–91. https://doi.org/10.1021/bi050643x.

192. Nakajima, A., T. Yamakuni, K. Matsuzaki, N. Nakata, H. Onozuka, A. Yokosuka, Y. Sashida, Y. Mimaki, and Y. Ohizumi. 2007. "Nobiletin, a Citrus Flavonoid, Reverses Learning Impairment Associated with N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonism by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321 (2):784–90. https://doi.org/10.1124/jpet.106.117010.

193. Nakajima, Akira, Yasushi Ohizumi, and Kiyofumi Yamada. 2014. "Anti-Dementia

Activity of Nobiletin, a Citrus Flavonoid: A Review of Animal Studies." *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience : The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology* 12 (2). Korean College of Neuropsychopharmacology:75–82. https://doi.org/10.9758/cpn.2014.12.2.75.

194. Napolitano, A, P Manini, and M d'Ischia. 2011. "Oxidation Chemistry of Catecholamines and Neuronal Degeneration: An Update." *Current Medicinal Chemistry* 18 (12):1832–45. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466469.

195. Niatsetskaya, Z. V., S. A. Sosunov, D. Matsiukevich, I. V. Utkina-Sosunova, V. I. Ratner, A. A. Starkov, and V. S. Ten. 2012. "The Oxygen Free Radicals Originating from Mitochondrial Complex I Contribute to Oxidative Brain Injury Following Hypoxia-Ischemia in Neonatal Mice." *Journal of Neuroscience* 32 (9):3235–44. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6303-11.2012.

196. Norbeck, J, A K Pâhlman, N Akhtar, A Blomberg, and L Adler. 1996. "Purification and Characterization of Two Isoenzymes of DL-Glycerol-3-Phosphatase from Saccharomyces Cerevisiae. Identification of the Corresponding GPP1 and GPP2 Genes and Evidence for Osmotic Regulation of Gpp2p Expression by the Osmosensing Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (23):13875–81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662716.

197. Nosek, J, and H Fukuhara. 1994. "NADH Dehydrogenase Subunit Genes in the Mitochondrial DNA of Yeasts." *Journal of Bacteriology* 176 (18):5622–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521869.

198. Nunomura, A, G Perry, K Hirai, G Aliev, A Takeda, S Chiba, and M A Smith. 1999. "Neuronal RNA Oxidation in Alzheimer's Disease and Down's Syndrome." *Annals of the New York Academy of Sciences* 893:362–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10672267.

199. Nunomura, Akihiko, Rudy J. Castellani, Xiongwei Zhu, Paula I. Moreira, George Perry, and Mark A. Smith. 2006. "Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65 (7):631–41. https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf.

200. Nunomura, Akihiko, Toshio Tamaoki, Koich Tanaka, Nobutaka Motohashi, Masao

Nakamura, Takaaki Hayashi, Haruyasu Yamaguchi, et al. 2010. “Intraneuronal Amyloid β Accumulation and Oxidative Damage to Nucleic Acids in Alzheimer Disease.” *Neurobiology of Disease* 37 (3):731–37. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.12.012.

201. Ohnishi, Tomoko, Vladimir D. Sled, Takahiro Yano, Takao Yagi, Dosymzhan S. Burbaev, and Andrei D. Vinogradov. 1998. “Structure-Function Studies of Iron-Sulfur Clusters and Semiquinones in the NADH-Q Oxidoreductase Segment of the Respiratory Chain.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1365 (1–2). Elsevier:301–8. https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00082-6.

202. Ojaimi, J, C L Masters, C McLean, K Opeskin, P McKelvie, and E Byrne. 1999. “Irregular Distribution of Cytochrome c Oxidase Protein Subunits in Aging and Alzheimer’s Disease.” *Annals of Neurology* 46 (4):656–60. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10514105.

203. Okun, J G, P Lümmen, and U Brandt. 1999. “Three Classes of Inhibitors Share a Common Binding Domain in Mitochondrial Complex I (NADH:ubiquinone Oxidoreductase).” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (5):2625–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9915790.

204. Onozuka, H., A. Nakajima, K. Matsuzaki, R.-W. Shin, K. Ogino, D. Saigusa, N. Tetsu, et al. 2008. “Nobiletin, a Citrus Flavonoid, Improves Memory Impairment and A Pathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 326 (3):739–44. https://doi.org/10.1124/jpet.108.140293.

205. Orme-Johnson, W.H., and N.R. Orme-Johnson. 1978. “[28] Overview of Iron-Sulfur Proteins.” *Methods in Enzymology* 53 (January). Academic Press:259–68. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)53031-0.

206. Overkamp, K M, B M Bakker, P Kötter, A van Tuijl, S de Vries, J P van Dijken, and J T Pronk. 2000. “In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by Saccharomyces Cerevisiae Mitochondria.” *Journal of Bacteriology* 182 (10). American Society for Microbiology (ASM):2823–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781551.

207. Padurariu, Manuela, Alin Ciobica, Lucian Hritcu, Bogdan Stoica, Walther Bild, and

Cristinel Stefanescu. 2010. “Changes of Some Oxidative Stress Markers in the Serum of Patients with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer’s Disease.” *Neuroscience Letters* 469 (1):6–10. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.11.033.

208. Pandya, Jignesh D., James R. Pauly, Vidya N. Nukala, Andrea H. Sebastian, Kristen M. Day, Amit S. Korde, William F. Maragos, Edward D. Hall, and Patrick G. Sullivan. 2007. “Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome Following Traumatic Brain Injury in Rodents.” *Journal of Neurotrauma* 24 (5):798–811. https://doi.org/10.1089/neu.2006.3673.

209. Pandya, Jignesh D., James R. Pauly, and Patrick G. Sullivan. 2009. “The Optimal Dosage and Window of Opportunity to Maintain Mitochondrial Homeostasis Following Traumatic Brain Injury Using the Uncoupler FCCP.” *Experimental Neurology* 218 (2):381–89. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.05.023.

210. Parker, W D. 1991. “Cytochrome Oxidase Deficiency in Alzheimer’s Disease.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 640:59–64. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1663716.

211. Parker, W D, C M Filley, and J K Parks. 1990. “Cytochrome Oxidase Deficiency in Alzheimer’s Disease.” *Neurology* 40 (8):1302–3. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2166249.

212. Parker, W D, N J Mahr, C M Filley, J K Parks, D Hughes, D A Young, and C M Cullum. 1994. “Reduced Platelet Cytochrome c Oxidase Activity in Alzheimer’s Disease.” *Neurology* 44 (6):1086–90. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8208406.

213. Perry, R. J., D. Zhang, X.-M. Zhang, J. L. Boyer, and G. I. Shulman. 2015. “Controlled-Release Mitochondrial Protonophore Reverses Diabetes and Steatohepatitis in Rats.” *Science* 347 (6227):1253–56. https://doi.org/10.1126/science.aaa0672.

214. Petrik, M., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1983. “An Expanded Concept for the Glucose Effect in the Yeast Saccharomyces Uvarum: Involvement of Short- and Long-Term Regulation.” *Microbiology* 129 (1). Microbiology Society:43–49. https://doi.org/10.1099/00221287-129-1-43.

215. Phillips, Darci, Angel M Aponte, Stephanie A French, David J Chess, and Robert S Balaban. 2009. “Succinyl-CoA Synthetase Is a Phosphate Target for the Activation of

Mitochondrial Metabolism." *Biochemistry* 48 (30). NIH Public Access:7140–49. https://doi.org/10.1021/bi900725c.

216. Ploughman, Michelle, Zachary Attwood, Nicole White, Jules J. E. Doré, and Dale Corbett. 2007. "Endurance Exercise Facilitates Relearning of Forelimb Motor Skill after Focal Ischemia." *European Journal of Neuroscience* 25 (11):3453–60. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05591.x.

217. Pollastri, Susanna, and Massimiliano Tattini. 2011. "Flavonols: Old Compounds for Old Roles." *Annals of Botany* 108 (7):1225–33. https://doi.org/10.1093/aob/mcr234.

218. Porpaczy, Z, B Sumegi, and I Alkonyi. 1987. "Interaction between NAD-Dependent Isocitrate Dehydrogenase, Alpha-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex, and NADH:ubiquinone Oxidoreductase." *The Journal of Biological Chemistry* 262 (20):9509–14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110160.

219. Praticò, D, K Uryu, S Leight, J Q Trojanoswki, and V M Lee. 2001. "Increased Lipid Peroxidation Precedes Amyloid Plaque Formation in an Animal Model of Alzheimer Amyloidosis." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (12):4183–87. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404403.

220. Pronk, J T, H Yde Steensma, and J P Van Dijken. 1996. "Pyruvate Metabolism in Saccharomyces Cerevisiae." *Yeast (Chichester, England)* 12 (16):1607–33. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199612)12:16<1607::AID-YEA70>3.0.CO;2-4.

221. Przedborski, Serge, Kim Tieu, Celine Perier, and Miquel Vila. 2004. "MPTP as a Mitochondrial Neurotoxic Model of Parkinson's Disease." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36 (4):375–79. https://doi.org/10.1023/B:JOBB.0000041771.66775.d5.

222. Querfurth, Henry W., and Frank M. LaFerla. 2010. "Alzheimer's Disease." *New England Journal of Medicine* 362 (4):329–44. https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142.

223. Ramsay, R R, J I Salach, J Dadgar, and T P Singer. 1986. "Inhibition of Mitochondrial NADH Dehydrogenase by Pyridine Derivatives and Its Possible Relation to Experimental and Idiopathic Parkinsonism." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135 (1):269–75. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3485428.

224. Rappold, Phillip M., and Kim Tieu. 2010. "Astrocytes and Therapeutics for

Parkinson's Disease." *Neurotherapeutics* 7 (4):413–23. https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.001.

225. RECCHIA, A., Patrizia Debetto, Alessandro Negro, Diego Guidolin, Stephen D Skaper, and Pietro Giusti. 2004. "-Synuclein and Parkinson's Disease." *The FASEB Journal* 18 (6):617–26. https://doi.org/10.1096/fj.03-0338rev.

226. Reddy, P. Hemachandra. 2006. "Amyloid Precursor Protein-Mediated Free Radicals and Oxidative Damage: Implications for the Development and Progression of Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 96 (1):1–13. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03530.x.

227. ———. 2007. "Mitochondrial Dysfunction in Aging and Alzheimer's Disease: Strategies to Protect Neurons." *Antioxidants & Redox Signaling* 9 (10):1647–58. https://doi.org/10.1089/ars.2007.1754.

228. Reddy, P. Hemachandra, Shannon McWeeney, Byung S. Park, Maria Manczak, Ramana V. Gutala, Dara Partovi, Youngsin Jung, et al. 2004. "Gene Expression Profiles of Transcripts in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice: Up-Regulation of Mitochondrial Metabolism and Apoptotic Genes Is an Early Cellular Change in Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics* 13 (12):1225–40. https://doi.org/10.1093/hmg/ddh140.

229. Ren, Wenying, Zhenhua Qiao, Hongwei Wang, Lei Zhu, and Li Zhang. 2003. "Flavonoids: Promising Anticancer Agents." *Medicinal Research Reviews* 23 (4):519–34. https://doi.org/10.1002/med.10033.

230. Rigoulet, Michel, Hugo Aguilaniu, Nicole Avéret, Odile Bunoust, Nadine Camougrand, Xavier Grandier-Vazeille, Christer Larsson, Inga-Lill Pahlman, Stephen Manon, and Lena Gustafsson. 2004. "Organization and Regulation of the Cytosolic NADH Metabolism in the Yeast Saccharomyces Cerevisiae." *Molecular and Cellular Biochemistry* 256–257 (1–2):73–81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977171.

231. Rim, Jong S., and Leslie P. Kozak. 2002. "Regulatory Motifs for CREB-Binding Protein and Nfe2l2 Transcription Factors in the Upstream Enhancer of the Mitochondrial Uncoupling Protein 1 Gene." *Journal of Biological Chemistry* 277 (37):34589–600. https://doi.org/10.1074/jbc.M108866200.

232. Rodrigues, F., M. Corte-Real, C. Leao, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk. 2001. "Oxygen Requirements of the Food Spoilage Yeast Zygosaccharomyces Bailii in Synthetic and Complex Media." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (5):2123–28. https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2123-2128.2001.

233. Rosen, Henry, Robert M Rakita, Ann M Waltersdorph, and Seymour J Klebanoff. 1987. "THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Myeloperoxidase-Mediated Damage to the Succinate Oxidase System of Escherichia Coli EVIDENCE FOR SELECTIVE INACTIVATION OF T H E DEHYDROGENASE COMPONENT*" 242 (31):15004–10. http://www.jbc.org/content/262/31/15004.full.pdf.

234. Ross, Julie A., and Christine M. Kasum. 2002. "D IETARY F LAVONOIDS : Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety." *Annual Review of Nutrition* 22 (1):19–34. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957.

235. Rustin, P, T Bourgeron, B Parfait, D Chretien, A Munnich, and A Rötig. 1997. "Inborn Errors of the Krebs Cycle: A Group of Unusual Mitochondrial Diseases in Human." *Biochimica et Biophysica Acta* 1361 (2):185–97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9300800.

236. Saraste, M. 1999. "Oxidative Phosphorylation at the Fin de Siècle." *Science (New York, N.Y.)* 283 (5407):1488–93. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066163.

237. Sazanov, L.A., and J.B. Jackson. 1994. "Proton-Translocating Transhydrogenase and NAD- and NADP-Linked Isocitrate Dehydrogenases Operate in a Substrate Cycle Which Contributes to Fine Regulation of the Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Mitochondria." *FEBS Letters* 344 (2–3). No longer published by Elsevier:109–16. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00370-X.

238. Sazanov, L A, S Y Peak-Chew, I M Fearnley, and J E Walker. 2000. "Resolution of the Membrane Domain of Bovine Complex I into Subcomplexes: Implications for the Structural Organization of the Enzyme." *Biochemistry* 39 (24):7229–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10852722.

239. Sazanov, Leonid A, and John E Walker. 2000. "Cryo-Electron Crystallography of Two Sub-Complexes of Bovine Complex I Reveals the Relationship between the Membrane and Peripheral Arms 1 1Edited by W. Baumeister." *Journal of Molecular Biology* 302

(2):455–64. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4079.

240. Schagger, H., and K Pfeiffer. 2000. “Supercomplexes in the Respiratory Chains of Yeast and Mammalian Mitochondria.” *The EMBO Journal* 19 (8):1777–83. https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777.

241. Schapira, A H, J M Cooper, D Dexter, P Jenner, J B Clark, and C D Marsden. 1989. “Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson’s Disease.” *Lancet (London, England)* 1 (8649):1269. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2566813.

242. Scheffler. 1999. *I.E. Mitochondria*. *New York: Wiley-Liss*.

243. Schultz, Brian E., and Sunney I. Chan. 2001. “Structures and Proton-Pumping Strategies of Mitochondrial Respiratory Enzymes.” *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 30 (1):23–65. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.30.1.23.

244. Shao, Wei, Shu-zhen Zhang, Mi Tang, Xin-hua Zhang, Zheng Zhou, Yan-qing Yin, Qin-bo Zhou, et al. 2012. “Suppression of Neuroinflammation by Astrocytic Dopamine D2 Receptors via αB-Crystallin.” *Nature* 494 (7435):90–94. https://doi.org/10.1038/nature11748.

245. Sharikadze N., Jojua N., Sepashvili M., Zhuravliova E., and David G Mikeladze. 2016. “Mitochondrial Target of Nobiletin’s Action.” *Natural Product Communications* 11 (12):1833 – 1838.

246. Shi, Ming-Der, Yi-Chen Liao, Yuan-Wei Shih, and Li-Yu Tsai. 2013. “Nobiletin Attenuates Metastasis via Both ERK and PI3K/Akt Pathways in HGF-Treated Liver Cancer HepG2 Cells.” *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 20 (8–9):743–52. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.004.

247. Shulman, Robert G, Douglas L Rothman, Kevin L Behar, and Fahmeed Hyder. 2004. “Energetic Basis of Brain Activity: Implications for Neuroimaging.” *Trends in Neurosciences* 27 (8):489–95. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.005.

248. Sibson, Nicola R., Jun Shen, Graeme F. Mason, Douglas L. Rothman, Kevin L. Behar, and Robert G. Shulman. 1998. “Functional Energy Metabolism:In Vivo ¹³C-NMR Spectroscopy Evidence for Coupling of Cerebral Glucose Consumption and Gl Utamatergic Neuronal Activity.” *Developmental Neuroscience* 20 (4–5). Karger Publishers:321–30. https://doi.org/10.1159/000017327.

249. Simonian, N A, and B T Hyman. 1994. “Functional Alterations in Alzheimer’s Disease: Selective Loss of Mitochondrial-Encoded Cytochrome Oxidase mRNA in the Hippocampal Formation.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 53 (5):508–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083692.

250. Sims, Neil R, and Michelle F Anderson. 2008. “Isolation of Mitochondria from Rat Brain Using Percoll Density Gradient Centrifugation.” *Nature Protocols* 3 (7):1228–39. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.105.

251. Small, W C, and L McAlister-Henn. 1998. “Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of Saccharomyces Cerevisiae.” *Journal of Bacteriology* 180 (16). American Society for Microbiology (ASM):4051–55. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696750.

252. Smith, Mark A., Xiongwei Zhu, Massimo Tabaton, Gang Liu, Daniel W. McKeel, Mark L. Cohen, Xinglong Wang, et al. 2010. “Increased Iron and Free Radical Generation in Preclinical Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment.” Edited by Mark A. Lovell. *Journal of Alzheimer’s Disease* 19 (1):363–72. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1239.

253. Sohal, Rajindar S, Dikran Toroser, Catherine Brégère, Robin J Mockett, and William C Orr. 2008. “Age-Related Decrease in Expression of Mitochondrial DNA Encoded Subunits of Cytochrome c Oxidase in Drosophila Melanogaster.” *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (9). NIH Public Access:558–61. https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.04.006.

254. Spillantini, Maria Grazia, Marie Luise Schmidt, Virginia M.-Y. Lee, John Q. Trojanowski, Ross Jakes, and Michel Goedert. 1997. “α-Synuclein in Lewy Bodies.” *Nature* 388 (6645):839–40. https://doi.org/10.1038/42166.

255. Starkov, A. A., Gary Fiskum, Christos Chinopoulos, Beverly J Lorenzo, Susan E Browne, Mulchand S Patel, and M Flint Beal. 2004. “Mitochondrial -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species.” *Journal of Neuroscience* 24 (36):7779–88. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004.

256. Starkov, Anatoly A. 2013. “An Update on the Role of Mitochondrial α-Ketoglutarate Dehydrogenase in Oxidative Stress.” *Molecular and Cellular Neurosciences* 55 (July). NIH

Public Access:13–16. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.005.

257. Sullivan, Patrick G., Nancy A. Rippy, Kristina Dorenbos, Rachele C. Concepcion, Aakash K. Agarwal, and Jong M. Rho. 2004. "The Ketogenic Diet Increases Mitochondrial Uncoupling Protein Levels and Activity." *Annals of Neurology* 55 (4):576–80. https://doi.org/10.1002/ana.20062.

258. Sultana, Rukhsana, and D. Allan Butterfield. 2009. "Oxidatively Modified, Mitochondria-Relevant Brain Proteins in Subjects with Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41 (5):441–46. https://doi.org/10.1007/s10863-009-9241-7.

259. Sultana, Rukhsana, Marzia Perluigi, and D. Allan Butterfield. 2009. "Oxidatively Modified Proteins in Alzheimer's Disease (AD), Mild Cognitive Impairment and Animal Models of AD: Role of Abeta in Pathogenesis." *Acta Neuropathologica* 118 (1):131–50. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0517-0.

260. Sun, Fei, Xia Huo, Yujia Zhai, Aojin Wang, Jianxing Xu, Dan Su, Mark Bartlam, and Zihe Rao. 2005. "Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II." *Cell* 121 (7):1043–57. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.025.

261. Sun, Yinshi, Jianhua Wang, Shubo Gu, Zhengbo Liu, Yujie Zhang, and Xiaoxia Zhang. 2010. "Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of Citrus Reticulata 'Chachi' Fruit by High Performance Liquid Chromatography—Photodiode Array Detection." *Molecules* 15 (8):5378–88. https://doi.org/10.3390/molecules15085378.

262. Suzuki, K, Y Mizuno, and M Yoshida. 1990. "Effects of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP)-like Compounds on Mitochondrial Respiration." *Advances in Neurology* 53:215–18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122645.

263. Swerdlow, R H, J K Parks, D S Cassarino, D J Maguire, R S Maguire, J P Bennett, R E Davis, and W D Parker. 1997. "Cybrids in Alzheimer's Disease: A Cellular Model of the Disease?" *Neurology* 49 (4):918–25. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9339668.

264. Tapia-Rojas, Cheril, Florencia Aranguiz, Lorena Varela-Nallar, and Nibaldo C. Inestrosa. 2016. "Voluntary Running Attenuates Memory Loss, Decreases Neuropathological Changes and Induces Neurogenesis in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Brain Pathology* 26 (1):62–74. https://doi.org/10.1111/bpa.12255.

265. Tieu, K. 2011. “A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson’s Disease.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1):a009316–a009316. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009316.

266. Tretter, L., and Vera Adam-Vizi. 2004. “Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by -Ketoglutarate Dehydrogenase.” *Journal of Neuroscience* 24 (36):7771–78. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1842-04.2004.

267. Trifunovic, A., A. Hansson, A. Wredenberg, A. T. Rovio, E. Dufour, I. Khvorostov, J. N. Spelbrink, R. Wibom, H. T. Jacobs, and N.-G. Larsson. 2005. “Somatic mtDNA Mutations Cause Aging Phenotypes without Affecting Reactive Oxygen Species Production.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (50):17993–98. https://doi.org/10.1073/pnas.0508886102.

268. Trifunovic, Aleksandra, Anna Wredenberg, Maria Falkenberg, Johannes N. Spelbrink, Anja T. Rovio, Carl E. Bruder, Mohammad Bohlooly-Y, et al. 2004. “Premature Ageing in Mice Expressing Defective Mitochondrial DNA Polymerase.” *Nature* 429 (6990):417–23. https://doi.org/10.1038/nature02517.

269. Trimmer, Patricia A, Paula M Keeney, M Kate Borland, Frederic A Simon, Jatanna Almeida, Russell H Swerdlow, Janice P Parks, W Davis Parker, and James P Bennett. 2004. “Mitochondrial Abnormalities in Cybrid Cell Models of Sporadic Alzheimer’s Disease Worsen with Passage in Culture.” *Neurobiology of Disease* 15 (1):29–39. https://doi.org/10.1016/J.NBD.2003.09.011.

270. Urk, H Van, P M Bruinenberg, M Veenhuis, W A Scheffers, and J P Van Dijken. 1989. “Respiratory Capacities of Mitochondria of Saccharomyces Cerevisiae CBS 8066 and Candida Utilis CBS 621 Grown under Glucose Limitation.” *Antonie van Leeuwenhoek* 56 (3):211–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2686549.

271. Valla, J, J D Berndt, and F Gonzalez-Lima. 2001. “Energy Hypometabolism in Posterior Cingulate Cortex of Alzheimer’s Patients: Superficial Laminar Cytochrome Oxidase Associated with Disease Duration.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 21 (13):4923–30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425920.

272. Valla, Jon, Lonnie Schneider, Tracy Niedzielko, Keith D. Coon, Richard Caselli,

Marwan N. Sabbagh, Geoffrey L. Ahern, et al. 2006. “Impaired Platelet Mitochondrial Activity in Alzheimer’s Disease and Mild Cognitive Impairment.” *Mitochondrion* 6 (6):323–30. https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.10.004.

273. Valsecchi, Federica, Lavoisier S. Ramos-Espiritu, Jochen Buck, Lonny R. Levin, and Giovanni Manfredi. 2013. “cAMP and Mitochondria.” *Physiology* 28 (3):199–209. https://doi.org/10.1152/physiol.00004.2013.

274. Vanlerberghe, Greg C., and Lee McIntosh. 1997. “ALTERNATIVE OXIDASE: From Gene to Function.” *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48 (1):703–34. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.703.

275. Vaynman, S., Z. Ying, A. Wu, and F. Gomez-Pinilla. 2006. “Coupling Energy Metabolism with a Mechanism to Support Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Synaptic Plasticity.” *Neuroscience* 139 (4):1221–34. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.01.062.

276. Verduyn, C. 1991. “Physiology of Yeasts in Relation to Biomass Yields.” *Antonie van Leeuwenhoek* 60 (3–4):325–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1807201.

277. Verduyn, C., E. Postma, W. A. Scheffers, and J. P. van Dijken. 1990. “Physiology of Saccharomyces Cerevisiae in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Culturesx.” *Journal of General Microbiology* 136 (3):395–403. https://doi.org/10.1099/00221287-136-3-395.

278. Verduyn, Cornelis, Erik Postma, W. Alexander Scheffers, and Johannes P. Van Dijken. 1992. “Effect of Benzoic Acid on Metabolic Fluxes in Yeasts: A Continuous-Culture Study on the Regulation of Respiration and Alcoholic Fermentation.” *Yeast* 8 (7):501–17. https://doi.org/10.1002/yea.320080703.

279. Vincent, Andrea M, James A Olzmann, Michael Brownlee, W I Sivitz, and James W Russell. 2004. “Uncoupling Proteins Prevent Glucose-Induced Neuronal Oxidative Stress and Programmed Cell Death.” *Diabetes* 53 (3):726–34. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988258.

280. Visser, W., A. A. van der Baan, W. Batenburg-van der Vegte, W. A. Scheffers, R. Kramer, and J. P. v. Dijken. 1994. “Involvement of Mitochondria in the Assimilatory Metabolism of Anaerobic Saccharomyces Cerevisiae Cultures.” *Microbiology* 140 (11):3039–46. https://doi.org/10.1099/13500872-140-11-3039.

281. Visser, W, W A Scheffers, W H Batenburg-van der Vegte, and J P van Dijken. 1990. "Oxygen Requirements of Yeasts." *Applied and Environmental Microbiology* 56 (12). American Society for Microbiology (ASM):3785–92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2082825.

282. Votyakova, Tatyana V., and Ian J. Reynolds. 2001. "ΔΨm-Dependent and -Independent Production of Reactive Oxygen Species by Rat Brain Mitochondria." *Journal of Neurochemistry* 79 (2). Blackwell Science Ltd:266–77. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00548.x.

283. Vries, Simon de, and Carla A.M. Marres. 1987. "The Mitochondrial Respiratory Chain of Yeast. Structure and Biosynthesis and the Role in Cellular Metabolism." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 895 (3). Elsevier:205–39. https://doi.org/10.1016/S0304-4173(87)80003-4.

284. VRIES, Simon, and Leslie A. GRIVELL. 1988. "Purification and Characterization of a Rotenone-Insensitive NADH: Q6 Oxidoreductase from Mitochondria of Saccharomyces Cerevisiae." *European Journal of Biochemistry* 176 (2). Blackwell Publishing Ltd:377–84. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14292.x.

285. W. Heller and G. Forkmann. 1993. "Biosynthesis of Flavonoids." *In: J. B. Harborne, Ed., The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, Chapman and Hall, London*, 499–535.

286. Wallace, Douglas C, and Weiwei Fan. 2009. "The Pathophysiology of Mitochondrial Disease as Modeled in the Mouse." *Genes & Development* 23 (15). Cold Spring Harbor Laboratory Press:1714–36. https://doi.org/10.1101/gad.1784909.

287. WALLE, T. 2007. "Methoxylated Flavones, a Superior Cancer Chemopreventive Flavonoid Subclass?" *Seminars in Cancer Biology* 17 (5):354–62. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.05.002.

288. Wang, J., S. Xiong, C. Xie, W. R. Markesbery, and M. A. Lovell. 2005. "Increased Oxidative Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 93 (4):953–62. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03053.x.

289. Wang, Qinqin, Yingjun Liu, and Jiawei Zhou. 2015. "Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Its Potential as Therapeutic Target." *Translational*

Neurodegeneration 4 (1):19. https://doi.org/10.1186/s40035-015-0042-0.

290. Wang, X., B. Su, S. L. Siedlak, P. I. Moreira, H. Fujioka, Y. Wang, G. Casadesus, and X. Zhu. 2008. "Amyloid- Overproduction Causes Abnormal Mitochondrial Dynamics via Differential Modulation of Mitochondrial Fission/fusion Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (49):19318–23. https://doi.org/10.1073/pnas.0804871105.

291. Weisová, Petronela, Ujval Anilkumar, Caitriona Ryan, Caoimhín G Concannon, Jochen H M Prehn, and Manus W Ward. 2012. "'Mild Mitochondrial Uncoupling' Induced Protection against Neuronal Excitotoxicity Requires AMPK Activity." *Biochimica et Biophysica Acta* 1817 (5):744–53. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.01.016.

292. Wet, J R de, K V Wood, D R Helinski, and M DeLuca. 1985. "Cloning of Firefly Luciferase cDNA and the Expression of Active Luciferase in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (23):7870–73. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3906652.

293. Whitman, Stewart C., Elzbieta M. Kurowska, John A. Manthey, and Alan Daugherty. 2005. "Nobiletin, a Citrus Flavonoid Isolated from Tangerines, Selectively Inhibits Class A Scavenger Receptor-Mediated Metabolism of Acetylated LDL by Mouse Macrophages." *Atherosclerosis* 178 (1):25–32. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.034.

294. Więckowski, Mariusz R, and Lech Wojtczak. 1998. "Fatty Acid-Induced Uncoupling of Oxidative Phosphorylation Is Partly due to Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore." *FEBS Letters* 423 (3). No longer published by Elsevier:339–42. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00118-5.

295. Wijsman, M R, J P van Dijken, B H van Kleeff, and W A Scheffers. 1984. "Inhibition of Fermentation and Growth in Batch Cultures of the Yeast Brettanomyces Intermedius upon a Shift from Aerobic to Anaerobic Conditions (Custers Effect)." *Antonie van Leeuwenhoek* 50 (2):183–92. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6431904.

296. Winklhofer, Konstanze F., and Christian Haass. 2010. "Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (1). Elsevier:29–44. https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2009.08.013.

297. Wu, Jin-Ji, Yanji Cui, Yoon-Sil Yang, Sung-Cherl Jung, Jin Won Hyun, Young-Hee Maeng, Deok-Bae Park, Sun-Ryung Lee, Se-Jae Kim, and Su-Yong Eun. 2013. "Mild Mitochondrial Depolarization Is Involved in a Neuroprotective Mechanism of *Citrus Sunki* Peel Extract." *Phytotherapy Research* 27 (4):564–71. https://doi.org/10.1002/ptr.4745.

298. Wu, Yu-Qing, Cheng-Hua Zhou, Jin Tao, and Sheng-Nan Li. 2006. "Antagonistic Effects of Nobiletin, a Polymethoxyflavonoid, on Eosinophilic Airway Inflammation of Asthmatic Rats and Relevant Mechanisms." *Life Sciences* 78 (23):2689–96. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.029.

299. Wu, Zhidan, Pere Puigserver, Ulf Andersson, Chenyu Zhang, Guillaume Adelmant, Vamsi Mootha, Amy Troy, et al. 1999. "Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1." *Cell* 98 (1):115–24. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X.

300. Xu, R, Q Hu, Q Ma, C Liu, and G Wang. 2014. "The Protease Omi Regulates Mitochondrial Biogenesis through the GSK3β/PGC-1α Pathway." *Cell Death & Disease* 5 (8):e1373–e1373. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.328.

301. Yabuki, Y., Y. Ohizumi, A. Yokosuka, Y. Mimaki, and K. Fukunaga. 2014. "Nobiletin Treatment Improves Motor and Cognitive Deficits Seen in MPTP-Induced Parkinson Model Mice." *Neuroscience* 259 (February). Pergamon:126–41. https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2013.11.051.

302. Yaffe, Kristine, Tina D. Hoang, Amy L. Byers, Deborah E. Barnes, and Karl E. Friedl. 2014. "Lifestyle and Health-Related Risk Factors and Risk of Cognitive Aging among Older Veterans." *Alzheimer's & Dementia* 10 (3):S111–21. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.04.010.

303. Yamamoto, Yui, Norifumi Shioda, Feng Han, Shigeki Moriguchi, Akira Nakajima, Akihito Yokosuka, Yoshihiro Mimaki, et al. 2009. "Nobiletin Improves Brain Ischemia-Induced Learning and Memory Deficits through Stimulation of CaMKII and CREB Phosphorylation." *Brain Research* 1295 (October):218–29. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.081.

304. Yao, J., R. W. Irwin, L. Zhao, J. Nilsen, R. T. Hamilton, and R. D. Brinton. 2009.

"Mitochondrial Bioenergetic Deficit Precedes Alzheimer's Pathology in Female Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (34):14670–75. https://doi.org/10.1073/pnas.0903563106.

305. Yasuda, Toru, Yasuto Nakata, and Hideki Mochizuki. 2013. "α-Synuclein and Neuronal Cell Death." *Molecular Neurobiology* 47 (2):466–83. https://doi.org/10.1007/s12035-012-8327-0.

306. Yi, Li-Tao, He-Li Xu, Jing Feng, Xia Zhan, Li-Pan Zhou, and Cun-Cang Cui. 2011. "Involvement of Monoaminergic Systems in the Antidepressant-like Effect of Nobiletin." *Physiology & Behavior* 102 (1). Elsevier:1–6. https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2010.10.008.

307. Yip, Chui-ying, Michael E. Harbour, Kamburapola Jayawardena, Ian M. Fearnley, and Leonid A. Sazanov. 2011. "Evolution of Respiratory Complex I." *Journal of Biological Chemistry* 286 (7):5023–33. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.194993.

308. Yoon, Young-Sil, Dong-Sun Yoon, In Kyoung Lim, Soo-Han Yoon, Hae-Young Chung, Manuel Rojo, Florence Malka, Mei-Jie Jou, Jean-Claude Martinou, and Gyesoon Yoon. 2006. "Formation of Elongated Giant Mitochondria in DFO-Induced Cellular Senescence: Involvement of Enhanced Fusion Process through Modulation of Fis1." *Journal of Cellular Physiology* 209 (2):468–80. https://doi.org/10.1002/jcp.20753.

309. Yudkoff, M, D Nelson, Y Daikhin, and M Erecińska. 1994. "Tricarboxylic Acid Cycle in Rat Brain Synaptosomes. Fluxes and Interactions with Aspartate Aminotransferase and Malate/aspartate Shuttle." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (44):27414–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961653.

310. Yuede, Carla M., Scott D. Zimmerman, Hongxin Dong, Matthew J. Kling, Adam W. Bero, David M. Holtzman, Benjamin F. Timson, and John G. Csernansky. 2009. "Effects of Voluntary and Forced Exercise on Plaque Deposition, Hippocampal Volume, and Behavior in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Disease* 35 (3):426–32. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.06.002.

311. Zecca, Luigi, Moussa B. H. Youdim, Peter Riederer, James R. Connor, and Robert R. Crichton. 2004. "Iron, Brain Ageing and Neurodegenerative Disorders." *Nature Reviews Neuroscience* 5 (11):863–73. https://doi.org/10.1038/nrn1537.

312. Zhu, X., B. Su, X. Wang, M. A. Smith, and G. Perry. 2007. “Causes of Oxidative Stress in Alzheimer Disease.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (17):2202–10. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7218-4.

313. Zigmond, Michael J., and Richard J. Smeyne. 2014. “Exercise: Is It a Neuroprotective and If So, How Does It Work?” *Parkinsonism & Related Disorders* 20 (January):S123–27. https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70030-0.

314. Zorov, Dmitry B., Magdalena Juhaszova, and Steven J. Sollott. 2006. “Mitochondrial ROS-Induced ROS Release: An Update and Review.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757 (5–6):509–17. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2006.04.029.