

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

MEDICINOS FAKULTETAS

**TVIRTINU:**

Medicinos fakulteto dekanas

Vardas Pavardė

Parašas

Data (metai, mėnuo, diena)

**EMA BISKYTĖ**

**SMEGENŲ MITOCHONDRIJŲ ELEKTRONŲ PERNAŠOS  
SLOPINIMO ITAKONO RŪGŠTIES DARINIAIS KINETIKOS  
TYRIMAS**

**Bakalauro baigiamasis darbas**

Medicininės ir veterinarinės biochemijos studijų programa

Valstybinis kodas 612C741

Molekulinės biologijos, biofizikos ir biochemijos studijų kryptis

**Darbo vadovas**

Dr. Danielius Umbrasas

Kaunas, 2023

**EMA BISKYTĖ**

**SMEGENŲ MITOCHONDRIJŲ ELEKTRONŲ PERNAŠOS  
SLOPINIMO ITAKONO RŪGŠTIES DARINIAIS KINETIKOS  
TYRIMAS**

NEUROMOKSLŲ INSTITUTAS, BIOCHEMIJOS LABORATORIJA

**Darbo vadovas(-ė):** Danielius Umbrasas  
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

**Darbą atliko bakalaurantė** Ema Biskytė  
(vardas, pavardė) (parašas) (data)

## TURINYS

<b>SANTRAUKA</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>SANTRUMPOS</b> .....	<b>9</b>
<b>ĮVADAS</b> .....	<b>10</b>
<b>DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI</b> .....	<b>11</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....	<b>12</b>
1.1. Itakono rūgštis (itakonatas) (IR) ir Irg1 .....	12
1.2. Mikroglia .....	14
1.2.1 Sukcinato dehidrogenazės (SDH) slopinimas.....	15
1.2.2. IR aktyvina Keap1/Nrf2 ir reguliuoja makrofagų imuninę funkciją.....	15
1.3. Baltymų itakonilimas.....	16
1.4. IR poveikis mitochondrijoms .....	17
1.5. Mitochondrijų elektronų pernašos grandinė .....	18
1.5.1 I kompleksas (NADH:Ubichinono oksidoreduktazė).....	18
1.5.2. II kompleksas (sukcinato dehidrogenazė).....	19
1.6. Glutationas (GSH) ir ditioneitolis (DTT).....	19
<b>2. TYRIMO METODIKA IR METODAI</b> .....	<b>21</b>
2.1. Tyrimo objektas .....	21
2.2. Aparatūra ir indai.....	21
2.3. Tirpalai ir reagentai .....	21
2.4. Mitochondrijų išskyrimas .....	22
2.5. Bendro mitochondrijų baltymų kiekio nustatymas.....	22
2.6. I-ojo mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų fermentinio aktyvumo nustatymas .....	23
2.7. GSH ir DTT įtaka I-jo kompleksų slopinimui itakono rūgštimi .....	24
2.8. Nuo II kompleksų substrato priklausomo mitochondrijų kvėpavimo greičio vertinimas .....	24
2.9. GSH ir DTT įtaka II-jo kompleksų slopinimui itakono rūgštimi .....	25
2.10. Fermentų kinetinių konstantų skaičiavimas .....	25
2.11. Statistinių duomenų analizė.....	26
<b>3. REZULTATAI</b> .....	<b>27</b>
3.1. Itakono rūgšties poveikis I-ojo elektronų pernašos grandinės kompleksų aktyvumo kinetikai bei GSH ir DTT įtaka poveikiui .....	27
3.1.2. Itakono rūgšties poveikis mitochondrijų kvėpavimo grandinės I-ajam kompleksui .....	27
3.1.3. GSH ir DTT įtaka I-jo kompleksų slopinimui itakono rūgštimi.....	29
3.2. Itakono rūgšties poveikis II-ojo elektronų pernašos grandinės kompleksų aktyvumo kinetikai bei GSH ir DTT įtaka poveikiui .....	31

3.2.1 Itakono rūgšties poveikis mitochondrijų kvėpavimo grandinės II-ajam kompleksui.....	31
3.2.2 GSH ir DTT įtaka II-jo komplekso slopinimui itakono rūgštimi .....	33
<b>4. REZULTATŲ APTARIMAS .....</b>	<b>35</b>
<b>5. IŠVADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>6. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....</b>	<b>38</b>
<b>7. PRIEDAI .....</b>	<b>43</b>

## SANTRAUKA

**Bakalauro baigiamojo darbo autorius:** Biskytė E.

**Tema:** Smegenų mitochondrijų elektronų pernašos slopinimo itakono rūgšties dariniais kinetikos tyrimas

**Mokslinis vadovas:** dr. D. Umbrasas

**Atlikimo vieta:** Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Neuromokslų institutas, Biochemijos laboratorija

**Darbo tikslas:** Ištirti itakono rūgšties poveikį smegenų mitochondrijų I-ojo ir II-ojo kompleksų aktyvumui

**Darbo uždaviniai:** Įvertinti itakono rūgšties poveikį I-ojo elektronų pernašos grandinės komplekso aktyvumo kinetikai; įvertinti itakono rūgšties poveikį II-ojo elektronų pernašos grandinės komplekso aktyvumo kinetikai; įvertinti nukleofilinių bei cisteinus redukuojančių medžiagų įtaką itakono rūgšties poveikiui

**Tyrimo objektas:** Tirama iš *Wistar* veislės žiurkių smegenų išskirtos mitochondrijos. Tiriamos medžiagos- itakono rūgštis, glutationas, ditionitritolis.

**Metodika:** Mitochondrijos buvo išskiriamos diferencinio centrifugavimo metodu. I-ojo komplekso fermentinis aktyvumas buvo matuojamas naudojant užšaldytas/ atšildytas mitochondrijas ir skirtingas NADH koncentracijas (10-250  $\mu$ M) taikant spektrofotometrijos metodą. Tiriant GSH ir DTT įtaką, naudota NADH koncentracija 125  $\mu$ M. II-ojo komplekso fermentinis aktyvumas buvo matuojamas naudojant šviežiai išskirtas mitochondrijas ir skirtingas sukcinato koncentracijas (1-50 mM). Naudojamas Oroboros O2k oksigrafas ir stebimas deguonies sunaudojimo pokytis. Tiriant GSH ir DTT įtaka itakono rūgšties (IR) poveikiui II-ajam kompleksui pasirinkta sukcinato koncentracija 10 mM.

**Rezultatai:** Nustatyta, jog IR nedaro įtakos I-ojo komplekso  $K_m$  reikšmei, tačiau sumažina  $V_{max}$  reikšmę. Tiriant IR poveikį II-ajam kompleksui nustatėme, jog IR reikšmingai didina  $K_m$  reikšmę ir sumažina  $V_{max}$  reikšmę. Taip pat ištyrėme, jog GSH ir DTT nedaro įtakos I-ojo bei II-ojo kompleksų katalizuojamų reakcijų greičiui, kai terpėje yra IR.

**Išvados:** Šio tyrimo metu, remiantis kinetinėmis konstantomis, išsiaiškinome, jog IR yra nekonkurencinis I-ojo komplekso slopiklis. Taip pat nustatėme, jog IR slopina maksimalų mitochondrijų kvėpavimo greitį, kai naudojamas II-ojo komplekso substratas. II-ojo komplekso slopinimo tipas mišrus.

Tačiau GSH ir DTT nedaro įtakos nei I-am, nei II-am kvėpavimo grandinės kompleksams, kai jie yra veikiami IR.

## SUMMARY

**Author of Bachelor's Thesis:** Biskytė E.

**Topic:** Kinetic study of the inhibition of brain mitochondrial electron transfer by itaconic acid derivatives.

**Scientific supervisor:** Dr. D. Umbrasas

**Place of the experiments:** Lithuanian University of Health Sciences, Institute of Neuroscience, Biochemistry Laboratory

**The aim of the study:** To investigate the effect of itaconic acid on the activity of complexes I and II of brain mitochondria

**The tasks of the study:** To evaluate the effect of itaconic acid on the kinetics of the activity of complex I of the electron transport chain; to evaluate the effect of itaconic acid on the kinetics of the activity of complex II of the electron transport chain; to evaluate the effect of nucleophilic and cysteine-reducing substances on the effect of itaconic acid.

**The object of the study:** Mitochondria isolated from the brain of *Wistar* rats. Substances studied: itaconic acid, glutathione, dithiothreitol.

**Methods:** Mitochondria were isolated by differential centrifugation. The enzymatic activity of complex I was measured using frozen/thawed mitochondria and different concentrations of NADH by spectrophotometry method. When investigating the effect of GSH and DTT on the activity of the I-st complex in the presence of itaconic acid, the concentration of the substrate NADH was 125  $\mu\text{M}$ . The enzymatic activity of complex II was measured using freshly isolated mitochondria and different concentrations of succinate (1-50 mM). The Oroboros O2k oxygraph was used and the change in oxygen consumption was monitored. When investigating the effect of GSH and DTT on the activity of the II-nd complex in the presence of itaconic acid, the concentration of the substrate succinate was chosen to be 10 mM.

**Results:** Itaconic acid had no effect on complex I  $K_m$ , but reduced  $V_{\max}$ . When the effect of itaconic acid on complex II was investigated, we found that itaconic acid significantly increased the  $K_m$  value and decreased the  $V_{\max}$  value. We also found that GSH and DTT had no effect on the activities of complex I and II in the presence of itaconic acid.

**Conclusions:** In the present study, we found that itaconic acid is a non-competitive inhibitor of complex I based on kinetic constants. We also found that itaconic acid inhibits the maximal

mitochondrial respiration rate in the presence of complex II substrate. The type of inhibition is mixed. However, GSH and DTT do not affect either complex I or II of the respiratory chain when exposed to itaconic acid.



## SANTRUMPOS

IR - itakono rūgštis (itakonatas)

ACOD1 - cis-akonitato dekarboksilazė

Irg1 – imuninis gernas 1 (angl. *immune-responsive gene 1*)

DI – dimetilitakonatas

4-OI - 4-oktilitakonatas

ICL – izocitrato liazė

IRP – išemijos- reperfuzijos pažeidimas

ALT - alanino transaminazė

PL – Parkinsono liga

TLR4- Toll tipo 4 receptorius

NO – azoto monoksidas

SDH – sukcinato dehidrogenazė

ROS – reaktyvūs deguonies junginiai

GAPDH - gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazė

ATP - adenzino trifosfatas

CoQ – ubichinonas

QH<sub>2</sub> – ubichinolis

GSH – glutationas

DTT – ditionitritolis

## IVADAS

Itakono rūgštis (IR) visai neseniai buvo atrasta kaip žinduolių antimikrobinis ir imunomoduliacinis metabolitas [1]. IR gaminama LPS aktyvuotuose makrofaguose ir siejama su makrofagų metaboliniu perprogravimu uždegiminių reakcijų metu [2]. Žinoma, jog IR turi daug molekulinę taikinių makrofaguose, tarp kurių ir mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksai. Tyrimų rezultatai rodo, jog IR, naudojant I-ojo ir II-ojo kompleksų substratus, slopina mitochondrijų kvėpavimą [3], todėl ji prisideda prie energijos gamybos reguliacijos. Taip pat, IR reguliuoja makrofagų imuninę funkciją aktyvuojant Keap1/Nrf2 signalinį kelią [4-6]. Šios funkcijos rodo IR metabolizmą reguliuojančias ir imunomoduliacines savybes. IR taip pat daro teigiamą poveikį įvairioms ligoms, pavyzdžiui išemijai ir reperfuzijai [7], Parkinsono ligai [8] ir net virusinėms infekcijoms, pavyzdžiui, Covid-19 [7]. Ši IR savybė atveria galimybę, jog IR galėtų būti perspektyvus kandidatas įvairioms ligoms gydyti, tačiau tam yra reikalingi detalesni tyrimai.

IR gamyba neapsiriboja tik makrofagais. Pavyzdžiui, mikroglijos ląstelės yra pirminis imuninis barjeras smegenyse, kuris užtikrina CNS homeostazę bei apsaugą nuo patogenų [9]. Šiose ląstelėse, kaip ir kraujyje ar kituose audiniuose makrofaguose, uždegimo sąlygomis kaupiasi IR [10]. Taip pat, kito tyrimo metu išsiaiškinta, jog IR gali būti gaminama ir neuronuose [11]. Todėl galima daryti prielaidą, kad IR vis dar nėra pilnai ištyrta ir galbūt ateityje bus žinoma daugiau IR savybių ir funkcijų.

Šiuo metu manoma, kad biologinis IR poveikis pasireiškia dėl kovalentinės baltymų modifikacijos, kurios metu IR jungiasi prie tam tikrų baltymų cisteinų liekanų sulfhidrilo grupių – baltymų itakonilimo. Nors ir atrastos įvairios IR funkcijos ir žinoma, kad IR gali modifikuoti daugiau nei 1000 viduląstelių baltymų makrofaguose [12], tačiau vis dar nėra aišku kaip tiksliai itakonilimas veikia baltymų funkcijas ir kaip IR pašalinama nuo baltymų. Šio darbo metu kėlėme hipotezę, kad IR prisijungimą ar pašalinimą nuo baltymų galėtų veikti nukleofilas glutationas (GSH) arba cisteinų reduktorius ditioneitolis (DTT). Tyrėme kaip IR veikia mitochondrijų kvėpavimo grandinės I-ojo ir II-ojo kompleksų aktyvumą ir taip pat tyrėme GSH ir DTT įtaką IR poveikiui I-ajam ir II-ajam kompleksams.

## DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

### Darbo tikslas:

Ištirti itakono rūgšties poveikį smegenų mitochondrijų I-ojo ir II-ojo kompleksų aktyvumui

### Darbo uždaviniai:

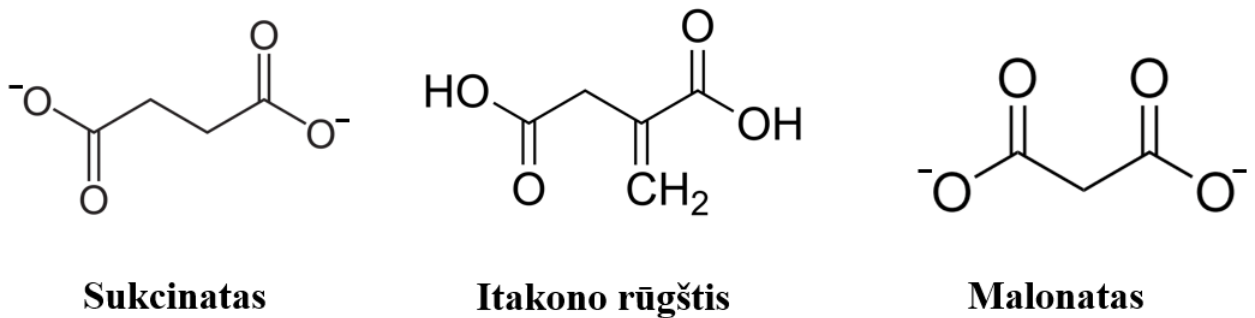
1. Įvertinti itakono rūgšties poveikį I-ojo elektronų pernašos grandinės komplekso aktyvumo kinetikai
2. Įvertinti itakono rūgšties poveikį II-ojo elektronų pernašos grandinės komplekso aktyvumo kinetikai
3. Įvertinti nukleofilinių bei cisteinus redukuojančių medžiagų įtaką itakono rūgšties poveikiui

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Itakono rūgštis (itakonatas) (IR) ir Irg1

Itakono rūgštis- žinduolių metabolitas, kurio dideli kiekiai yra gaminami aktyvuotuose makrofaguose dekarboksilinant cis-akonitą [13-15]. Šią reakciją katalizuoja fermentas cis-akonitato dekarboksilazė (ACOD1), kuri koduojama Irg1 (angl. *immune-responsive gene 1*) genas [13-16]. Svarbu paminėti, jog pagal atliktų tyrimų duomenis, viduląstelinė IR koncentracija po uždegiminio aktyvinimo gali išaugti iki 2 mM pelių makrofagų ląstelių linijoje ir iki 8 mM pelių kaulų čiulpų makrofaguose [17].

Struktūriškai IR yra penkių anglių  $\alpha,\beta$ -nesočioji dikarboksirūgštis [13]. Ji struktūriškai yra panaši į kitus metabolitus, tokius kaip sukcinatas, malonatas ir kitus (1 pav.) [4,13]. Struktūriniai panašumai lemia, jog IR gali būti pernešama į citozolį dalyvaujant kitų karboksirūgščių nešikliams, pavyzdžiui, malonato [5].



*1 pav. Itakono rūgšties struktūriniai panašumai į sukcinatą ir malonatą*

Aktyvintuose makrofaguose IR susidaro iš Krebso ciklo tarpinių metabolitų ir atlieka svarbų vaidmenį makrofagų funkciniam pokyčiams uždegimo metu [4]. Nustatyta, kad IR slopina LPS sukeltą IL-6, IL-12, IL-18, IL-1 $\beta$  ir I tipo IFN gamybą ir tai iš dalies lemia makrofagų imuninį atsaką [18]. IR makrofaguose gali sukelti metabolitų ir mitochondrijų kvėpavimo pokyčius, slopinant tam tikrus mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksus, o metabolinės būklės pokyčius seka ir ląstelių funkcijos pokyčiai, pavyzdžiui, makrofagų poliarizacija ir padidėjęs citokinų išsiskyrimas [4].

Irg1 dalyvauja makrofagų imunometabolizmo reguliacijoje uždegimo bei infekcijos metu. Imunometabolizmas apibūdina imuninių ir metabolinių kelių sąveiką streso metu [18]. Irg1 raiška padidėja aktyvuotose imuninėse ląstelėse, pavyzdžiui, makrofaguose, reaguojant į patogenų infekciją, patogenų darinius, pavyzdžiui, LPS ir kitais atvejais. Irg1 raišką kontroliuoja imuniniai receptoriai, pavyzdžiui TLR4 ir interferono- $\alpha/\beta$  receptoriai, adaptoriniai baltymai, pavyzdžiui MYD88 baltymas, ubikvitino ligazės ir transkripcijos veiksniai sudarydami sudėtingus signalų perdavimo kelius [18].

Svarbu paminėti, jog neaktyvuotuose makrofaguose Irg1 raiška yra labai maža [7,18]. Irg1 atlieka dvejopą vaidmenį imunite. Viena vertus, apriboja patogenų infekcijas bei mažina uždegiminį atsaką. Kita vertus, nenormali raiška gali lemti navikų progresavimą, neurodegeneracines ligas ir imuninį paralyžių [5].

IR ribotai pereina ląstelių išorinę membraną dėl savo struktūroje turimų neigiamų karboksi grupių [4]. Kaip išeitį, mokslininkai susintetino dimetilitakonatą (DI) ir 4-oktilitakonatą (4-OI)-membranoms pralaidžius IR darinius, kurie prasiskverbia į ląstelę be nešiklių. Eksperimentai buvo atliekami su prielaida, kad šie esteriai ląstelės viduje virsta IR, tačiau vėliau buvo parodyta, kad DI nevirsta IR ląstelėse, bet pasižymi panašiomis savybėmis į IR [4]. Tačiau 4-OI yra verčiamas į IR ląstelių viduje [8]. Nepaisant to, tiek DI, tiek 4-OI pasižymi elektrofilinėmis savybėmis, todėl, kaip ir laisva IR, dalyvauja Michaelio adicijos reakcijose, dėl to turi palyginamą biologinį poveikį [7]. Taigi šiuo metu žinomi itakonato biologiniai poveikiai yra parodyti su vienu iš trijų IR darinių: neesterifikuota IR, DI bei 4-OI.

IR slopina izocitrato liazę (ICL)- pagrindinį glioksilato šunto fermentą, reikalingą daugeliui bakterijų, kad išgyventų infekcijos metu [7,15,16,18,19]. Šis slopinimas riboja nuo ICL aktyvumo priklausančių patogenų augimą. Tačiau, įdomu tai, kad kai kurie patogenai geba išvengti IR poveikio infekcijos metu jį skaidant ir metabolizuojant iki piruvato ir acetil-CoA. Kiti patogenai, tokie kaip *S. aureus* ir *P. aeruginosa* gali panaudoti iš šeimininko gaunamą IR bioplėvelės formavimuisi ir taip padidinti savo patogeniškumą ir išgyvenamumą [13].

IR ir dariniai pasižymi priešūždegiminiu poveikiu [13]. Todėl jų teigiamas poveikis yra parodytas įvairių uždegiminių ligų modeliuose. Pavyzdžiui, COVID-19 metu, 4-OI riboja pernelyg didelį IFN aktyvumą reguliuodamas Nrf2 aktyvumą ir taip slopindamas viruso sukeltą uždegiminį atsaką ir palengvindamas COVID-19 pacientų klinikinius simptomus [7]. Kitas sutrikimas, kuriam IR ir jos dariniai gali daryti įtaką yra išemijos-reperfuzijos pažeidimas (IRP). Buvo išsiaiškinta, kad pelėms, be Irg1, po kepenų IRP audinio pažeidimo, pagal padidėjusią alanino transaminazės (ALT) koncentraciją serume. Tačiau, gydant 4-OI, buvo sumažinta apoptozinė ląstelių žūtis tiek *in vitro*, tiek *in vivo*. Matoma, kad IR bei 4-OI reguliuoja IRP ir sumažina IRP pasekmes mažindamas uždegimą, oksidacinį stresą bei ląstelių pažeidimus [7]. Taip pat, buvo atliktas tyrimas su smegenų IRP, kurio metu buvo vertinamas neurologinis deficito balas pelėms 3-čią dieną po insulto. Rezultatai rodo, kad DI gydytų pelių neurologinio deficito balas buvo ženkliai mažesnis nei tų, kurios buvo gydomos fiziologiniu tirpalu. Tai rodo, kad DI gali turėti apsauginį poveikį išeminiam insultui. Taip pat, pastebėta, kad DI slopino toksinę M1 mikroglijos poliarizaciją ir mažino Il-1 $\beta$  ekspresiją. Šie rezultatai preliminariai rodo, jog DI gali būti tinkamas smegenų išemijos ir (arba) reperfuzijos sukulto smegenų pažeidimo gydymo būdas, tačiau tam dar reikia išsamesnių tyrimų [20].

IR reikšmė taip pat yra svarbi ir neurodegeneracinėms ligoms. IR poveikis yra parodytas Parkinsono ligai (PL). Jis buvo tiriamas PL atsiradimui ir progresavimui taikant *in vitro* ir *in vivo* modelius. Tam buvo naudojamos ląstelės ir pelės su sukelta PL. Rezultatai rodo, kad IR susilpnina dopamino neuronų pažaidą ir apoptozę, uždegiminį atsaką ir oksidacinį stresą, veiksmingai slopina neuroūdegimą ir užtikrina dopamino produkciją tiek pelių, tiek ląstelių su sukelta PL modeliuose. Tai įrodo, kad IR gali būti perspektyvus vaistas PL gydymui [8].

Iki šiol vyrauja nuomonė, kad makrofagai ir mieloidinės ląstelės yra vienintelės gaminančios IR [13]. Tačiau, yra duomenų, kurių dėka žinome, kad IR gamyba neapsiriboja šiomis ląstelėmis. Yra įrodyta, jog Zikos viruso infekuotuose neuronuose Irg1 raiška padidėja, o gaminama IR slopina SDH aktyvumą tiek *in vivo*, tiek *in vitro* [7,18]. Tai ne tik patvirtina, kad IR veikia priešūždegimiškai nuo SDH priklausomu būdu [21], bet ir įrodo, jog IR gali būti gaminama ir neuronuose.

## 1.2. Mikroglija

Mikroglijos- smegenų makrofagai, kurie embriogenezės pradžioje įsiskverbia į nervinį audinį. Jos skiriasi nuo kitų audinių makrofaugų savo unikalia savybe įsitvirtinti smegenų parenchimoje [10]. Mikroglijos ląstelės yra pirminis imuninis barjeras smegenyse, dėl to jos palaiko smegenų homeostazę bei normalią neuronų funkciją [9]. Mikroglija, kaip ir makrofagai, atpažįsta patogenus per receptorius, pavyzdžiui Toll tipo 4 receptorių (TLR4). Šie ir kiti mikroglijos receptoriai atpažįsta įvairius su patogenais susijusius ligandus, pavyzdžiui, bakterijų endotoksina LPS, kuris gali sukelti uždegiminę kaskadą [4,10,13].

Mikroglijos ląstelės, taip pat kaip ir makrofagai, greitai reaguoja į patekusius patogenus ir poliarizuoja į mažiausiai du potipius M1 (prouždegiminį) ir M2 (priešuždegiminį) [10,15,20]. Šiuos pokyčius sukelia skirtingų citokinų padidėjęs išsiskyrimas ar bakterijų komponentai [10]. Atliekant eksperimentus su pelių makrofagais ir mikroglijomis nustatyta, kad Irg1 raiška labiausiai padidėja esant prouždegiminėms sąlygoms, pavyzdžiui, bakterinės infekcijos metu [15]. Uždegimo metu, mikroglijose kaupiasi įvairūs metabolitai kaip sukcinatas, laktatas, azoto monoksidas (NO), IR. Pastebėtina, jog mikroglijose IR kaupimasis koreliuoja su sukcinato kaupimusi [10]. Taip pat, yra duomenų, kad besikaupiantys metabolitai turi imunomoduliacinį poveikį, o jų kiekio pokyčiai gali turėti įtakos makrofaugų uždegiminei būklei [4]. Taip pat, jau yra žinoma, kad IR slopina M1 fenotipą ir riboja uždegiminį atsaką [22].

Pakartotinai ar ilgai veikiant tam tikram dirgikliui, atsiranda daugiau M2 fenotipų, sumažėja tam tikrų prouždegiminių citokinų gamyba ir padidėja priešuždegiminių citokinų gamyba, taip yra išvengiama ląstelių pažaidos ir skatinamas audinių atstatymas [4]. Šiuo metu, IR susikaupimas yra siejamas su M1 fenotipu, o IR M2 aktyvacijoje nėra gerai ištirtas ir publikuoti duomenys mokslinėje literatūroje nėra vieningi [22].

Literatūroje geriausiai aprašyti du mechanizmai, kuriais IR reguliuoja mikroglijos bei makrofagų imuninį atsaką: SDH slopinimas bei Nrf2 aktyvinimas [5,10,23]. Taip pat yra žinoma, kad IR slopina mitochondrijų kvėpavimo grandinę, veikdama tam tikrus jos kompleksus, o tai taip pat gali prisidėti prie mikroglijos uždegiminio atsako reguliacijos [14,19].

### 1.2.1 Sukcinato dehidrogenazės (SDH) slopinimas

SDH yra fermentas, kuris dalyvauja Krebso cikle ir elektronų pernašos grandinėje [18,21]. Jis prisideda prie reaktyvių deguonies junginių (ROS) susidarymo ir uždegimo. SDH inaktyvacija lemia sukcinato kaupimąsi, dėl kurio yra stabilizuojamas hipoksiją indukuojantis veiksnys  $1\alpha$ , kuris skatina IL-1 $\beta$  gamybą [18,24]. Dėl to sumažėja deguonies suvartojimo greitis ir yra slopinama mitochondrinių ROS gamyba [21]. Dėl sukcinato ir IR struktūrinio panašumo, IR tiesiogiai slopina SDH fermentinį aktyvumą tiek *in vivo*, tiek *in vitro*, konkurencingai blokuodamas SDH aktyvųjį centrą [18,21]. Kompiuteriniai baltymų struktūros modeliai rodo, jog SDH sąveikoje su sukcinatu bei su IR nedalyvauja cisteino liekanos [25], tačiau yra duomenų, jog IR gali modifikuoti tam tikrus SDH cisteinus, esančius ne aktyviajame centre [12]. Yra parodyta, kad Irg1 aktyvinimas bei IR gamyba didina sukcinato kaupimąsi po makrofagų paveikimo LPS. Priešingai, makrofaguose be Irg1, po aktyvinimo LPS ir IFN- $\gamma$ , nesigamina IR, o sukcinato kaupimasis nevyksta. Taip pat, buvo pastebėta, jog mažėja uždegiminių citokinų gamyba, pavyzdžiui IL-1 $\beta$ , kai makrofaguose Irg1 yra inaktyvuotas. Todėl buvo iškelta teorija, jog uždegiminis atsakas ląstelėse priklauso ne tik nuo sukcinato kaupimosi, bet ir nuo sukcinato oksidacijos [18]. SDH slopinimas IR yra priskiriamas priešuždegiminiams IR mechanizmams ir žinduolių organizme lemia sukcinato kaupimąsi ląstelėje. Nors sukcinato kaupimasis turėtų didinti citokinų išskyrimą, tačiau IR, slopindama SDH tuo pačiu slopina ir uždegimą, ir citokinų išsiskyrimą. Kol kas, šie veikimo mechanizmai nėra iki galo ištirti [19].

### 1.2.2. IR aktyvina Keap1/Nrf2 ir reguliuoja makrofagų imuninę funkciją

Keap1/Nrf2 signalinis kelias yra redukcijos reakcijų sistema, kuri reguliuoja 1-10% organizmo genų. Šie genai daugiausia koduoja detoksikacijos ir antioksidacinių sistemų baltymus. Fiziologinėmis sąlygomis, Nrf2 lokalizuotas citoplazmoje ir jungiasi prie Keap1 baltymo, kuris kontroliuoja Nrf2 kiekį bei lokalizaciją į branduolį skatindamas Nrf2 proteolizę. Oksidacinio streso ar uždegimo atvejais, Keap1 cisteinų liekanos yra modifikuojamos ir taip Nrf2 atsiskiria nuo Keap1. Tuomet Nrf2 nukeliauja į branduolį, kur aktyvuoja nuo Nrf2 priklausomų genų transkripciją, skatina antioksidantų ir priešuždegiminių baltymų raišką [4].

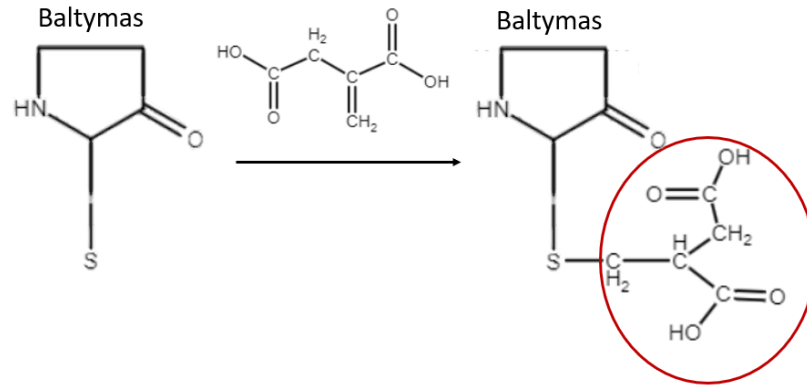
Mokslinių tyrimų rezultatai rodo, jog IR aktyvuoja Keap1/Nrf2 [5]. 4-OI padidina Nrf2 kiekį ir sustiprina LPS sukeltą Nrf2 stabilizaciją, padidina nuo Nrf2 priklausomų genų, pavyzdžiui, priešuždegiminio baltymo hemo oksigenazės 1 raišką, stimuliuoja pagrindinio antioksidanto glutationo (GSH) sintezę. Šis 4-OI poveikis buvo palygintas su dimetilmalonatu, stipriu SDH slopikliu, kuris neaktyvina Nrf2. Todėl galima daryti išvadą, kad 4-OI aktyvuoja Nrf2 ir tai atlieka nepriklausomai nuo SDH slopinimo. Taip pat, kito tyrimo metu, kuris buvo atliktas su žmogaus HEK293T ląstelėmis, buvo įrodyta, jog 4-OI alkilina tam tikras Keap1 cisteino liekamas [5]. Aptartų tyrimų metu, kaip Nrf2 aktyvatorius, buvo naudojamas 4-OI, tačiau 2021 metais atliktas tyrimas rodo, kad endogeninė IR po LPS stimuliacijos taip pat alkilina Keap1 baltymo cisteinus, taip patvirtinant IR, kaip Nrf2 aktyvatoriaus, biologinį vaidmenį [6].

### 1.3. Baltymų itakonilimas

Jau yra nustatyta, kad dėl IR esančios elektrofilinės  $\alpha,\beta$ -nesočiosios karboksirūgšties grupės, ji gali modifikuoti baltymų cisteino liekanas vykstant Michaelio adicijos reakcijoms [5,26]. Šių reakcijų metu, nukleofilas (pavyzdžiui, sulfhidrilo grupė, esanti cisteinų struktūroje) reaguoja su  $\alpha,\beta$ -nesočiuoju karbonilo junginiu (pavyzdžiui, IR) (2 pav.). Baltymai, kurių cisteino liekanos yra modifikuotos IR yra vadinami itakonilintais baltymais. 2020 metų tyrime, norint nustatyti makrofaguose esančius IR taikinius, buvo tiriami itakonilinti baltymai LPS stimuliuotuose makrofaguose. Atlikto tyrimo metu, buvo nustatyta beveik 2000 skirtingų baltymų, kurių cisteino liekanos modifikuotos IR [12]. Taip pat, anksčiau parodyta, jog IR gali inaktyvuoti gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenazę (GAPDH), tiesiogiai alkilindamas cisteino liekaną cys-22. Šios modifikacijos pasekoje yra slopinama glikolizė ir tuo pačiu sumažinama IL-1 $\beta$ , iNOS ir TNF $\alpha$  gamyba [18]. Nrf2 aktyvacija, priklausoma nuo IR, taip pat vyksta dėl baltymo Keap1 itakonilimo [5]. SDH slopinimas yra unikalus IR poveikis, nes pagal dabartinius duomenis jis nepriklauso nuo SDH kovalentinės modifikacijos IR [25], tačiau Qin ir kt tyrime buvo parodyta, jog IR taip pat alkilina tam tikras SDH cisteino liekanas [12]. Apibendrinant galima sakyti,



kad baltymų itakonilinimas yra mažai ištirta kovalentinė baltymų modifikacija, tačiau dalis IR biologinių poveikių gali būti priskirti būtent jai.



*2 pav. Baltymų cisteino liekanų itakonilinimas*

#### 1.4. IR poveikis mitochondrijoms

Buvo atliktas tyrimas su smegenų mitochondrijomis, kurio metu buvo tiriamas IR poveikis mitochondrijų kvėpavimui. Rezultatai rodo, jog IR slopina kvėpavimą su I-ojo ir II-ojo kompleksų substratais. Tyrimo autoriai, norėdami geriau suprasti mechanizmą, matavo tiesioginį IR poveikį kompleksų aktyvumui. Taip buvo matomas I-ojo, IV-ojo ir ATP sintazės kompleksų slopinimas IR [14]. Kitas publikuotas tyrimas su žiurkių kepenų mitochondrijomis, parodė, jog IR daugiausiai slopina bendrą I ir III kompleksų aktyvumą, o tai rodo, jog IR gali apsunkinti kofermento Q patekimą į kvėpavimo grandinės kompleksus [19]. Svarbu paminėti, jog IR skatina citochromo c išsiskyrimą iš mitochondrijų. Atlikto tyrimo metu, kai buvo naudojamos žiurkės kepenų mitochondrijos, buvo pastebėta, jog šis poveikis pasireiškia mitochondrijas inkubuojant su I ir II kompleksų substratais, tačiau II komplekso slopiklis malonatas neskatina citochromo c išsiskyrimo. Galima teigti, jog citochromo c išsiskyrimas yra specifiškas IR, o ne bendra reakcija į II-ojo komplekso slopinimą. Mokslininkai darė prielaidą, jog IR sukelia citochromo c rezervo atsiskyrimą nuo IV-ojo komplekso ir taip skatina išsiskyrimą iš mitochondrijų. Šis išsiskyrimas gali atlikti svarbų vaidmenį ligų patofiziologijoje, nes citochromo c atpalaidavimas iš mitochondrijų į citozolį inicijuoja ląstelių apoptozę [19].

IR taip pat daro poveikį ROS. ROS, kaip signalinės molekulės, atlieka svarbų vaidmenį ląstelių dauginimosi, prisitaikymo prie hipoksijos procesuose, tačiau per dideli ROS kiekiai gali sukelti negrįžtamą ląstelių pažeidimą ar jų žūtį [27]. ROS gali tiesiogiai naikinti patogenus, sukeldami oksidacinę žalą, ir gali skatinti genų, dalyvaujančių imuniniame reguliavime, raišką [18]. Mitochondrijų kvėpavimo grandinės I bei III kompleksai yra laikomi pagrindinėmis ROS susidarymo vietomis mitochondrijose

[27]. Fiziologinėmis sąlygomis, 0,2-2% elektronų iš elektronų pernašos grandinės nepraeina pro ATP sintazę ir per vidinę mitochondrijų membraną tiesiogiai patenka į mitochondrijų užpildą, kur sąveikaudami su deguonimi gamina superoksidą ir (arba) vandenilio peroksidą. Šiuo metu yra žinoma 11 vietų, kur susidaro superoksidai arba (ir) vandenilio peroksidai, susijusių su substrato oksidacija ir elektronų pernašos grandine [28]. Duomenys apie IR poveikį ROS gamybai nėra vieningi. Vieni šaltiniai teigia, jog IR didina ROS gamybą. Pavyzdžiui, veikiant LPS, padidėjęs Irg1 kiekis didina ROS gamybą mitochondrijose, skatindamas riebalų rūgščių panaudojimą oksidacinio fosforilavimo metu [29]. Tačiau vyrauja kita nuomonė, jog IR mažina peroksido ir ROS gamybą. Peroksido susidarymo slopinimas IR grindžiamas tuo, kad IR geba blokuoti atvirkštinį elektronų perdavimą iš ubichinolio į I kompleksą [19]. Taip pat parodyta, kad IR sumažina ROS gamybą su I ir II kompleksų substratais izoliuotose mitochondrijose. Nors, anot autorių, tai gali būti ir dėl II komplekso slopinimo, užkertančio kelią atvirkštiniam elektronų perdavimui I komplekse, kuris dalyvauja ROS susidaryme [14], tačiau yra daugiau šaltinių, kurie pateikia tą pačią išvadą [21,22,30]. Tikėtina, jog ROS mažėjimas dėl IR ar jos darinių, pasireiškia dėl Nrf2 signalinio kelio, kuris lemia antioksidacinių sistemų suaktyvėjimą ląstelėje.

## **1.5. Mitochondrijų elektronų pernašos grandinė**

Mitochondrijų elektronų pernašos grandinę sudaro keturi baltymų kompleksai (I-IV) ir judrūs elektronų nešikliai ubichinonas ir citochromas c. Grandinėje skiriami du elektronų pernašos keliai: I/III/IV kompleksai, kai substratas yra NADH, ir II/III/IV kompleksai, kai substratas yra sukcinatas [27]. Šie substratai susidaro Krebso cikle ir jie atiduoda elektronus kompleksams- atitinkamai I (NADH:Ubichinono oksidoreduktazė) ir II (sukcinato dehidrogenazė). Toliau elektronai yra pernešami ubichinonui (CoQ), tuomet keliauja į III kompleksą (ubichinono:citochromo c reduktazė), citochromą c ir IV kompleksą (citochromo c oksidazė), kur vyksta mitochondrijų kvėpavimas [28]. Elektronų pernašos metu, sukuriamas elektronų srautas, kuris siejasi su protonų gradiento abipus vidinės mitochondrijų membranos susidarymu, o protonų gradiento pavidalu sukaupta energija naudojama ATP gamyboje V komplekse (ATP sintazė) [27].

### **1.5.1 I kompleksas (NADH:Ubichinono oksidoreduktazė)**

I kompleksas yra didžiausias elektronų pernašos grandinės kompleksas. Pagrindinis vaidmuo- pernešti elektronus iš NADH, esančio mitochondrijų užpildę, į ubichinoną [27]. Pirmasis elektronų akceptorius I-ajame komplekse yra FMN, kuris virsta į FMNH<sub>2</sub>, kai priima elektronų porą iš NADH.

Toliau elektronai yra perduodami CoQ per geležies ir sieros klasterių grandinę. Elektronams prisijungus, jis yra redukuojamas į ubichinolį (QH<sub>2</sub>) [27,28]. Energija, kuri išsiskiria perkeliant elektronus, skatina keturių elektronų transportą iš užpildo į tarpmembraninę erdvę [27]. Svarbu paminėti, jog I-asis kompleksas yra reikšmingas įvairioms ligoms. Pavyzdžiui, I-ojo komplekso slopinimas gali sukelti Parkinsono ligos fenotipą, pasireiškiantį dopaminerginiu neuronų nykimu [31]. Taip pat, skirtingi tyrimai įrodė, kad smegenų išemija slopina mitochondrijų kvėpavimo grandinę dėl I-ojo komplekso inaktyvacijos [32]. Fiziologinė I-ojo komplekso slopinimo IR bei jos dariniai svarba bei mechanizmai nėra gerai ištyrinėti.

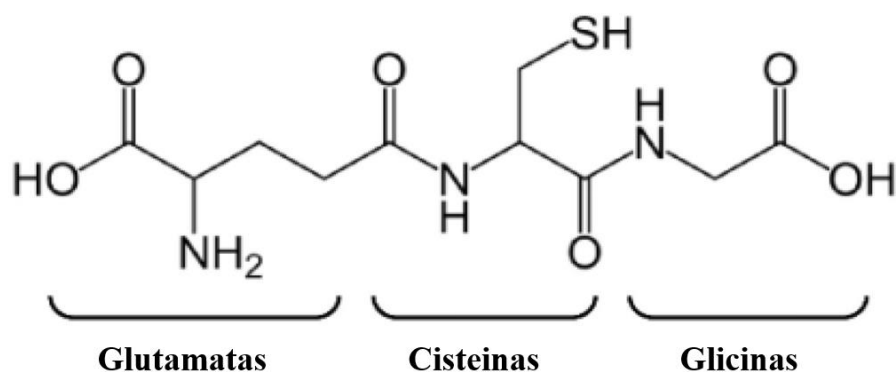
### **1.5.2. II kompleksas (sukcinato dehidrogenazė)**

Šis kompleksas yra ir Krebso ciklo, ir elektronų pernašos grandinės sudedamoji dalis, jungianti medžiagų apykaitą ir oksidacinį fosforilinimą. Krebso cikle dalyvauja katalizuojant sukcinato oksidaciją iki fumarato. Taip pat, per šį kompleksą, elektronai patenka į elektronų pernašos grandinę iš Krebso ciklo [28]. Jie yra perduodami iš sukcinato į FAD. Tuomet elektronai yra perduodami FeS klasteriams. Toliau elektronai keliauja iki ubichinono, kuris taip pat redukuojamas iki ubichinolio. Tačiau skirtingai nei I-jame komplekse vykstančių procesų metu, elektronų pernaša nėra siejama su protonų pernaša [27]. Taip yra todėl, nes šis kompleksas yra vienintelis neintegralusis baltymas [28]. Svarbu paminėti, jog šis kompleksas yra svarbus uždegiminių reakcijų metu, nes dalyvauja reguliacijoje imuninėse ląstelėse ir gali lemti ROS gamybą vykstant atvirkštinei elektronų pernašai [14]. Dabartiniiais duomenimis IR yra konkurencinis SDH slopiklis, o priešuždegiminis bei ROS mažinantis IR poveikis yra iš dalies siejamas su II-ojo komplekso slopinimu [23].

### **1.6. Glutathionas (GSH) ir ditiotreitolis (DTT)**

GSH- tripeptidas, kuris yra svarbiausias ląstelės sintetinamas mažos molekulinės masės antioksidantas. Jis sintetinamas prie glutamato pridėjus cisteiną ir gliciną (3 pav.). Cisteino grupė -SH dalyvauja redukcijos ir konjugacijos reakcijose, kurios yra laikomos svarbiausiomis GSH funkcijomis. Taip jis atlieka svarbų vaidmenį apsaugant ląsteles nuo oksidacinės pažeidimo, nes šių reakcijų metu GSH užtikrina peroksidų ir daugelio ksenobiotikų pašalinimą [33]. Be to, GSH slopina laisvųjų radikalų sukeltą žalą, pašalina ROS ir apsaugo baltymų tiolines grupes nuo oksidacijos, veikdamas kaip biologinis redokso agentas. Šias funkcijas GSH atlieka sąveikaujant su baltymų cisteino liekanomis, sudarant disulfidines jungtis [34]. Jau yra žinoma, kad IR didina GSH kiekį smegenyse [7], taip pat

žinoma, kad IR jungiasi prie cisteinų, todėl yra įdomu, kokią įtaką daro GSH IR slopinamiems kompleksams. Kita medžiaga, DTT- stiprus tiolio grupės reduktorius [35]. Jis užkerta kelią vidinių ir tarpmolekulinių disulfidinių jungčių susidarymui tarp cisteino liekanų [36]. DTT yra plačiai naudojamas disulfidiniams ryšiams redukuoti analizuojant baltymų struktūrą ir funkciją [37]. Tačiau keli tyrimai rodo, jog DTT nedaro įtakos ląstelių morfologijai ir diferenciniam ląstelių skaičiui [38].



*3 pav. Glutationo struktūrinė sudėtis*

## 2. TYRIMO METODIKA IR METODAI

Eksperimentai su gyvūnais buvo vykdyti remiantis Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (Nr. 49-1883, Nr. 49-1884) ir valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakymu „Dėl mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“ (Nr. B1-866). Procedūroms, atliekamoms su eksperimentiniais gyvūnais, buvo išduotas bioetikos komisijos leidimas nr. 2023-BEC2-192 (išduota 2023 09 21).

### 2.1. Tyrimo objektas

Tyrimas buvo atliekamas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Neuromokslų institute, Biochemijos laboratorijoje. Tyrimui buvo naudojamos smegenų mitochondrijos išskirtos iš *Wistar* veislės žiurkių (n=12). Tiriamosios medžiagos- itakono rūgštis (IR), glutationas (GSH) ir ditiotreitolis (DTT).

### 2.2. Aparatūra ir indai

Tyrimams atlikti naudota CO<sub>2</sub> kamera, stiklo-teflono homogenizatorius, centrifūga, analitinės svarstyklės, ledų vonelė, Petri lėkštelė, spektrofotometras NanoPhotometer (Implen, Vokietija), kiuvetės, oksigrafas Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Austrija), automatinės pipetės su vienkartinio naudojimo antgaliais, mikrošvirkštai, mėgintuvėliai.

### 2.3. Tirpalai ir reagentai

Mitochondrijų izoliavimo terpė (75 mM sacharozės, 225 mM manitolio, 5 mM HEPES, 1mM EGTA, pH 7,5 esant 0-4 °C temperatūrai), fosfatinis buferis (PBS) (pH = 7,2), Biureto reagentas (0,15% CuSO<sub>4</sub>, 0,6% natrio kalio tartrato, 0,75 M NaOH), 0,3% dezoksicholatas (DOX), hipotoninis buferis (25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2), I komplekso fermentinio aktyvumo matavimo buferis (50 mM TRIS buferis (pH 7,2), 500 mM natrio azidas, 25 μM antimicinas A, 5 mg/ml jaučio serumo albuminas (BSA)), 10 mM NADH, 10 mM kofermentas Q<sub>10</sub>, 1 mM rotenonas, 1 M itakono rūgštis, 0,5 M ditiotreitolis (DTT), 0,1

M glutationas (GSH), mitochondrijų kvėpavimo terpė ((pH 7,5; temperatūra 37 °C) 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl, 60 mM laktobioninė rūgštis, 20 mM taurinas, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, 20 mM sacharozė, pH 7,1 esant 37 °C temperatūrai), 1 M sukcinatas, 0,4 M ADP.

## **2.4. Mitochondrijų išskyrimas**

Mitochondrijų išskyrimui buvo naudojamas diferencinis centrifugavimo metodas. Eksperimentinės žiurkės buvo numarinamos CO<sub>2</sub> kameroje. Smegenys buvo perfuzuojamos šaltu PBS tirpalu per širdį, po to išimamos. Visos procedūros su organu buvo atliekamos ledų vonelėje (0-4 °C). Petri lėkštelėje nuo smegenų pašalinami smegenų dangalai bei smegenėlės. Tuomet smegenys perkeliama į šviesią Petri lėkštelę ir žirkklėmis sukarpomos į smulkias dalis. Po susmulkinimo, smegenys perkeliama į 25 ml mitochondrijų izoliavimo terpę ir homogenizuojama naudojant stiklo-teflono homogenizatorių. Gautas homogenatas centrifuguojamas du kartus. Pirmą kartą centrifuguota 4 °C temperatūroje 1000xg 5 minutes – nusodinami ląstelių branduoliai bei nesuirusios ląstelės. Gautas supernatantas perpilamas į švarų mėgintuvėlį ir atliekamas antrasis centrifugavimas: 4 °C, 10000xg 10 minučių. Po antrojo centrifugavimo, supernatantas nupilamas, o nusodintos mitochondrijos resuspenduojamos mitochondrijų izoliavimo terpėje.

## **2.5. Bendro mitochondrijų baltymų kiekio nustatymas**

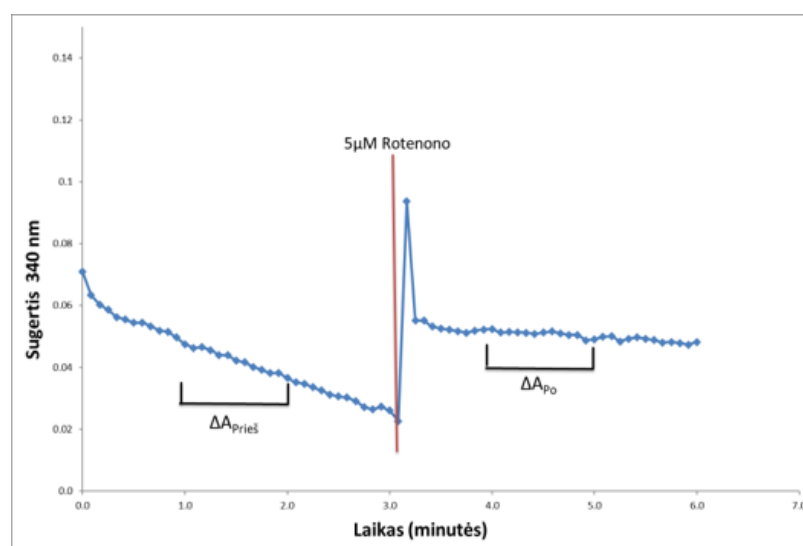
Mitochondrijų suspensijos bendras baltymų kiekis buvo nustatomas Biureto metodu [39]. 25 µl mitochondrijų suspensija sumaišoma su 0,3 proc. 975 µl DOX tirpalo ir 4 ml Biureto reagento. Mišinys inkubuojamas 30 minučių 37 °C temperatūroje. Po inkubacijos, spektrofotometru išmatuojamas tirpalo optinis tankis 536 nm bangos ilgyje. Bendras baltymų kiekis buvo nustatytas naudojant kalibracinę kreivę, paruoštą matuojant standartinių koncentracijų BSA tirpalus.

## 2.6. I-ojo mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų fermentinio aktyvumo nustatymas

Izoliuotos mitochondrijos buvo iškart užšaldomos ir laikomos  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki eksperimentų (ne ilgiau kaip 1 mėn.). Prieš pradėdant matavimus, mitochondrijos atšildomos ir centrifuguojamos  $10000\times g$  10 minučių  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Po centrifugavimo, mitochondrijos resuspenduojamos hipotoniniame buferyje. Tuomet buvo atlikti trys šaldymo ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūra) ir atšildymo ciklai. Taip buvo siekiama suardyti vidinę mitochondrijų membraną [40]. Po 3 šaldymo-atšildymo ciklų, buvo matuojamas mitochondrijų bendro baltymo kiekis naudojant Biureto metodą, kaip aprašyta anksčiau. I-ojo kompleksų fermentiniam aktyvumui buvo paimama  $50\text{ }\mu\text{g}$  mitochondrijų baltymo. Mitochondrijos išvirškščiamos į  $800\text{ }\mu\text{l}$  distiliuoto vandens pridėjus arba nepridėjus  $3\text{ mM}$  IR ir inkubuojamos 1 minutę  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Po to, mišinys perkeliamas į kiuvetę, kurioje jau buvo šviežiai pagamintas matavimo buferis iš  $50\text{ mM}$  TRIS buferio ( $\text{pH } 7,2$ ),  $500\text{ mM}$  natrio azido,  $25\text{ }\mu\text{M}$  antimicino A,  $5\text{ mg/ml}$  jaučio serumo albumino (BSA) bei  $10\text{--}250\text{ }\mu\text{M}$  NADH. NADH oksidacija buvo vertinama pagal šviesos sugerties mažėjimą esant  $340\text{ nm}$  bangos ilgiui. Spektrofotometrinis matavimas iš viso truko 6 minutes. Reakcijos iniciacijai įdedama  $100\text{ }\mu\text{M}$  kofermento  $\text{Q}_{10}$  ir šviesos sugerties pokytis stebimas 3 minutes. Po jų, kiuvetė papildoma  $5\text{ }\mu\text{M}$  I-ojo kompleksų slopikliu rotenonu ir šviesos sugertis stebima dar 3 minutes. Spektrofotometriniame grafike matomi sugerties pokyčiai per laiką (3 pav.). I-ojo kompleksų aktyvumas buvo matuojamas kaip rotenonui jautri NADH oksidacija. Specifinis I-ojo kompleksų aktyvumas skaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Aktyvumas} = \frac{\Delta A \times 1000}{\epsilon \times V \times c_{\text{baltymo}}}$$

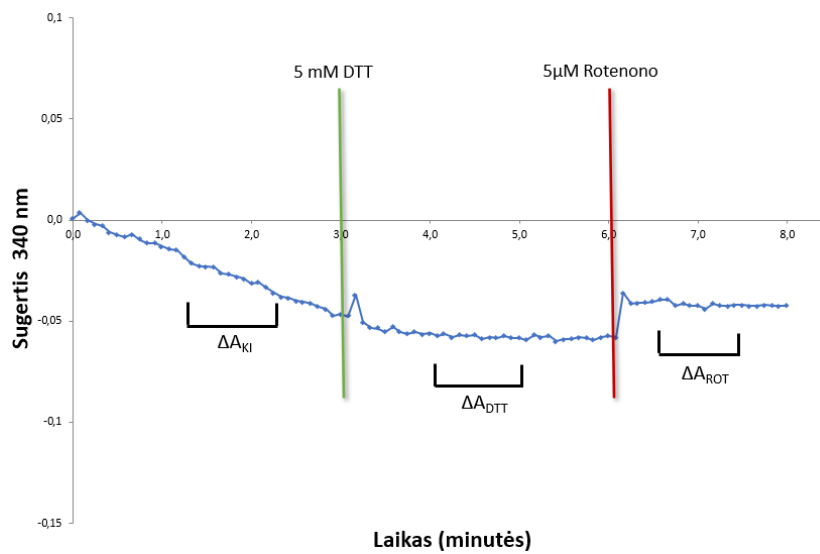
Kur  $\Delta A = \Delta A/\text{min}$  Prieš rotenono įdėjimą –  $\Delta A/\text{min}$  Po rotenono įdėjimo;  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,2\text{ mM/cm}$ .



3 pav. Pavyzdinis I-ojo kompleksų spektrofotometrinis grafikas

## 2.7. GSH ir DTT įtaka I-ojo komplekso slopinimui itakono rūgštimi

Šiems eksperimentams buvo pakoreguota spektrofotometrijos proceso eiga. Atsižvelgiant į praeitų eksperimentų rezultatus, maksimalus I-ojo kompleksu aktyvumas yra pasiekiamas kai NADH koncentracija yra 125  $\mu\text{M}$ , todėl ji ir buvo naudota GSH ir DTT įtakai tirti. Pirmas tris minutes matuojamas sugerties pokytis kontrolinėje arba IR grupėse. Tuomet kiuvetė papildoma 2 mM GSH arba 0,5 mM DTT arba 5 mM DTT ir sugertis matuojama dar 3 minutes. Galiausiai į kiuvetę dedama 5  $\mu\text{M}$  rotenono ir sugertis matuojama dar 2 minutes (pav. 4). Iš gautų spektrofotometrinių grafikų taip pat skaičiuotas I-ojo kompleksu aktyvumas, kai jis veikiamas GSH arba DTT, pagal anksčiau parašytą aktyvumo formulę. Tačiau šio tyrimo metu  $\Delta A = \Delta A_{\text{KI}} - \Delta A_{\text{ROT}}$  arba  $\Delta A = \Delta A_{\text{DTT}} - \Delta A_{\text{ROT}}$ , kai  $\Delta A_{\text{KI}} = \Delta A$  kontrolinėje arba IR grupėse.



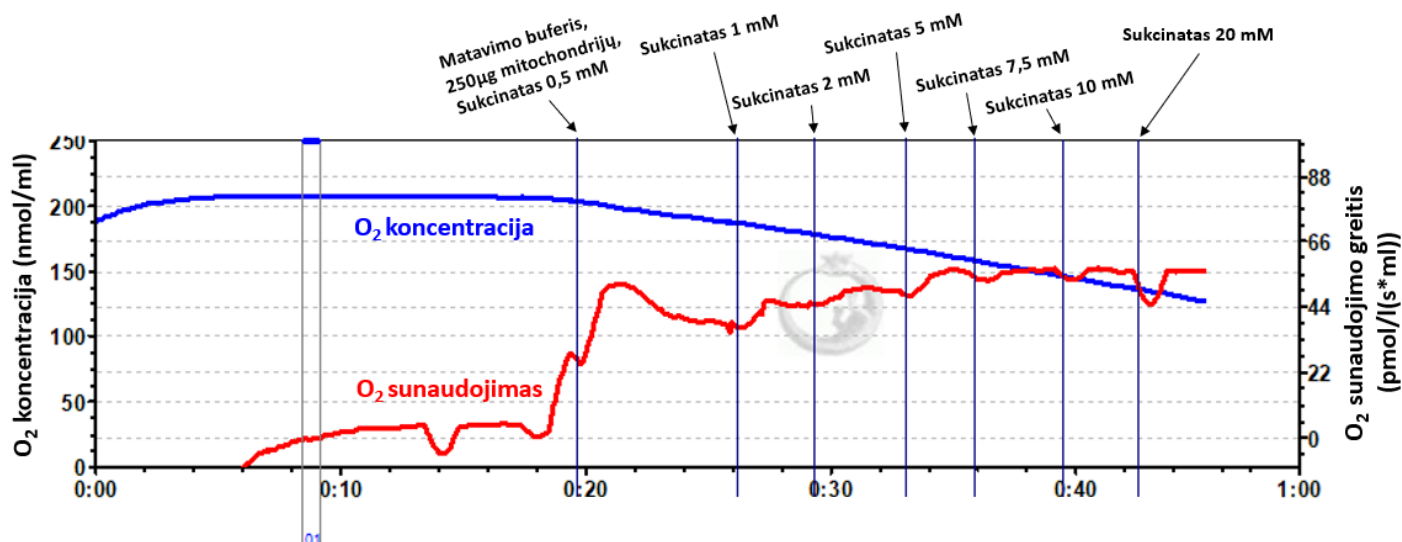
*Pav. 4 Pavyzdinis I-ojo kompleksu spektrofotometrinių grafikų veikiant DTT*

## 2.8. Nuo II kompleksu substrato priklausomo mitochondrijų kvėpavimo greičio vertinimas

Matuojant mitochondrijų kvėpavimo greitį buvo naudojamos šviežiai išskirtos mitochondrijos. Tyrimas buvo atliktas pritaikant didelės raiškos respirometrijos metodą naudojant Oroboros O2k oksigrafą. Pirmiausia, matavimo kamera užpildoma 2 ml mitochondrijų kvėpavimo terpės (pH 7,5; 37  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje) pagamintos iš 0,5 mM EGTA, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 60 mM laktobioninės rūgšties, 20 mM taurino, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 mM HEPES, 20 mM sacharozės. Terpė papildoma 2,5 mM ADP, kuris aktyvina mitochondrijų kvėpavimą, priklausomą nuo oksidacinio fosforilavimo [41]. Norint sumažinti nespecifinio signalo atsiradimą, terpė papildoma 0,5  $\mu\text{M}$  I-ojo kompleksu slopikliu rotenonu [42].



Tuomet į kamerą įšvirškčiama 0,25 mg mitochondrijų baltymo. Šių eksperimentų metu, buvo pridedama arba nepridedama IR. Kvėpavimo greitis buvo matuojamas naudojant II-ojo mitochondrijų kvėpavimo grandinės komplekso substratą sukcinatą skirtingomis koncentracijomis (0,5 mM- 50 mM) (5 pav). Šio metodo metu matuojamas nuo II-ojo komplekso priklausomas deguonies sunaudojimas mitochondrijose ir taip, pagal mitochondrijų kvėpavimo greitį, buvo netiesiogiai išmatuotas II-ojo komplekso aktyvumas.



5 pav. II-ojo komplekso kvėpavimo greičio kreivė, veikiant skirtingomis sukcinato koncentracijomis

## 2.9. GSH ir DTT įtaka II-ojo komplekso slopinimui itakono rūgštimi

Šių eksperimentų metodika atitinka anksčiau aprašytą kvėpavimo greičio vertinimo metodiką. Tačiau naudojome tik 10 mM sukcinato koncentraciją. Taip pat kamerą papildėme arba 1 mM GSH ir didinome koncentraciją iki 2 mM, arba 0,5 mM DTT ir didinome koncentraciją iki 1 mM, po to iki 5 mM. GSH ir DTT įtaka taip pat buvo tiriama kontrolinėje ir IR grupėse.

## 2.10. Fermentų kinetinių konstantų skaičiavimas

Norint apskaičiuoti I-ojo komplekso kinetines konstantas  $K_m$  ir  $V_{max}$ , iš pradžių apskaičiuojamas vienos minutės sugerties pokytis prieš pridedant rotenoną ir po jo pridėjimo tiek kontrolinėje, tiek IR grupėse. Tuomet, iš sugerties pokyčio skaičiuojamas I-ojo komplekso aktyvumas visose NADH koncentracijose abiejose grupėse pagal anksčiau pateiktą formulę. II-ojo komplekso kinetinių konstantų radimui apskaičiuojamas vidutinis deguonies sunaudojimas visose naudotose sukcinato koncentracijose. Pagal tiek I-ojo, tiek II-ojo kompleksų gautus duomenis yra

brėžiamos atvirkštinių reikšmių (*Lineweaver-Burk*) kreivės.  $K_m$  bei  $V_{max}$  buvo apskaičiuotos remiantis atvirkštinių reikšmių grafiko dėsniu: kai  $x=0$ , tai  $y=1/V_{max}$ ; kai  $y=0$ , tai  $x=-1/K_m$ . Iš šių taškų tiesėje yra išskaičiuojamos  $K_m$  ir  $V_{max}$  reikšmės. Turint kinetines konstantas, jau galima brėžti Michaelis Menten kreivę, kuri vaizduoja ryšį tarp fermentų katalizuojamos reakcijos greičio ir substrato koncentracijos. Kreivė yra brėžiama pritaikant šią formulę:

$$V = \frac{V_{max} \times [s]}{K_m + [s]}$$

Kai  $[s]$ = substrato koncentracija

## 2.11. Statistinių duomenų analizė

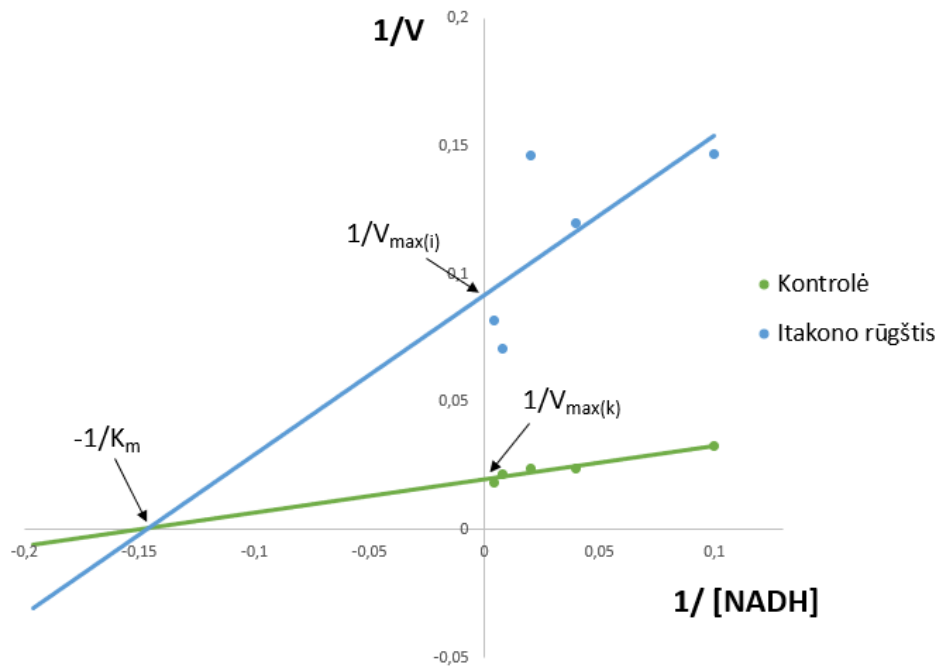
Šiame darbe pateikiami rezultatai yra gauti iš mažiausiai trijų pakartojimų. Gautų duomenų vidurkiai yra pateikiami su vidutinėmis standartinėmis paklaidomis. Statistinė analizė yra atlikta naudojant Microsoft Excel ir IBM SPSS 22 programas. Gautų duomenų vidurkiai tarpusavyje buvo lyginami naudojant naudojant Stjudento t-testą (kai lyginamos dvi grupės), o esant daugiau nei dviem - vienfaktorinę dispersinę analizę (One – Way ANOVA) su Fisher LSD kriterijumi. Vidurkių skirtumai laikomi statistiškai reikšmingais, jei  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI

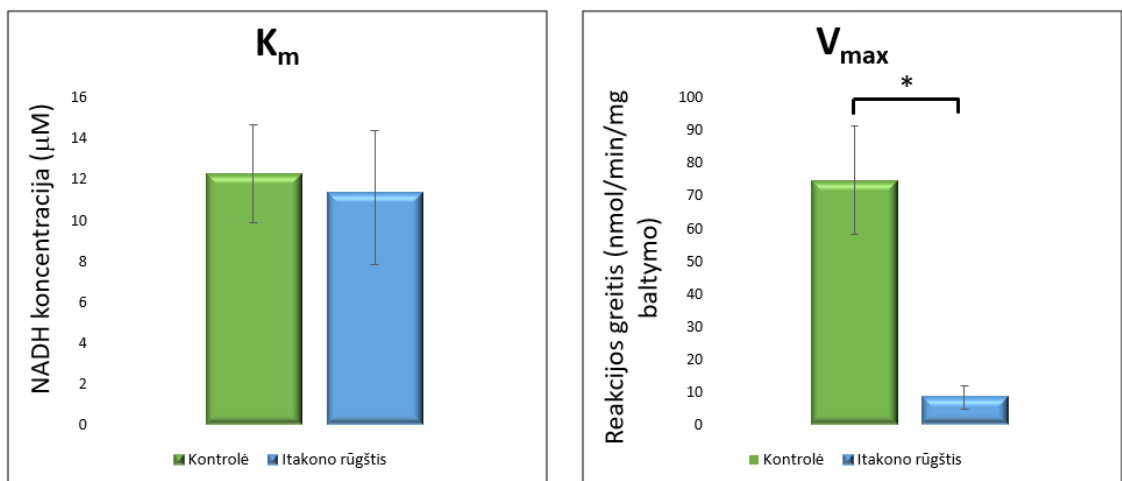
#### 3.1. Itakono rūgšties poveikis I-ojo elektronų pernašos grandinės komplekso aktyvumo kinetikai bei GSH ir DTT įtaka poveikiui

##### 3.1.2. Itakono rūgšties poveikis mitochondrijų kvėpavimo grandinės I-ajam kompleksui

Išmatavus I-ojo komplekso aktyvumą naudojant skirtingas NADH koncentracijas buvo nustatyta, kad esant 10  $\mu\text{M}$  NADH I-ojo komplekso aktyvumas yra  $33,702 \pm 4,614$  nmol/min/mg baltymo; 25  $\mu\text{M}$  NADH-  $45,217 \pm 9,9$  nmol/min/mg baltymo ; 50  $\mu\text{M}$  NADH-  $74,965 \pm 15,022$  nmol/min/mg baltymo; 125  $\mu\text{M}$  NADH  $76,631 \pm 13,361$  nmol/min/mg baltymo; 250  $\mu\text{M}$  NADH  $59,714 \pm 12,744$  nmol/min/mg baltymo. Grupėje su IR taip pat buvo naudojamos skirtingos NADH koncentracijos ir apskaičiuojamas I-ojo komplekso aktyvumas. Nustatyta, kai 10  $\mu\text{M}$  NADH I-ojo komplekso aktyvumas yra  $4,592 \pm 2,104$  nmol/min/mg baltymo; 25  $\mu\text{M}$  NADH-  $13,433 \pm 6,55$  nmol/min/mg baltymo; 50  $\mu\text{M}$  NADH-  $8,84 \pm 2,21$  nmol/min/mg baltymo; 125  $\mu\text{M}$  NADH-  $6,146 \pm 3,566$  nmol/min/mg baltymo; 250  $\mu\text{M}$  NADH-  $9,646 \pm 1,857$  nmol/min/mg baltymo. Iš gautų vidurkių buvo brėžiamos atvirkštinių reikšmių kreivės, pagal kurias skaičiuotos I-ojo komplekso kinetinės konstantos  $K_m$  ir  $V_{max}$  (6 pav.). Kontrolinės grupės  $K_m=12,289 \pm 2,376$   $\mu\text{M}$  NADH,  $V_{max}=74,654 \pm 16,581$  nmol/min/mg baltymo, o IR grupės  $K_m=11,394 \pm 2,969$   $\mu\text{M}$  NADH,  $V_{max(\text{vidurkis})}=8,35 \pm 3,573$  nmol/min/mg baltymo. Apskaičiuotos I-ojo komplekso kinetinės konstantos buvo lyginamos kontrolinėje bei IR grupėse (7 pav.). Rezultatai parodė, jog IR neturi įtakos  $K_m$  reikšmei, tačiau reikšmingai sumažina  $V_{max}$  reikšmę. Todėl galima teigti, jog IR yra nekonkurencinis I-ojo komplekso slopiklis. Pagal apskaičiuotas kinetines konstantas taip pat buvo brėžiama Michaelis-Menten kreivė (8 pav.).

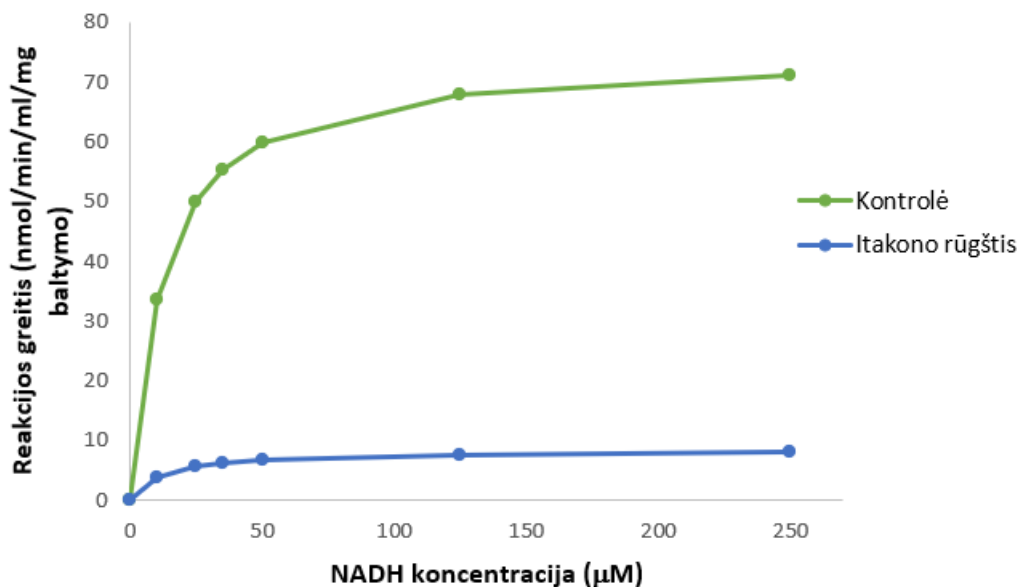


6 pav. Atvirkštinių reikšmių kreivių pavyzdys, pagal kurį skaičiuotos I-ojo komplekso  $K_m$  ir  $V_{max}$  reikšmės



7 pav. I-ojo kompleksu kinetinių konstantų palyginimas kontrolinėje ir IR grupėse

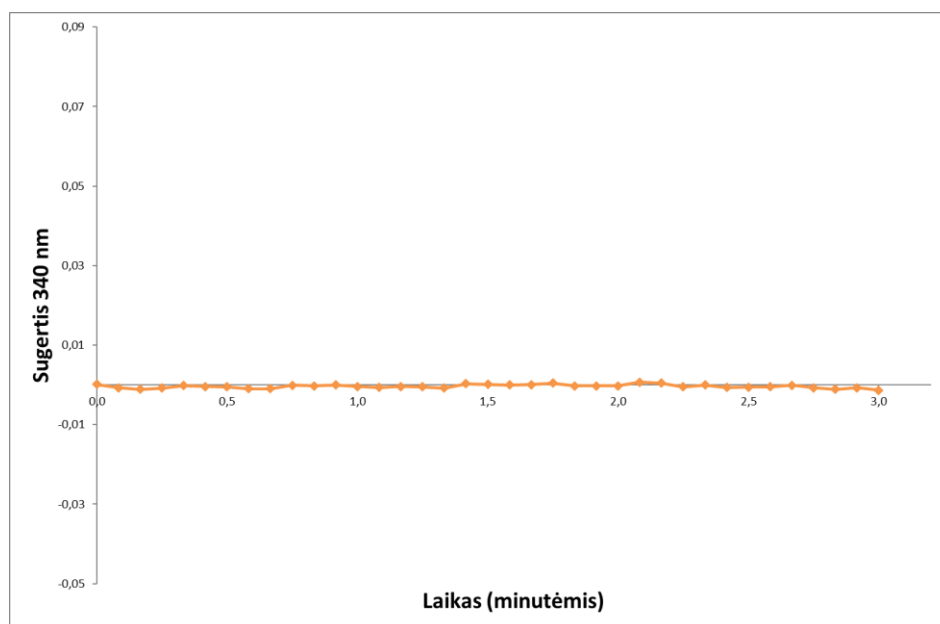
\*- statistiškai reikšmingas skirtumas,  $p < 0,05$



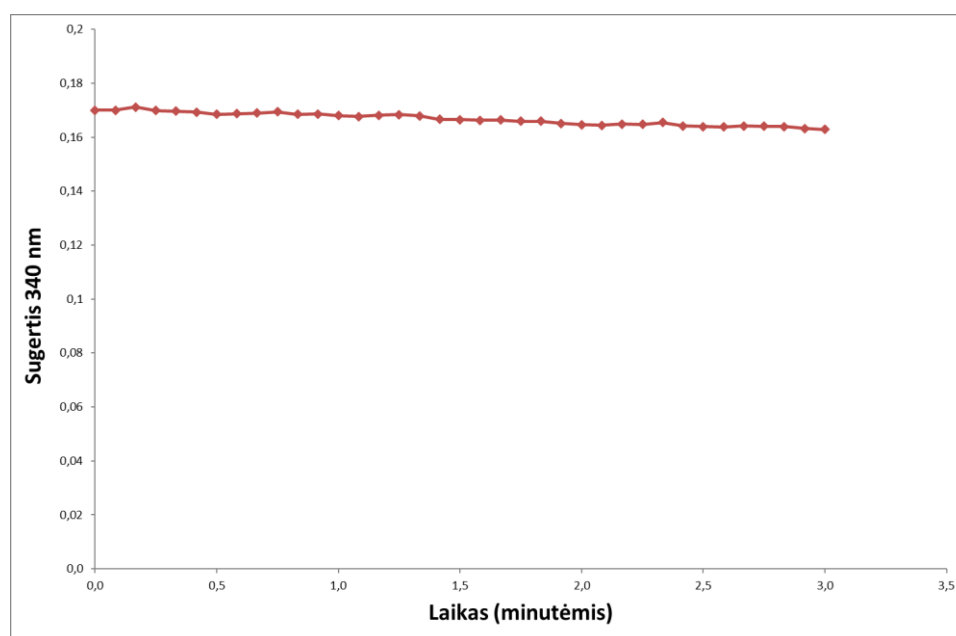
8 pav. Michaelis-Menten kreivė pagal apskaičiuotas  $K_m$  ir  $V_{max}$

### 3.1.3. GSH ir DTT įtaka I-jo kompleksio slopinimui itakono rūgštimi

Prieš tiriant GSH ir DTT poveikį I-ojo kompleksio aktyvumui buvo patikrinta, ar tirtos medžiagos turi tiesioginį poveikį NADH oksidacijai. Šiam tikslui pasiekti, atlikti spektrofotometriniai matavimai su 2 mM GSH arba 5 mM DTT, 125 μM NADH, be mitochondrijų. Pagal gautus rezultatus skaičiuotos  $\Delta A$  reikšmės. Tiriant GSH poveikį NADH oksidacijai  $\Delta A = -0,00004$ . Remiantis tiek grafiku, tiek  $\Delta A$  reikšme, galima teigti, jog GSH nedaro tiesioginio poveikio NADH oksidacijai (9 pav.). Tiriant DTT poveikį NADH oksidacijai  $\Delta A = 0,002$ . Remiantis ir grafiku, ir  $\Delta A$  reikšme, galima teigti, jog DTT taip pat nedaro tiesioginio poveikio NADH oksidacijai (10 pav.).



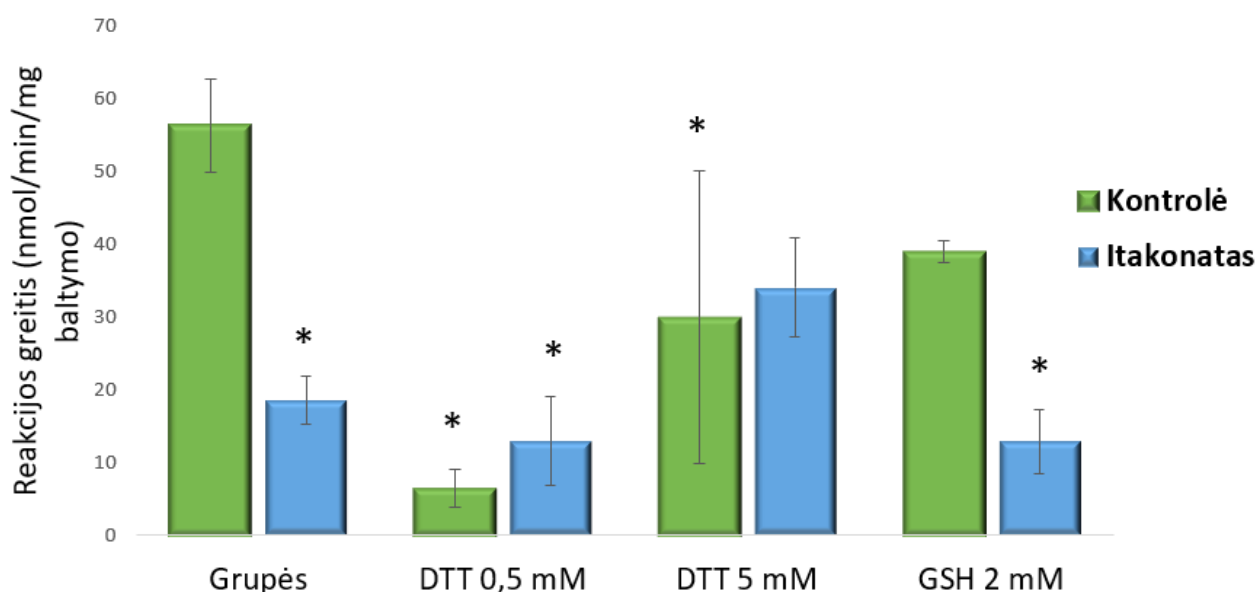
**11 pav. GSH poveikio NADH oksidacijai spektrofotometrinė kreivė**



**11 pav. DTT poveikio NADH oksidacijai spektrofotometrinė kreivė**

Tuomet tirta GSH ir DTT įtaka I-ojo kompleksio slopinimui IR. Šiuose eksperimentuose vienos minutės sugerties pokyčiai skaičiuoti kontrolinėje arba IR grupėse ir papildomai įdėjus 0,5 mM arba 5 mM DTT arba 2 mM GSH į abi grupes. Nustatytas I-ojo kompleksio aktyvumas, kai NADH koncentracija 125  $\mu$ M, kadangi kinetiniai tyrimai parodė, jog mūsų tirtomis sąlygomis 125  $\mu$ M yra įsotinanti NADH koncentracija. Gauta, kad kontrolinės grupės aktyvumas yra  $56,325 \pm 6,468$  nmol/min/mg baltymo. Šią grupę papildžius 0,5 mM DTT aktyvumas-  $6,515 \pm 2,576$  nmol/min/mg baltymo; 5 mM DTT-  $30,016 \pm 20,136$  nmol/min/mg baltymo; 2 mM GSH-  $39,021 \pm 1,503$  nmol/min/mg baltymo. IR grupės aktyvumas gautas  $18,588 \pm 3,305$  nmol/min/mg baltymo. Papildžius

0,5 mM DTT aktyvumas-  $12,965 \pm 6,08$  nmol/min/mg baltymo; 5 mM DTT-  $34,124 \pm 6,885$  nmol/min/mg baltymo; 2 mM GSH-  $12,978 \pm 4,412$  nmol/min/mg baltymo. Pagal gautus rezultatus matome, jog nei DTT, nei GSH neslopina IR poveikio I-ajam kompleksui. Nors ir 5 mM DTT IR grupėje padidina I-ojo komplekso aktyvumą, tačiau nereikšmingai (11 pav.). Taip pat pastebima, kad abi tirtos medžiagos slopina pirmojo komplekso aktyvumą kontrolinėje grupėje. Tačiau statistiškai reikšmingas slopinimas matomas tik su abiejų koncentracijų DTT (11 pav.).



11 pav. DTT ir GSH įtaka I-ojo komplekso slopinimui

\*- statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su pradine kontroline grupe,  $p < 0,05$

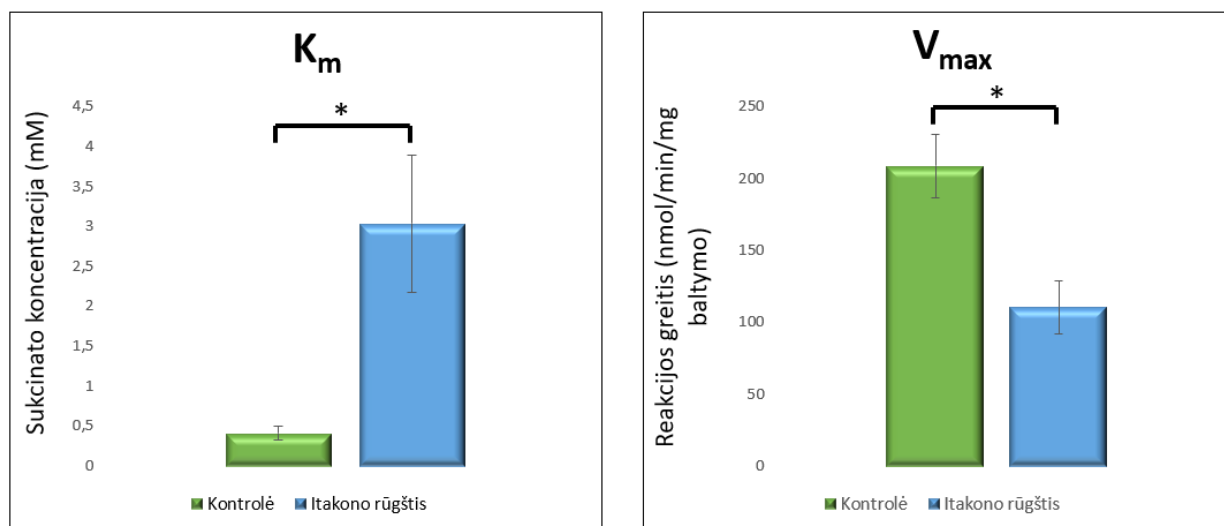
### 3.2. Itakono rūgšties poveikis II-ojo elektronų pernašos grandinės komplekso aktyvumo kinetikai bei GSH ir DTT įtaka poveikiui

#### 3.2.1 Itakono rūgšties poveikis mitochondrijų kvėpavimo grandinės II-ajam kompleksui

Šių eksperimentų metu, matuotas mitochondrijų kvėpavimas naudojant skirtingas sukcinato koncentracijas. Nustatyta, jog kontrolinėje grupėje esant 0,5 mM sukcinato mitochondrijų kvėpavimo greitis yra  $103,636 \pm 15,351$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 1 mM sukcinato-  $128,727 \pm 21,503$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 2 mM sukcinato-  $148,516 \pm 21,503$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 5 mM sukcinato-  $164,233 \pm 23,693$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 7,5 mM sukcinato-  $165,896 \pm 23,703$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 10 mM sukcinato-  $165,308 \pm 23,357$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 20

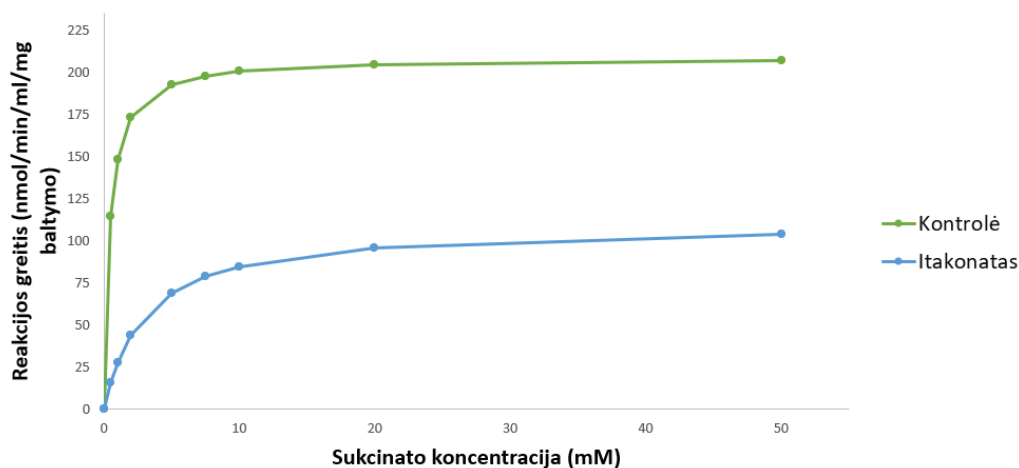






13 pav. II-ojo komplekso kinetinių konstantų palyginimas kontrolinėje ir itakono rūgšties grupėse

\*- statistiškai reikšmingas skirtumas,  $p < 0,05$

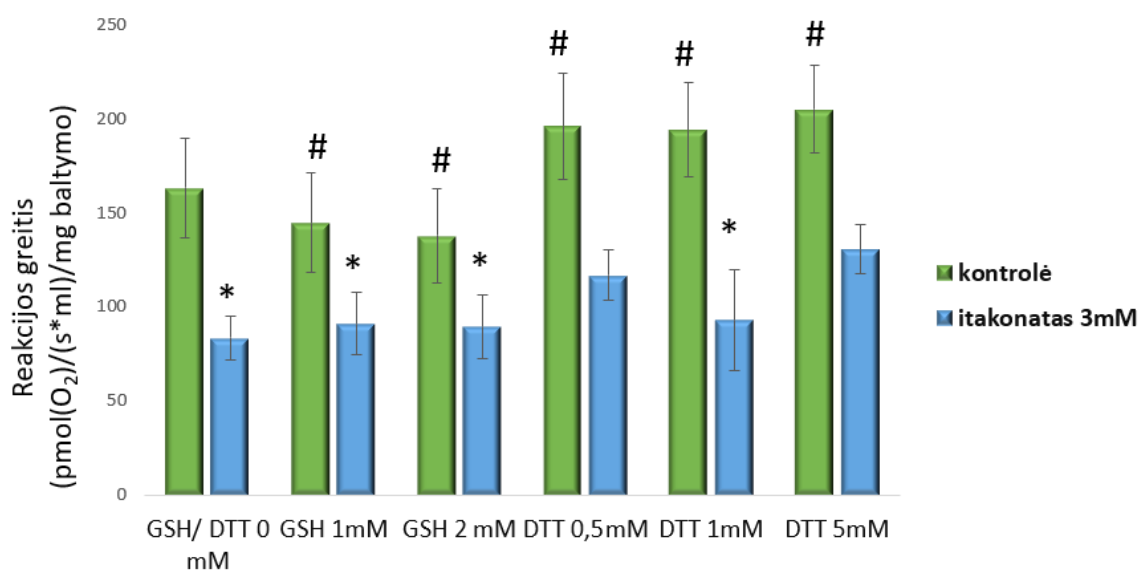


14 pav. II-ojo komplekso Michaelis-Menten kreivė pagal apskaičiuotas  $K_m$  ir  $V_{max}$

### 3.2.2 GSH ir DTT įtaka II-ojo komplekso slopinimui itakono rūgštimi

Toliau tyrėme potencialų DTT ir GSH poveikį II-ojo komplekso aktyvumui kontrolinėje ir IR grupėse. Kvėpavimo greičio pokyčiai buvo stebimi esant 10 mM sukcinatui kontrolinėje arba IR grupėse ir papildomai įdėjus 0,5 - 5 mM DTT arba 1 - 2 mM GSH į abi grupes. Gauta, jog kontrolinės grupės kvėpavimo greitis yra  $163,291 \pm 26,329$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo. Šią grupę papildžius 0,5 mM DTT aktyvumas-  $196,068 \pm 28,328$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 1 mM DTT-  $194,066 \pm 25,011$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo ;5 mM DTT-  $205,041 \pm 23,134$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 1 mM GSH-  $144,75 \pm 26,38$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 2 mM GSH-  $137,89 \pm 24,877$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo. IR grupės aktyvumas gautas  $83,46 \pm 11,642$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo. Papildžius 0,5 mM

DTT aktyvumas-  $116,694 \pm 13,337$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 1 mM DTT-  $93,114 \pm 26,965$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 5 mM DTT-  $130,658 \pm 12,844$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 1 mM GSH-  $90,87 \pm 16,525$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo; 2 mM GSH-  $89,412 \pm 16,885$  pmol(O<sub>2</sub>)/(s\*ml)/mg baltymo. Iš gautų rezultatų matoma, kad didinant DTT koncentraciją kontrolinėje grupėje arba didinant GSH koncentraciją IR grupėje kvėpavimo greitis praktiškai nekinta. Taip pat, didinant GSH koncentraciją kontrolinėje grupėje, yra matoma kvėpavimo greičio mažėjimo tendencija. Tačiau, rezultatai rodo, jog nei GSH, nei DTT nedaro įtakos IR poveikiui II-ame komplekse.



**8 pav. DTT ir GSH įtaka II-ojo komplekso slopinimui**

\*- statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su pradine kontroline grupe,  $p < 0,05$

#- statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su pradine IR grupe,  $p < 0,05$

## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Atliktų tyrimų metu buvo siekiama nustatyti IR, kaip I-ojo ir II-ojo elektronų pernašos grandinės slopiklio, tipą įvertinant fermentų kinetikos konstantas  $V_{\max}$  ir  $K_m$  terpėje esant ir nesant IR. Taip pat buvo norima išsiaiškinti, ar IR poveikis I-ojo ir II-ojo kompleksų aktyvumui priklauso nuo GSH ir DTT. Tyrimo, kai IR, kaip I-ojo komplekso slopiklis, rezultatai rodo, jog IR nedaro įtakos  $K_m$  reikšmei, tačiau reikšmingai sumažina  $V_{\max}$  reikšmę. Todėl galima daryti išvadą, jog IR yra nekonkurentinis I-ojo komplekso slopiklis. Nors ir I-ojo komplekso kinetika su IR nėra tirta kituose tyrimuose, tačiau W. Qin ir kt. aprašė itakonilino vietą I-ajame komplekse [12]. Šios I-ojo komplekso modifikacijos funkcinė svarba iki šiol nebuvo tirta, tačiau iš mūsų daryto tyrimo rezultatų galima daryti prielaidą, kad ši modifikacija gali sumažinti I-ojo komplekso katalizuojamos NADH oksidacijos greitį. Tačiau SDH slopinimas IR jau yra tirtas ne kartą [16,18,19,21], bet T. Cordes ir kt. atlikto tyrimo metu pastebėta, kad IR yra konkurencinis ir grįžtamasis SDH inhibitorius [43]. Šio eksperimento metu, buvo kiekybiškai vertinamas IR poveikis deguonies suvartojimui realiu laiku Huh7 ir A549 ląstelėse. Į ląsteles įdėjus IR iškart sumažėjo sukcinato lemiamas deguonies suvartojimas. Pastebėta, jog kvėpavimo greitis mažėjo priklausomai nuo IR kiekio. Todėl daroma išvada, jog aktyvumo pokyčiai priklauso nuo IR kiekio. Stebėta, jog padidinus SDH koncentraciją IR sukeltas slopinimas buvo grįžtamas, o dėl panašios SDH ir IR struktūros, T. Cordes ir kt. daro prielaidą, kad IR slopina SDH konkurenciniu būdu [43]. Vėliau publikuotas tyrimas parodė, kad išgrynintas SDH kompleksas yra slopinamas IR konkurenciniu būdu [23]. Iki šiol nebuvo atliktas tyrimas su suaugusio organizmo smegenų mitochondrijomis, kuomet būtų tirama sukcinato lemiamo kvėpavimo greičio priklausomybė nuo IR. Pagal atliktus II-ojo komplekso slopinimo IR eksperimentus bakalauriniame darbe yra matoma, kad IR reikšmingai didina  $K_m$  reikšmę ir reikšmingai sumažina  $V_{\max}$  reikšmę. Todėl galima teigti, jog vykstant mitochondrijų kvėpavimui IR konkuruoja su sukcinatu ir taip pat mažina maksimalų kvėpavimo greitį, kuris priklauso nuo II-ojo komplekso substrato. Kadangi anksčiau yra parodyta, jog IR gali slopinti IV-ąją mitochondrijų kvėpavimo kompleksą [3,19], galima daryti prielaidą, jog sumažėjęs  $V_{\max}$  pasireiškia dėl to, jog IR mūsų tirtoje sistemoje veikia ne tik SDH, tačiau ir IV-ąją kompleksą. Šio bakalaurinio darbo metu taip pat buvo tiriama potencialus nukleofilų (GSH) bei cisteinų redukuojančių medžiagų (DTT) poveikis I-ojo ir II-ojo kompleksų aktyvumams terpėje esant IR. Kadangi literatūroje publikuoti duomenys leidžia daryti prielaidą, jog didžioji dalis IR biologinio poveikio pasireiškia dėl baltymų cisteinų itakonilino, darėme hipotezę, kad tiek GSH, tiek DTT galėtų daryti įtaką IR prisijungimui prie cisteinų. Taip pat yra parodyta, kad GSH dalyvauja Michaelio adicijos reakcijose su IR dariniais [26], tačiau nėra žinoma, ar GSH gali pašalinti IR ar jos darinius, kurie jau yra prisijungę prie baltymų. Prieš pradėdant tirti GSH ir DTT įtaką IR slopinamiems I-ajam ir II-ajam kompleksams, buvo įsitikinta, jog šios medžiagos nedaro tiesioginio poveikio NADH oksidacijai taikant spektrofotometrijos metodą. Gauti rezultatai rodo, kad

GSH ir DTT slopina I-ojo komplekso aktyvumą kontrolinėje grupėje, tačiau nedaro jokios įtakos IR poveikiui I-ajam ir II-ajam kompleksams. Galima daryti išvadą, kad mūsų eksperimentinėmis sąlygomis GSH ir DTT neanuliuoja IR sukkelto I-ojo ir II-ojo kompleksų slopinimo, tačiau ateityje galima atlikti šiek tiek modifikuotus eksperimentus, kur yra ištiriama daugiau GSH ir DTT koncentracijų, ištiriama ar pasireikštų poveikis esant ilgesniam inkubacijos laikui su DTT ir GSH, taip pat būtų naudinga atlikti cheminę reakcijos mišinio analizę ir patikrinti, ar ten susidaro GSH-IR konjugatai. Šie rezultatai taip pat suteikia perspektyvą ateityje iširti konkrečius mechanizmus, kuriais GSH ir DTT slopina I-ojo komplekso aktyvumą kontrolinėje grupėje. Šio darbo išvadas galima apibendrinant pateikti taip: IR sukelia nekonkurencinį I-ojo komplekso slopinimą, tačiau GSH ir DTT neturi poveikio šiam slopinimui; IR sukelia mišrų mitochondrijų kvėpavimo, priklausomo nuo sukcinato, greičio slopinimą, tačiau GSH ir DTT taip pat neturi įtakos šiam slopinimui.

## 5. IŠVADOS

1. Ištyrus IR poveikį mitochondrijų kvėpavimo grandinės I-ajam kompleksui nustatyta, kad IR nedaro įtakos  $K_m$  reikšmei, tačiau sumažina  $V_{max}$  reikšmę. Todėl galime teigti, jog IR slopina I-ąjį kompleksą nekonkurenciniu būdu.
2. Įvertinus IR poveikį mitochondrijų kvėpavimo grandinės II-ojo komplekso kinetiką nustatyta, kad IR veikia mišriu būdu didinant  $K_m$  reikšmę ir sumažinant  $V_{max}$  reikšmę. Todėl darome išvadą, jog IR mažina nuo II-ojo komplekso substrato priklausomą kvėpavimo greitį.
3. Ištyrus GSH ir DTT įtaką I-ojo ir II-ojo kompleksų aktyvumams, kai jie yra veikiami IR, nustatėme, jog šios medžiagos neslopina IR poveikio.

## 6. LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] Wibom C, Surowiec I, Mören L, Bergström P, Johansson M, Antti H, et al. Metabolomic patterns in glioblastoma and changes during radiotherapy: a clinical microdialysis study. *Journal of Proteome Research*. 2010 Jun 4;9(6):2909–19. Interneto prieiga: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20302353/>
- [2] O'Neill LAJ, Artyomov MN. Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nature Reviews Immunology*. 2019 Jan 31;19(5):273–81.
- [3] Umbrasas D, Čižas P, Arandarčikaitė O, Vanagas T, Borutaitė V. Effects of itaconic acid on neuronal viability and brain mitochondrial functions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2021 Jul 9;53(5):499–511.
- [4] Shi J, Cai C. Research Progress on the Mechanism of Itaconate Regulating Macrophage Immunometabolism. *Frontiers in Immunology*. 2022 Jun 23;13.
- [5] Mills EL, Ryan DG, Prag HA, Dikovskaya D, Menon D, Zaslona Z, et al. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature*. 2018 Mar 28;556(7699):113–7.
- [6] Cifani P, Li Z, Luo D, Grivainis M, Intlekofer AM, Fenyö D, et al. Discovery of Protein Modifications Using Differential Tandem Mass Spectrometry Proteomics. *Journal of Proteome Research*. 2021 Mar 22;20(4):1835–48.
- [7] Shi X, Zhou H, Wei J, Mo W, Li Q, Lv X. The signaling pathways and therapeutic potential of itaconate to alleviate inflammation and oxidative stress in inflammatory diseases. *Redox Biology*. 2022 Dec 1;58:102553. Interneto prieiga: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231722003251#:~:text=Itaconate%20is%20involved%20in%20many> [žiūrėta 2023-07-15]
- [8] Sun G, Zhang R, Liu C, Meng W, Pang Q. Itaconate Attenuates Neuroinflammation and Exerts Dopamine Neuroprotection in Parkinson's Disease through Inhibiting NLRP3 Inflammasome. *Brain Sciences*. 2022 Sep 16;12(9):1255.
- [9] Liu RJ, Gong Y, Xia C, Cao Y, Zhao C, Zhao C. Itaconate: A promising precursor for treatment of neuroinflammation associated depression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023 Nov 1;167:115521–1.

- [10] Chausse B, Lewen A, Poschet G, Kann O. Selective inhibition of mitochondrial respiratory complexes controls the transition of microglia into a neurotoxic phenotype in situ. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2020 Aug;88:802–14.
- [11] Daniels BP, Kofman SB, Smith JR, Norris GT, Snyder AG, Kolb JP, et al. The Nucleotide Sensor ZBP1 and Kinase RIPK3 Induce the Enzyme IRG1 to Promote an Antiviral Metabolic State in Neurons. *Immunity*. 2019 Jan;50(1):64-76.e4.
- [12] Qin W, Zhang Y, Tang H, Liu D, Chen Y, Liu Y, et al. Chemoproteomic Profiling of Itaconation by Bioorthogonal Probes in Inflammatory Macrophages. *Journal of the American Chemical Society*. 2020 Jun 4;142(25):10894–8.
- [13] Peace CG, O’Neill LAJ. The role of itaconate in host defense and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*;132(2):e148548. Interneto prieiga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8759771/> [žiūrėta 2023-08-01]
- [14] Umbrasas D, Čižas P, Arandarčikaitė O, Vanagas T, Borutaitė V. Effects of itaconic acid on neuronal viability and brain mitochondrial functions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2021 Jul 9;53(5):499–511.
- [15] Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, Pailot A, Reiling N, Goldmann O, et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013 Apr 22;110(19):7820–5.
- [16] Cordes T, Wallace M, Michelucci A, Divakaruni AS, Sapcariu SC, Sousa C, et al. Immunoresponsive Gene 1 and Itaconate Inhibit Succinate Dehydrogenase to Modulate Intracellular Succinate Levels. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Jul;291(27):14274–84
- [17] Meiser J, Kraemer L, Jaeger C, Madry H, Link A, Lepper PM, et al. Itaconic acid indicates cellular but not systemic immune system activation. *Oncotarget*. 2018 Aug 3;9(63).
- [18] Wu R, Chen F, Wang N, Tang D, Kang R. ACOD1 in immunometabolism and disease. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020 Jun 29;17(8):822–33.
- [19] Belosludtsev KN, Belosludtseva NV, Kosareva EA, Talanov EYu, Gudkov SV, Dubinin MV. Itaconic acid impairs the mitochondrial function by the inhibition of complexes II and IV and induction of the permeability transition pore opening in rat liver mitochondria. *Biochimie*. 2020 Sep 1;176:150–7. Interneto prieiga: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32721502/> [žiūrėta 2023-09-15]

- [20] Zhang D, Lu Z, Zhang Z, Man J, Guo R, Liu C, et al. A likely protective effect of dimethyl itaconate on cerebral ischemia/reperfusion injury. *International Immunopharmacology*. 2019 Dec;77:105924.
- [21] Wu R, Kang R, Tang D. Mitochondrial ACOD1/IRG1 in infection and sterile inflammation. *Journal of Intensive Medicine*. 2022 Feb.
- [22] Li Z, Zheng W, Kong W, Zeng T. Itaconate: A Potent Macrophage Immunomodulator. *Inflammation*. 2023 May 4; Interneto prieiga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10159227/> [žiūrėta 2023-09-25]
- [23] Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent Emma E, Loginicheva E, et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metabolism*. 2016 Jul;24(1):158–66.
- [24] Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*. 2013;496(7444):238–42. Interneto prieiga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535595> [žiūrėta 2023-09-25]
- [25] Chen F, Elgaher W a. M, Winterhoff M, Büssov K, Waqas FH, Graner E, et al. Citraconate inhibits ACOD1 (IRG1) catalysis, reduces interferon responses and oxidative stress, and modulates inflammation and cell metabolism. *Nature Metabolism*. 2022 May 1;4(5):534–46. Interneto prieiga: <https://www.nature.com/articles/s42255-022-00577-x> [žiūrėta 2023-09-26]
- [26] Bambouskova M, Gorvel L, Lampropoulou V, Sergushichev A, Loginicheva E, Johnson K, et al. Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the I $\kappa$ B $\zeta$ –ATF3 inflammatory axis. *Nature*. 2018 Apr 1; 556(7702):501–4. Interneto prieiga: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0052-z> [žiūrėta 2023-09-26]
- [27] Zhao R, Jiang S, Zhang L, Yu Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2019 May 8;44(1).
- [28] Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 2020 Aug;37:101674.
- [29] Immunoresponsive gene 1 augments bactericidal activity of macrophage-lineage cells by regulating  $\beta$ -oxidation-dependent mitochondrial ROS production



- [30] Sohail A, Iqbal AA, Sahini N, Chen F, Tantawy M, Waqas SFH, et al. Itaconate and derivatives reduce interferon responses and inflammation in influenza A virus infection. Dittmann M, editor. PLOS Pathogens. 2022 Jan 13;18(1):e1010219.
- [31] Langston J, Ballard P, Tetrud J, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. Science. 1983 Feb 25;219(4587):979–80. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/219/4587/979> [žiūrēta 2023-10-01]
- [32] Galkin A. Brain Ischemia/Reperfusion Injury and Mitochondrial Complex I Damage. Biochemistry (Moscow). 2019 Nov;84(11):1411–23.
- [33] Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Molecular aspects of medicine. 2009;30(1-2):1–12. Interneto prieiga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2696075/#> [žiūrēta 2023-10-01]
- [34] Niwa T. Protein glutathionylation and oxidative stress. Journal of Chromatography B. 2007 Aug;855(1):59–65.
- [35] Федотчева НИ, Beloborodova N. Influence of Microbial Metabolites and Itaconic Acid Involved in Bacterial Inflammation on the Activity of Mitochondrial Enzymes and the Protective Role of Alkalization. International Journal of Molecular Sciences. 2022 Aug; 23(16):9069–9. Interneto prieiga: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9409289/> [žiūrēta 2023-10-05]
- [36] Yang H, Lundbäck P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, et al. Redox Modification of Cysteine Residues Regulates the Cytokine Activity of High Mobility Group Box-1 (HMGB1). Molecular Medicine. 2011 Nov 7;18(2):250–9.
- [37] Alliegro MC. Effects of Dithiothreitol on Protein Activity Unrelated to Thiol–Disulfide Exchange: For Consideration in the Analysis of Protein Function with Cleland’s Reagent. Analytical Biochemistry. 2000 Jun;282(1):102–6. Interneto prieiga: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10860505/> [žiūrēta 2023-10-24]
- [38] Qiu D, Tan WC. Dithiothreitol has a dose-response effect on cell surface antigen expression. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 1999 May;103(5):873–6.
- [39] Gregor A, Kostrzewska E, Godorowska W. Determination of serum proteins in the presence of dextran by means of the Biuret reaction. Infusionstherapie und Klinische Ernährung - Forschung und Praxis. 1977;4(1):48–50.

[40] White MG, Saleh O, Nonner D, Barrett EF, Moraes CT, Barrett JN. Mitochondrial dysfunction induced by heat stress in cultured rat CNS neurons. *J Neurophysiol.* 2012 Oct 10;108(8):2203.

Interneto prieda: /pmc/articles/PMC3545021/ [žiūrēta 2023-10-25]

[41] Rich PR, Maréchal A. The mitochondrial respiratory chain. *Essays Biochem.* 2010 Jun 14;47:1–23.

[42] Anderson A, Bowman A, Boulton SJ, Manning P, Birch-Machin MA. A role for human mitochondrial complex II in the production of reactive oxygen species in human skin. *Redox Biol.* 2014 Dec 1;2:1016–22. Interneto prieda: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25460738/> [žiūrēta 2023-10-26]

[43] Cordes T, Metallo CM. Itaconate Alters Succinate and Coenzyme A Metabolism via Inhibition of Mitochondrial Complex II and Methylmalonyl-CoA Mutase. *Metabolites.* 2021 Feb 1;11(2):1–14.

Interneto prieda: /pmc/articles/PMC7922098/ [žiūrēta 2023-10-26]

## 7. PRIEDAI



### LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETO BIOETIKOS CENTRAS

---

Medicinos akademija (MA)

Nr. 2023-BEC2-192

Pirmosios pakopos studijų programa - Medicininė ir veterinarinė biochemija

4 k. studentė: Ema Biskytė

Darbo vadovas: Mokslo darbuotojas Danielius Umbrasas

NI Biochemijos laboratorija

#### DĖL PRITARIMO TYRIMUI

LSMU Bioetikos centras, įvertinęs pateiktus dokumentus, moksliniam-tiriamajam darbui tema „Smegenų mitochondrijų elektronų pernašos slopinimo itakono rūgšties dariniais kinetikos tyrimas.“ **P R I T A R I A .**

*dr. Žydrūnė Luneckaitė 2023-09-21 20:18:21*

*1 priedas. Bioetikos leidimas*

## **DARBO RĖMIMO, AUTORIAUS INDĖLIO IR GALIMO INTERESŲ KONFLIKTO DEKLARACIJA**

Ema Biskytė

Smegenų mitochondrijų elektronų pernašos slopinimo itakono rūgšties dariniais kinetikos tyrimas

Kinetic study of the inhibition of brain mitochondrial electron transfer by itaconic acid derivatives

Darbas remiamas Lietuvos Sveikatos Mokslų universiteto Medicinos fakulteto lėšomis

**Patvirtinu, kad darbas atliktas ir parašytas savarankiškai, nepažeidžiant kitiems asmenims priklausančių autorinių teisių.**

Ema Biskytė

Danielius Umbrasas