

Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті

ӘОЖ: 576.311.347

Қолжазба құқығында

ҮСІПБЕК БОТАГӨЗ АБДЫХАНҚЫЗЫ

Митохондрия метаболизмінің өзгерісіндегі тотығу стресінің рөлін зерттеу

6D060700 – Биология

Философия докторы (PhD)

ғылыми дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесші
биология ғылымдарының докторы,
профессор Мурзахметова М.К.

Шетелдік ғылыми кеңесші
PhD, профессор Lopez L.C.
(Испания)

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2022

МАЗМҰНЫ

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР	4
БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	5
КІРІСПЕ	6
1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ	10
1.1 Коэнзим Q ашылуы, құрылысы мен физика-химиялық және биологиялық қасиеттері.....	10
1.2 CoQ биосинтезі жолы.....	12
1.3 H ₂ S жолы мен митохондрия.....	17
1.4 Тотықтырғыш стресс пен митохондриялық дисфункция.....	20
1.5 Тыныс алу тізбегінің кешендері.....	25
1.6 Глутатион (GSH).....	28
1.7 Рациондағы кездесетін күкірт амин қышқылдарының модуляциясы: N-ацетилцистеиннің (NAC) қосылуымен салыстырғандағы күкірт амин қышқылдарының (SAAR) шектелуі.....	32
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	34
2.1 Зерттеу материалдары	34
2.1.1 CoQ жетіспеушілігі және комплекс I жетіспеушілігі бар тышқандар моделі.....	34
2.1.2 Жануарлар мен эксперименталды топтар.....	34
2.2 Зерттеу әдістері	35
2.2.1 ДНҚ экстракциясы арқылы генотипті анықтау әдісі.....	35
2.2.2 Белоктың мөлшерін анықтау әдісі.....	35
2.2.3 Тәжірибе үлгілерін дайындау және оларға Вестерн-блоттинг анализін жүргізу.....	36
2.2.4 Тышқан ұлпаларындағы CoQ ₉ мен CoQ ₁₀ дәрежесінің сандық көрсеткіштерін анықтау.....	36
2.2.5 Нативті электрофорездегі (BNGE) суперкомплексерді анықтау.....	36
2.2.5.1 Тышқан ұлпаларындағы митохондрия фракцияларын (бөліктерінде) нативті электрофорез арқылы бөліп алу.....	36
2.2.5.2 Нативті электрофорезге қажетті тәжірибе үлгілерін даярлау.....	37
2.2.5.3 Денатурацияламайтын электрофорез.....	38
2.2.5.4 Орын алмастыру мен иммунодетекция.....	38
2.2.6 Глутатион концентрациясын анықтау әдісі.....	38
2.2.7 Нәтижелерді статистикалық өңдеу	39

3	ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ ...	40
3.1	CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың фенотиптік сараптамасын анықтау.....	40
3.2	CoQ жетіспеушілігі кезінде сульфидхиноноксиредуктаза (SQOR) деңгейіне құрамында күкірті бар аминқышқылдар сіңімділігінің әсері.....	43
3.3	Цистатионин γ-лиаза (CSE) және цистатионин-β-синтаза (CBS) деңгейіне құрамында күкірті бар аминқышқылдардың әсері.....	46
3.4	Күкіртті амин қышқылдарының глутатион жүйесіне әсері.....	50
3.5	<i>Coq9^{R239X}</i> тышқандарының тіндерінде SAAR және NAC-пен өңдеуден кейінгі CoQ9, CoQ10, DMQ9 деңгейлеріндегі және DMQ9/CoQ9 қатынасындағы айырмашылықтарды анықтау.....	56
3.6	Митохондрия тыныс алу тізбегі кешендерінің қалыптасуы мен тұрақтылығын анықтау.....	60
3.7	Кешен I жетіспеушілігі бар тышқандардың өмір сүру пайызының, фенотиптік көрінісінің сараптамасын және глутатион жүйесін анықтау.....	64
3.8	I кешенінің жетіспеушілігі бар тышқан моделіндегі GPx4 және GRd ақуыз белсенділігі.....	67
4	Зерттеу нәтижелерін талқылау.....	70
	ҚОРЫТЫНДЫ	75
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	77
	ҚОСЫМША А-Оқу процесіне аяқталған ғылыми-зерттеу жұмысын енгізу туралы актісі.....	91

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

Бұл диссертациялық жұмыста келесі стандарттарға сілтемелер жасалды:
МЕМСТ 7.32-2001. Ғылыми-зерттеу жұмысы туралы есеп. Құрылымы және дайындау ережелері.

МЕМСТ 7.1-2003. Библиографиялық жазба. Библиографиялық сипаттама. Жалпы талаптар және құрастыру ережелері.

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

АДФ	- аденозиндифосфат
АТФ	- аденозинтрифосфат
ДНҚ	- дезоксирибонуклеин қышқылы
НАД	- никотинамидадениннуклеотид
ОБФ	- оттегінің белсенді формалары
ФМН	- Флавинмононуклеотид
ФАД	- флавинадениндинуклеотид
ЭТТ	- электрондарды тасымалдау тізбегі
ЭТФ	- электронды тасымалдағыш флавопротеин
ADCK4	- (AarF Domain Containing Kinase-4) киназа-4 бар AarF домені
AdoMet	- (adenosylmethionine) аденозилметионин
BNGE	- (Blue native gel electrophoresis) нативті көк гельді электрофорез
EDTA	- (Ethylenediaminetetraacetic acid) этилендиаминотетраацетат қышқылы
BSA	- (Bovine serum albumin) бұқа сарысу альбумині
CoQ	- (Coenzyme Q) коэнзим Q немесе кофермент Q
CoQH2	- (Ubiquinol COX: Cytochrome oxidase) убихинол циклооксигеназа: цитохромоксидаза
DMQ	- (Demethoxyubiquinone) диметоксиубихинон
GS- / GSH	- (Glutathione) тотықсызданған глутатион
GSS- /GSSG	- (Glutathione Persulfide) тотыққан глутатион
H ₂ S	- (Hydrogen Sulfide) күкіртті сутек, сутек сульфиді
HPLC	- (High resolution liquid chromatography) жоғары эффективті сұйық хроматография
EQ	- (electrochemical detector) электрохимиялық детектор
PBS	- (Phosphate Buffer Saline) фосфатты-тұзды буфер
PHB	- (polyprenyl diphosphate transferase) полипренилдифосфат трансфераза
SC	- (Supercomplex) суперкешендер
SDH	- (Succinate dehydrogenase) сукцинатдегидрогеназа
SDO	- (Persulfide dioxygenase) персульфиддиоксигеназа
SO	- (Sulfite oxidase) сульфитоксидаза
SO ₃ ⁻²	- сульфит
SO ₄ ⁻²	- сульфат
SQOR	- (Sulfur: quinone oxidoreductase) сульфид: хинон оксидоредуктаза
TNF-α	- (Tumor necrosis factor-alpha) ісік некрозының факторы
3MST	- (3-mercaptopyruvate sulfotransferase) 3-меркаптопируват сульфотрансфераза

КІРІСПЕ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы. Жұмыс митохондрия метаболизмі өзгерісіндегі тотығу стресінің рөлін зерттеуге арналған. Соның ішінде сульфидтік метаболизм жолы мен CoQ биосинтезінің өзгерісі.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Барлық аэробты организмдердің тіршілігі үшін оттегі қажет. Ұлпалар тұтынатын оттегінің шамамен 5%-ы бос радикалдарға айналады. Оттегінің белсенді формалары, яғни бос радикал ретінде жасушада үнемі өндіріліп отырады, бірақ олардың деңгейі төмен болғандықтан жасуша оларды антиоксидантты жүйенің көмегімен белсенділігін тежейді [1-3]. Бірақ, бос радикалды тотығу қарқындылығының жоғарылауынан түрлі факторлардың патогенді әсеріне алып келеді. Нәтижесінде жасушалардың биохимиясы бұзылып, тотығу стресі пайда болады. Оттегінің белсенді формалары органдар мен ұлпаларға әр түрлі дәрежеде әсер етеді және тотығу стресс процесінде әр түрлі тұрақтылықты көрсетеді.

Бос радикалдардың көбеюі АТФ деңгейінің төмендеуіне және жасушалардың энергия тапшылығына әкеледі. Нәтижесінде митохондрияның тыныс алу тізбегіндегі кешендердің, онда жүретін бірқатар биосинтез процестері бұзылады [4-7]. Сонымен бірге митохондриялық дисфункция және ұлпаларда митохондриялық мутациялардың жинақталуы қартаю үдерісіне және нейродегенерациямен сипатталатын бірқатар аурулардың патогенезіне алып келеді. Соның бір процесі сутек сульфиді метаболизм жолы мен CoQ биосинтезі болып табылады. CoQ биосинтезінің негізгі элементінің бірі коэнзим Q10. Ол - митохондриялық тыныс алу тізбегінің құрамдас бөлігі. Коэнзим Q10 биосинтезінің бұзылуы бірқатар митохондриялық ауруларға әкелуі мүмкін. Митохондриялық аурулар - митохондриялар мен ұлпалардың тыныс алуының құрылымы мен қызметінің бұзылуынан туындаған тұқым қуалайтын аурулардың және патологиялық жағдайлардың күрделі гетерогенді тобы. Соның ішінде белгілі аурулардың бірі - Лей синдромы [8-10]. Коэнзим Q10 тапшылығы кезінде күкіртті сутек метаболизм шешуші рөл атқарады. Сүтқоректілер клеткаларындағы сульфидтер алмасуына транссульфурация (биосинтетикалық) және күкіртті сутек (H_2S) тотығу (катаболикалық) жолдары жатады. H_2S тотығуының бұзылуы коэнзим Q жетіспеушілігінде тотығу стресіне ықпал етуі мүмкін немесе Q коферменті тапшылығында ұлпалардың ерекшелігінің патогенезінде тотығу стресімен синергетикалық рөл атқаруы мүмкін.

Клеткадағы оттектің белсенді түрлері әсерінен туындайтын жағымсыз өзгерістерді бейтараптайтын қорғаныстық жүйе компоненті глутатион болып табылады. Глутатион клетка тіршілігі үшін маңызы зор. Митохондриядағы оттектің белсенді формаларының деңгейінің модуляциясы арқылы глутатион жасушаның бұзылу процесіне әсер етуі мүмкін. Митохондрияда глутатион деңгейінің азаюы немесе жойылуы оттегінің белсенді формаларының және белсенді азот деңгейінің жоғарылауына, осы органеллалардың дисфункциясына әкеледі, бұл жасуша өлімі процесінің апоптоздан некрозға ауысуына әкелуі мүмкін [11-13].

Осындай процестердің митохондрия метаболизміне әсері бірқатар аурулармен жетіспеушіліктерді тудырады. Қазіргі таңда алдын алу мақсатында көптеген клиникаға дейінгі емдеу алды терапиялық жолдар қолданылуда [14-16]. Оның бірі зерттелініп отырған нысанның бір органына оң әсерін берсе, келесі органына оң әсерін бермеуі мүмкін. Тотығу стресі нәтижесінде туындайтын митохондрия метаболизмі дисфункциясы нәтижесінде көптеген митохондриялық аурулардың пайда болуы және оның емінің болмауы дүниежүзін толғандырып отыр.

Зерттеудің мақсаты. CoQ жетіспеушілігі бар тышқан топтарының рациондарына күкіртті амин қышқылдардың мөлшеріне диеталық шектеулер қоюмен немесе N-ацетил-L-цистеинді қолданып өңдеу жүргізу арқылы сульфидтік метаболизм жолындағы өзгерістерді анықтау және Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан топтарының глутатион жүйесінің артуын бағалау.

Мақсатқа жету үшін келесідей негізгі **міндеттер** қойылды:

1. CoQ жетіспеушілігі бар тышқан топтарының рациондарына күкіртті амин қышқылдардың мөлшеріне диеталық шектеулер қоюмен немесе *N-ацетил-L-цистеинді* қолданып өңдеу жүргізу арқылы өмір сүрудің пайыздық көрсеткіштерін айқындау.

2. Мидың митохондрия фракциялары мен бүйрек, бұлшықет ұлпаларындағы сутекті сульфидтік метаболизм жолының алғашқы ферменті - сульфидхинон оксиредуктаза (SQOR) деңгейінің өзгеруіне, цистатионин γ -лиаза (CSE) деңгейіне және цистатионин- β -синтаза (CBS) деңгейіне баға беру.

3. Жалпы глутатион өзгерісін, соның ішінде глутатион ферменттерінің (GPx және GRd) деңгейін анықтау.

4. Ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларындағы SAAR және NAC-пен өңдеуден кейінгі CoQ9, CoQ10, DMQ9 деңгейлеріндегі және DMQ9/CoQ9 қатынасындағы айырмашылықтарын салыстыру және митохондрия тыныс алу тізбегі кешендерінің қалыптасуы мен тұрақтылығын бағалау.

5. Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан топтарының өмір сүрудің пайыздық көрсеткіштеріне баға беру және жалпы глутатион жүйесін, оның ішінде ферменттер (GPx және GRd) деңгейін анықтау.

Зерттеу материалдары. CoQ жетіспеушілігі және Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан модельдері қолданылды.

Зерттеу әдістері. Жануарлардың тәжірибелік үлгісін алу, Вестерн-блоттинг анализі, кері фазалық жоғары эффективті сұйық хроматография, Нативті электрофорез әдісі, флуоресцентті спектроскопия (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA), спектрофотометрия (NanoDrop), статистикалық талдау әдістері (GraphPad Prism) пайдаланылды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Тұңғыш рет *in vivo* жағдайында клиникаға дейінгі терапия мақсатта CoQ жетіспеушілігі бар тышқан моделінің рационна күкіртті амин қышқылдардың мөлшеріне диеталық шектеулер қоюмен немесе N-ацетил-L-цистеинмен өңдеу арқылы зерттеу жүргізілді. CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың ұлпаларына кейбір жағдайда әсері бірдей болмайтындығы белгілі болды. Олардың тиімді мөлшерлері мен қолдану уақыты анықталды. Алынған мәліметтер негізінде терапиялық жолды жасау мақсатында зерттеулер

жүргізілді. In vivo жағдайында жасалған күкіртті амин қышқылдардың мөлшеріне диеталық шектеулер қоюмен немесе N-ацетил-L-цистеинмен өңдеу арқылы сульфидті метаболизм жолының бірінші ферменті SQOR деңгейінің бұлшықет ұлпаларында жоғарылауы, ал бүйрек ұлпаларында N-ацетил-L-цистеинмен өңдеу нәтижесінде жоғарылағандығын байқалды. Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан моделінің ми ұлпаларында *Ndufs4^{+/+}* бақылау тышқан топтарына қарағанда SQOR деңгейі жоғарылауы алғашқы рет көрсетілді және жалпы глутатион деңгейінің және GSSG/GSH қатынасының жоғарылауы анықталды.

Жұмыстың теориялық маңызы. Диссертациялық жұмыстың нәтижелері, әсіресе, соның ішінде алғаш рет CoQ жетіспеушілігі бар тышқан топтарына тәжірибе жүргізу кезінде тамақтану рациондарына күкіртті амин қышқылдардың (SAAR) мөлшеріне және N-ацетил-L-цистеинмен (NAC) диеталық шектеулер ми, бүйрек, бұлшықет ұлпаларына әсері анықталды, ал кешен I жетіспеушілігі бар тышқан топтарына жасалған тәжірибелер глутатион жүйесінің арта түскендігін көрсетті. Алынған зерттеу нәтижелері қолданылған өңдеулерге сараптама жүргізуге бірден-бір мүмкіншілік береді және осы мәселелерге арналған ізденістердің теориялық негізін толықтыра түсті.

Жұмыстың практикалық құндылығы. Алынған мәліметтер негізінде CoQ жетіспеушілігі бар тышқандарды емдеудің және кешен I жетіспеушілігі бар тышқандардың алдын алудың жолдарын қалыптастыру. Зерттеулер барысында тышқандардың тамақтану рациондарына күкіртті амин қышқылдардың (SAAR) мөлшерін және N-ацетил-L-цистеинмен (NAC) диеталық шектеулермен өңдеу жасау *Coq9^{R239X}* тәжірибелі топ тышқандарына қосымша да, дербес те емдік шара ретінде қолдануға болатын жаңа терапиялық емдеудің негізі болуға лайық.

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар:

1. CoQ жетіспеушілігі бар тышқан топтарының рациондарына диеталық шектеулермен өңдеу жүргізу арқылы өмір сүрудің пайыздық көрсеткіштері айқындалды.

2. Күкіртті амин қышқылдардың мөлшеріне диеталық шектеулермен өңделген *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқан ми ұлпаларында, N-ацетил-L-цистеинмен өңдеу кезінде бүйрек ұлпаларында, SAAR мен NAC өңдеулерінде бұлшықет ұлпаларында SQOR деңгейі жоғарылауы көрсетілді.

3. Тәжірибелі тышқан топтарын SAAR мен NAC өңдеулерінен кейін цистатионин γ -лиаза (CSE) және цистатионин- β -синтаза (CBS) деңгейі ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларына әртүрлі әсері бар екені көрсетілді.

4. Тышқан топтарының рациондарына күкіртті амин қышқылдардың мөлшеріне диеталық шектеулер қоюмен немесе N-ацетил-L-цистеинді қолданып өңдеу жүргізу арқылы мидың митохондрия фракцияларындағы және бүйрек, бұлшықет ұлпаларындағы жалпы глутатион өзгерісін, соның ішінде глутатион ферменттерінің (GPx және GRd) деңгейі анықталды.

5. Ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларындағы CoQ9, CoQ10, DMQ9 деңгейлерінде, DMQ9/CoQ9 қатынасындағы айырмашылықтары және митохондрия тыныс алу тізбегі I, II, III, IV кешендерінің, суперкешеннің (SC)

қалыптасу көрсеткіштері бүйрек митохондрия фракцияларында SAAR және NAC-пен өңдеуден кейін әртүрлі әсері бар екені анықталды.

6. Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан топтарының өмір сүрудің пайыздық көрсеткіштеріне баға берілді және жалпы глутатион жүйесін, оның ішінде ферменттер деңгейінің ерекшеліктері анықталды.

Қорғауға ұсынылатын ғылыми жұмыс нәтижелерінің жинақталуына диссертанттың жеке үлесі. Зерттеу жұмысының әдебиет көздеріне шолу жасау, қойылған мақсат пен міндеттерді анықтап, сонымен қоса тәжірибелік жұмыстардың орындалуы мен мәліметтердің жинақталуында статистикалық талдау және өңдеу автордың жеке қатысуымен жүргізілді.

Жұмыстың ғылыми зерттеу бағдарламасымен байланыстылығы. Бұл жұмыс митохондрия метаболизміндегі тотығу стресінің өзгерісін зерттеуге бағытталды. Гранада университеті, Биомедицина зерттеу орталығының молекулалық биология зертханасының жобасымен жасалды (ғылыми жобаның жетекшісі Гранада Университетінің профессоры Л.К. Лопес). Сонымен қатар әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің Биофизика, биомедицина және нейроғылым кафедрасының зертханасында орындалды.

Жұмыстың апробациясы

Диссертациялық жұмыстың негізгі қойылған қағидалары мен зерттеу нәтижелері төмендегідей халықаралық, республикалық ғылыми конференцияларда баяндалды және талқыланды:

- Халықаралық Фараби оқулары «Фараби әлемі» атты студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2019 ж, Алматы);

- Халықаралық ғылыми конференция «I CONGRESS OF RESEARCHERS FROM THE PTS» (2019, Гранада, Испания);

- Халықаралық Фараби оқулары «Фараби әлемі» атты студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2020 ж, Алматы).

- Халықаралық Фараби оқулары «Фараби әлемі» атты студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференциясы (2022 ж, Алматы).

Басылымдар. Диссертациялық жұмысының негізгі нәтижелері 9 ғылыми басылымдарда, оның *Web of Science* және *Scopus* базасындағы журналдарда 1 мақала, ҚР Білім және ғылым саласындағы бақылау Комитеті ұсынған ғылыми басылымдарда 3 мақала, Халықаралық және республикалық конференция материалдарында 5 тезис жарық көрді.

Диссертацияның құрылымы. Диссертация 92 беттен, нормативтік сілтемелерден және белгілеулер мен қысқартулардан, кіріспе, әдебиеттік шолудан және материалдармен әдістерден, зерттеу нәтижелері мен қорытынды, 211 пайдаланған дереккөздер мен 38 суреттен тұрады.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Коэнзим Q ашылуы, құрылысы мен физика-химиялық және биологиялық қасиеттері

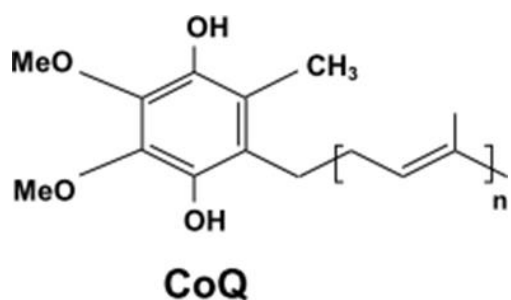
Коэнзим Q (CoQ) алғаш рет 1955 жылы Festenstein және бірлескен авторлармен, ал 1957 жылы Frederick Loring Crane және бірлескен авторлармен сиыр жүрегінің митохондриясының липидті экстракттарынан бөлініп алынып, сипатталған болатын. Осылайша CoQ митохондрия тыныс алу тізбегінің негізгі компоненті болып анықталды.

1958 жылы Wolf және бірлескен авторлары оның күрделі құрылысын анықтады. CoQ – өзгеше липид деп шешілуінің себебі, ондағы бензохинонды шеңбер шеткі изопреноидты ұзын шеңберімен байланысып, биологиялық мембранада арнайы орналастыруды талап етеді. Бұл уақыттарда берілген липидтің тек митохондриялық тыныс алу тізбегіндегі тотығу-тотықсыздану қызметі ғана зерттелген. Ал, оның антиоксиданттық қызметі тек соңғы 15 жыл аралығында зерттеліп келеді. Бастапқы уақытта CoQ синтезі мен таралу концепциясы тек митохондрияның ішкі мембранасына ғана тән болды. Бұл кезеңде алғашқы танымал қызметі ретінде митохондриялық электрондарды электрондардың I және II кешендерінен III-ші кешенге тасымалдау болып саналды [17-19].

1958 жылы Карл Фолкерс пен ұжымдастары оның химиялық құрылысы жөнінде алғашқы хабарын берген болатын. 1970 жылдың басында Джан Паоло Литтарру мен Карл Фолкерс қан сарысуындағы CoQ₁₀ дефициті тікелей адамның жүрек ауруларына байланысты деп пайымдайды [20-22]. Ал 1989 жылы Огасахара және бірлескен авторлары [23] алғаш рет митохондрия энцефалопатиясы бар аурудың бұлшық еттеріндегі CoQ₁₀ дефициті тіркелгенін айқындайды. Дегенімен де бұл уақытта молекулалық деңгейдегі себептер қарастырылмаған, нәтижесінде CoQ биосинтездейтін гендегі мутацияның алғашқы екі жағдайы тек 17 жылдан кейін ғана анықталған [24, 25].

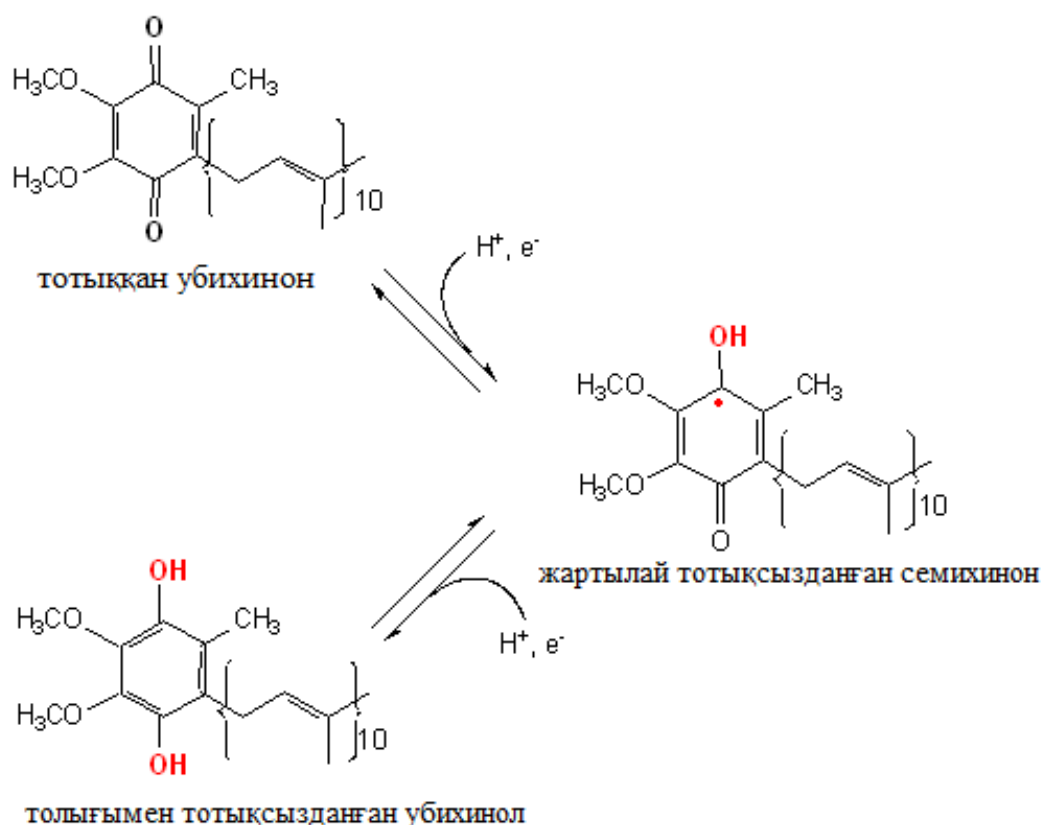
1980 жылдары таза CoQ₁₀ мөлшерінің еш кедергісіз алынуы және плазма мен қандағы CoQ₁₀ концентрациясын өлшеу әдістерінің қолжетімді болуы, клиникалық тәжірибелер санының артуына септігін тигізеді. Клеткалық қуатты өндіру мен антиоксиданттық қорғаныстағы CoQ-нің тотығу-тотықсыздану қызметі оның убихинол (тотықсызданған CoQ) мен убихинонның (тотыққан CoQ) арасындағы тотығу-тотықсыздану айналымындағы екі электронды алмастыру қабілетіне негізделген [26].

Химиялық табиғаты бойынша CoQ, E және K витаминдерінің молекулалық құрылысына ұқсас келеді. CoQ қатары 2,3-метокси-5-метил-6-полипренилбензохиноннан тұрады, мұнда шеткі тізбектерде 1–12 изопреноидты бірліктері болады (сурет 1) [27].



Сурет 1 - CoQ химиялық құрылысы

Убихинонның шеткі тізбектеріндегі изопрен қалдықтарының саны әр ағзаға сай 6-дан 10-ға дейін түрленіп кездеседі. CoQ-нің мұндай нұсқалары CoQ₆, CoQ₇ және тағы сондай секілді болып белгіленеді. *Saccharomyces cerevisiae* клеткаларында CoQ₆, *Escherichia coli* - CoQ₈, кеміргіштерде - CoQ₉ болады. Адамды қоса айтқандағы сүтқоректілердің көпшілігінің клетка митохондриясында убихинон әдетте изопреннің 10 бірлігімен болады, бірақ CoQ₉ да кездесіп тұрады. CoQ – дәмсіз және иіссіз сары-қызғылт сары кристаллдар. Еру температурасы 49-51°C. Диэтил эфирде жақсы ериді, этанолда аз ерісе, ал суда тіпті ерімейді [28].



Сурет 2 – Убихинонды екі жеке электрон саты бойынша семихинонның жартылай тотықсызданған радикалының көмегімен, екі электронды тотығу-тотықсыздану реакциясына ұшыратады

Тиесілі ұлпаға байланысты CoQ үлесі кішірейтілген қалыпта (убихинол, QH₂) кездеседі, бұл оның антиоксидант ретіндегі аса жоғары әсерін көрсетеді. Убихинол липидті радикалдарды бейтараптандырады, мұнда ол өзінің 1 сутек атомын беріп, бос радикалды семихинонға айналады, ал содан кейін ол қайтадан дем алу тізбегінің Q циклі бойында бос емес радикалды жағдайына қалыпқа келеді (сурет 2) [29].

1.2 CoQ биосинтез жолы

CoQ биосинтезі адам ұлпасының көпшілігінде және жасуша түрлерінде өтеді. Оның негізгі төрт кезеңі бар (сурет 3):

- Бензохинон құрылымын қалыптастыру (фенилаланин немесе тирозин қолдана отырып);
- Изопреннің бүйірлік тізбегін құру (ацетил-CoA қолдана отырып);
- Жоғарыда аталған екі құрылымды байланыстыру немесе біріктіру;
- Метильдеу, декарбоксылдеу және гидроксылдеу реакциялары арқылы генерацияланатын құрылымдарды модификациялау.

Алғашқы екі реакция митохондрияда, эндоплазмалық тор мен пероксисомаларда орын алады. Бұл жануарлар жасушаларында синтездің көптеген жерлерін көрсетеді [29].

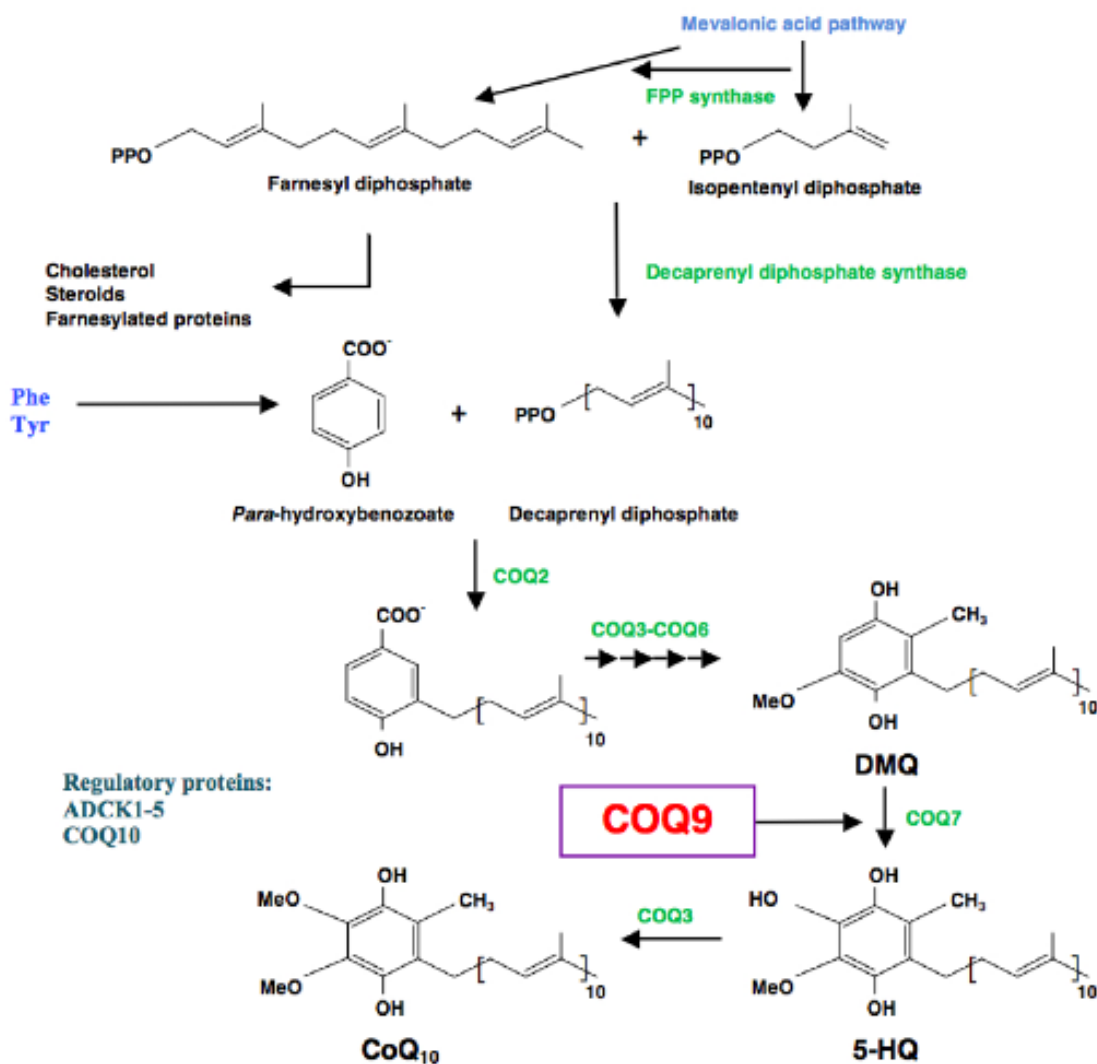
Гидроксылдеу кезеңдерінің бірі өзінің тұрақтылығы мен қалыпты қызмет етуі үшін COQ7, өзге ақуызды қажет ететін гидроксилаза, COQ9 арқылы катализденеді [30-32].

CoQ биосинтезіне ерекше қатысатын белгілі гендер келесідей: PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ3, COQ4, COQ5, COQ6, COQ7, COQ8A (ADCK3), COQ8B (ADCK4) және COQ9 (сурет 3) [33].

COQ1 немесе ұзын тізбекті транс-полипренилдифосфат-синтаза [34] COQ1 гені арқылы кодталады [35]. Фермент әртүрлі түрлердегі нақты ұзындыққа жауап беретін полиизопренидті тізбектің қалыптасуын жылдамдатады [36]. *Schizosaccharomyces pombe*-де, тышқандар мен адамдарда COQ1 екі кіші бірліктен PDSS1 және PDSS2 тұратын гетеротретмер болып табылады [37, 38]. *S. cerevisiae*-тегі субхондриальды фракциялауды пайдалана отырып жасаған зерттеулер COQ1 матрица жағындағы ішкі митохондрияльды мембранамен перифериялық жолмен байланысты екендігін көрсетті [39].

COQ2 немесе PNB: полипренилдифосфаттрансфераза, *S. cerevisiae* көрсетілген, изопреноидты тізбекпен PNB конденсациясын катализдейді. Генетикалық және биохимиялық талдаулар PNB (UbiA/Coq2) кең субстрат ерекшелігіне ие екенін көрсетеді. Бұл ақуыз матрицаның бүйіріндегі ішкі митохондриялық мембранамен байланысады және өзін тұтас мембраналық белок сияқты әрекет етеді.

S. cerevisiae арқылы көрініс табатын полипренил дифосфаты трансферазаның (PNB): COQ2 немесе изопреноидты тізбекпен PNB конденсациясын катализдейді. Генетикалық та, биохимиялық та сараптамалар PNB (UbiA/Coq2) көптеген субстратты ерекшеліктерге ие екендігін көрсетеді [40, 41]. Бұл ақуыз матрица жағындағы ішкі митохондрияльды мембранамен байланысты және өзін тұтас мембраналық ақуыз ретінде көрсетеді.



Сурет 3 – CoQ биосинтез жолының құрылымы [31]

COQ3 - CoQ биосинтез жолындағы екі О-метильдеу кезеңін катализдейді. COQ3 гомологтары арқылы кодталатын ақуыздардың аминқышқылдық ретілігі метиль доноры ретінде S-adenosylmethionine пайдаланатын метилтрансферазаның ферменттерінің үлкен тобына тұрақты болатын төрт аймақтан тұрады [42]. Кіші жасушалық фракциялануды зерттеулер перифериялық ақуыздың ішкі мембраналық матрицамен байланысты екендігін көрсетеді [43].

COQ4 құрамында 335 аминқышқылы бар полипептидті кодтайды. Арнайы антисарысу арқылы жүргізілген Вестерн-блоттинг сараптамасы арқылы COQ4 митохондриялды ішкі мембрана матрицасының сол қапталымен перифериялық түрде байланысатындығы анықталды. Q биосинтез жолының өзге компонентін, COQ7 тұрақты деңгейін сақтап тұру үшін COQ4 бар болуы қажет болса да, оның функциясы белгісіз [44].

COQ5 немесе 2-метокси-6-полипренил-1,4-бензохионды метилтрансфераза COQ биосинтезіне қатысатын жалғыз С-метильдендіруді катализациялайды. Сондай-ақ, COQ5 - CoQ-synthome деп аталатын мульти-кіші

бірлікті кешенге жинақталыны көрінді. COQ5 полипептиді матрица жағындағы митохондриялы ішкі мембранамен байланысты [45].

COQ6 ақуызы COQ6 гені арқылы кодталған. Синтездену барысында мембрананың әлеуетіне тәуелді болатын митохондрияға енеді және матрица жағындағы ішкі митохондриялы мембрананың жанына перифериялы түрде орналасады [46].

Монооксигеназ ретінде сипатталатын COQ7 - CoQ биосинтезінің соңыдан бұрынғы кезеңіне қатысады. Бұл ақуыз ішкі митохондриялы мембранаға фазааралық жолмен орналасады және DMQ –нің 5-гидроксихинонына дейін катализациялайды [47].

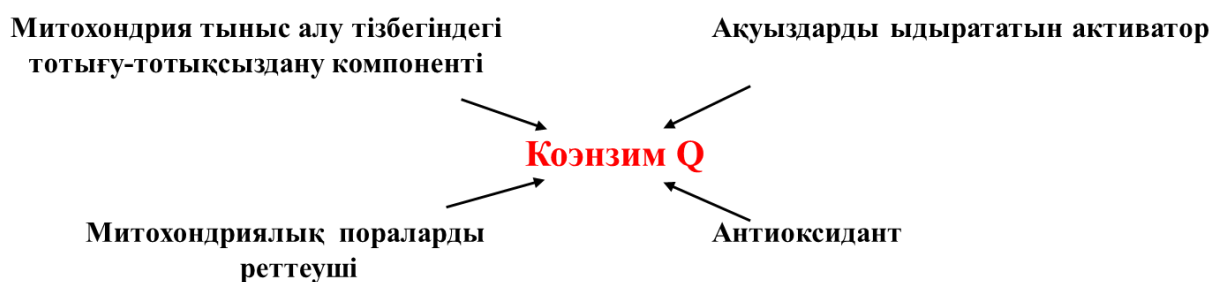
COQ8-нің ADCK3 немесе COQ8 биохимиялық белсенділігі және оның CoQ биосинтезіндегі тікелей рөлі COQ8 функциясының белгілі эндогенді реттеуіштерінің және оны зерттеуге арналған тиімді шағын молекулаларының болмауына байланысты әлі айқын емес [48]. Сәйкесінше, COQ8 – CoQ биосинтезінің мультиақуызды кешенін қалыптастырудың іргетасы болып табылады [49].

COQ9 сүтқоректілердің алғашқы трансферрин рецепторының құрылымдық гомологы болып табылады және оның липидтерді байланыстыру қабілеті мен COQ7-мен байланысы CoQ биосинтезін жүзеге асырудың басты сипаттамасы болып табылады.

ADCK4 (Киназа-4-тен тұратын AarF домен) CoQ10 биосинтезінің компоненттерімен өзара әрекеттеседі. Адамның подоциттерінде, ADCK4 - COQ6 және COQ7 қоса алғанда, CoQ10 биосинтезінің компоненттерімен өзара әрекетке түсті [50].

Клиникаға дейінгі емдеу алды зерттеулердің көпшілігі Q (CoQ) коэнзим немесе убихинонның баламалары қабыну, ісік барысында және зат алмасу бұзылған жағдайда терапевттік әсерге ие екендігін көрсетті. CoQ – бактериядан бастап сүтқоректілерге дейінгі көптеген аэробты ағзалардың митохондрияның ішкі мембранасында орналасқан липофильді молекула болып табылады. CoQ изопреноидті тізбекпен байланысқан тотықтырғыш-қалпына келтіргіш бензохинонды сақинадан тұрады. CoQ әртүрлі баламалары тотықтырғыш немесе тотықсыздандырғыш қасиеттерге ие екендігін көрсетті [51].

Митохондрияның ішкі мембранасында CoQ төрт әртүрлі функцияны атқарады: тотығу-тотықсыздандырғыш тасымалдаушы, ақуыздарды ыдырататын активатор, реттеуіш және антиоксидант (сурет 4).



Сурет 4 – Коэнзим Q қызметтері

Бұл функциялардың барлығы оның ерекше биохимиялық қасиетіне байланысты. CoQ химиялық құрылысында ұзын полиизопреноидты липид құйрығы кездеседі, сондықтан ол гидрофобты молекула болып есептеледі (сурет 5A). Бұл құйрық белсенді тотығу-тотықсыздану қабілеті бар хинонды топтармен шектелген (сурет 5B). CoQ митохондриялық өткізгіш пораларын, митохондриялық ажыратушы протеиндердің, уридин биосинтезі, май қышқылының тотығуы және тотығу арқылы фосфорлану процесстеріне қатысып, реттеп отырады. Кеңірек айтқанда, CoQ липофильді антиоксидант пен мембраналық тұрақтандырушы қызметін атқарады [52-54, 58].

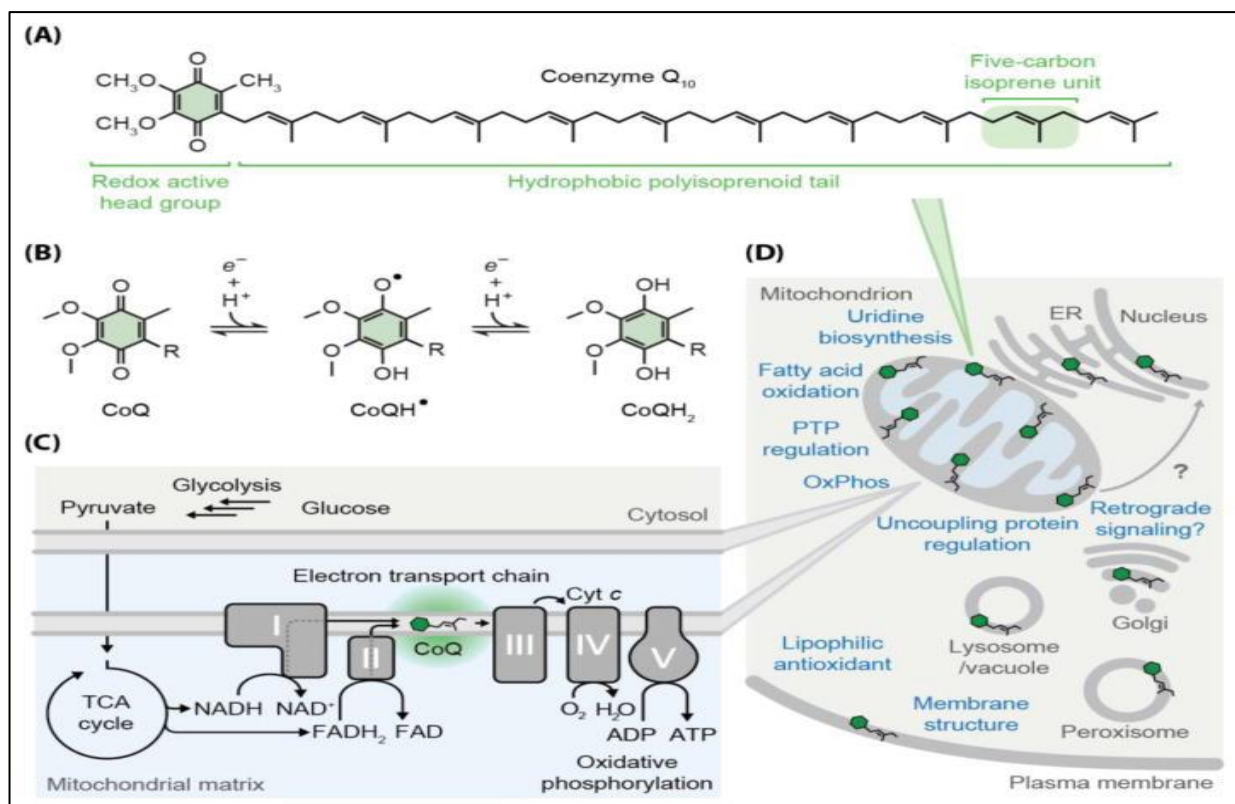
CoQ тотығу-тотықсыздану белсенділігі оның көптеген ферменттерге кофактор ретінде қызмет етуіне жол береді, соның ішіне митохондриялық электрондарды тасымалдау тізбегінің ферменттерін де қосып айтуға болады (сурет 5C). Электрондарды тасымалдау тізбегінде CoQ тотығу арқылы фосфорланудан электрондарды I және II кешендерінен III-ші кешенге береді. CoQ тотығу-тотықсыздану химиясы CoQ биосинтезінің бір бөлігі болатын протондарды да қамтиды (сурет 5B).

Тотығу арқылы фосфорланудағы CoQ-нің жетекші рөліне қоса, оның басқа да маңызын атап өтуге тура келеді, мысалы CoQ клеткалық маңызды қызметтері (сурет 5D) – флавопротеин-убихинон-оксидоредуктазаның электрондарын β -тотығу арқылы белсенді тасымалдануы, содан кейін глицерол-3-фосфат дегидрогеназа арқылы тотықсыздану эквиваленттерінің орын алмастыруы, дигидрооротат-дегидрогеназаның белсенділігінің арқасындағы пиримидиндердің түзілуі, холин дегидрогеназа белсенділігінің арқасындағы глицин метаболизмі, пролин дегидрогеназасы белсенділігі арқасындағы аргинин мен пролиннің метаболизмі, хиноноксидоредуктаза сульфидінің белсенділігінен сульфидті алмасу жүзеге асады [55-57, 58].

Бұдан басқа, тіпті барлық эукариоттардың клетка мембранасында кездесетін CoQ-нің митохондриядан тыс қызметтерінің саны күннен күнге артуда. Мысалы, CoQ адам плазмасының липопротеиндерінде және ашытқыларда липофильді антиоксидант қызметін атқарса, тағы мембраналық тұрақтандырушы ретінде де бола алады [59].

Убихинон дефициті нәтижесінде туындайтын бірқатар аурулардың кездесуі, оның шығу тегінің әртүрлі екендігін нақтырақ дәлелденген бірнеше

мысалдар бар. Оның бірі семіздік, энцефалопатия, макроцефалия, энцефаломиопатия және тағы басқалары.



Сурет 5 – Коэнзим Q химиялық және биологиялық функциялары [58]

(A) CoQ₁₀ химиялық құрылысы. (B) CoQ тотығу-тотықсыздану реакциясы. “R” полиизопреноидты құйрықты белгілейді. (C) Электрон тасымалдау тізбегіндегі митохондриялық тотығу фосфорлануындағы CoQ ролі: кешен I–V; Cyt c, цитохром c; ҰКҚ (үшқарбон қышқылының айналымы). (D) CoQ жасушадағы қызметіне жалпы шолу.

Бұл зерттеулердің маңызы балаларда, убихинонның бастапқы сипаттағы жетіспеушілігі дәлелденген - COQ2 және PDSS1, PDSS2 гендердің мутациясы анықталған [60, 61].

Ауыр сәбилік формадағы мультижүйелік ауруға шалдыққан 5 балаға молекулярлы-генетикалық зерттеулер жүргізу барысында, 4 балада COQ2 генінің, ал 1 балада COQ9 генінің мутациясы анықталды.

Осылайша, митохондриялық аурулардың клиникалық нұсқалары кезінде, коэнзим Q10 жетіспеушілігі мен электрон-транспорттық кешен белсенділігінің төмендеуімен көрініс беретін убихинонның биосинтезіне және тыныс алу тізбегіне қатысатын гендердің мутациясы дәлелденген [62-66].

Бұл деректер көрсетілген фенотипте коэнзим Q10 дефицитінің бастапқы сипатын дәлелдейді. Алайда бірінші суреттелген балалардың клиникалық фенотипінің миоглобинурия мен митохондриялық энцефалопатиясы гендік дефектісі туралы ақпараттар жоқ. Осы арада басқа да тұқым қуалайтын патологиялық формадағы науқастарды зерттеу нәтижелері, оларда убихинонның қайталама дефицитінің лабораториялық белгілері дәлелденді.

Убихинон мен коэнзим Q10 бастапқы дефицитімен байланысты емес митохондриялық ауруларды емдеу барысы (қайталама сипаттағы жетіспеушілікке қарамастан) тыныс алу тізбегіне электрондарды тасымалдауында және антиоксидантты қызметте маңызды рөлді атқарады. Аталмыш препараттың тағайындалуы митохондрияның тыныс алу тізбегінің активтілігі жоғарылауы көрсетілген [67-71].

Балалық шақта бейімделген доза тәулігіне 4,5 мг/кг. Препаратты ұзақ уақыт қабылдау барысында балалардың жалпы жағдайы тұрақталды, (инсульт тәріздес эпизодтардың және т.б.), аурудың одан әрі өршу қаупі төмендеген, қандағы лактат пен пируваттың көрсеткіші жақсарды. Егерде науқастың бұлшық ет ұлпа құрамында убихинның деңгейі төмен болған жағдайда, емдеудің әсер ету нәтижесі жоғары болады деген ақпараттар бар [72].

Коэнзим Q10 биосинтезінің бастапқы дефектімен сипатталған митохондриялық аурулар кезінде, терапиялық жұмыстардың жақсы нәтижесі алынған. Емдеудің жоғарғы оң әсері миоглобинуриялы митохондриялық энцефаломиопатияны, макроцефалия және семіздікпен көрініс беретін мультижүйелік ауруларды, мишық атаксиясын емдеу нәтижесінде байқалған [73].

Соңғы жылдардың зерттеу жұмыстары нәтижесінде митохондриялық патологиялар тобына жататын басқа да аурулар анықталған, ол аурулардың басты себебі, коэнзим Q10 биосинтезінің тұқым қуалаушылық бұзылуы, ал коэнзим Q10 өз кезегінде митохондрияның тыныс алу тізбегінің маңызды компоненті болып табылады. Аталмыш аурулардың лабораториялық маркері бұлшық ет ұлпасында, фибробластарда, қандағы перифериялық монопнуклеарларында убихинонның құрамы төмен болуы болып табылады.

Бірнеше аурулар, әсіресе фенилкетонурия кезінде убихинон қайталама жетіспеушілігінің анықталуы, медициналық нәтижелерді жақсарту мақсатында емдеу шараларына түзетуді қажет етеді [74].

1.3 Митохондрия мен H₂S жолы

Митохондрия – екі қабатты мембраналы өздігінен репликацияланатын геномы бар цитоплазмалық органелла. Митохондрия метаболизм гомеостазына қажетті аса маңызды биохимиялық қызметті атқарады да, клетка өлімі мен өміршеңдігіне әсерін тигізеді. Эукариоттарда митохондрия қоректік заттарды тотықтандыру метаболизмінің нәтижесінде АТФ күйіндегі қуат көзі түзіледі. Бұл процесс басты екі сатыдан тұрады, олар: 1) гликолиз нәтижесінде түзілетін NADH немесе FADH тотығуы, әлде май қышқылдарының β-тотығуы; 2) тотығу арқылы фосфорланудың нәтижесіндегі АТФ түзілісі. Барлық бұл процесстер митохондриядағы транскрипциялық факторлардың жиынтығымен реттеліп отырады. Әрбір митохондрияда 800-ден 1000-ға дейін митохондриялық ДНҚ көшірмелері болады. Олар аналық жол бойынша тұқым қуалап, бірыңғай нуклеопротеиндерден құралған нуклеоидтарға айналған [75]. Нуклеоидтер митохондриялық матрикте біртекті таралғанына қарамастан, олар кристаларға жақын орналасады. Митохондрияның ішкі және сыртқы мембраналарының

арасында өте кішкентай мембрана аралық қуыс болады. Сыртқы митохондриялық мембрана мен мембрана аралық қуыстың ішкі мембранаға қарағанда өткізгіштігі жоғары болады. Себебі ол АТФ түзілісі мен электронды тасымалдау процесстеріне қатысатын ферменттерді қамтиды. Ішкі мембрана митохондриялық матрикті қоршап тұрады. Ішкі мембрана арқылы түзілетін электрохимиялық градиент тотығу арқылы фосфорлану процессін жүргізеді [76]. Ағзаның клеткалық энергиясының басым бөлігі (>90%) трикарбоксил қышқылды цикл мен электронды тасымалдау тізбегінің көмегімен митохондрияда АТФ күйінде өндіріледі [77].

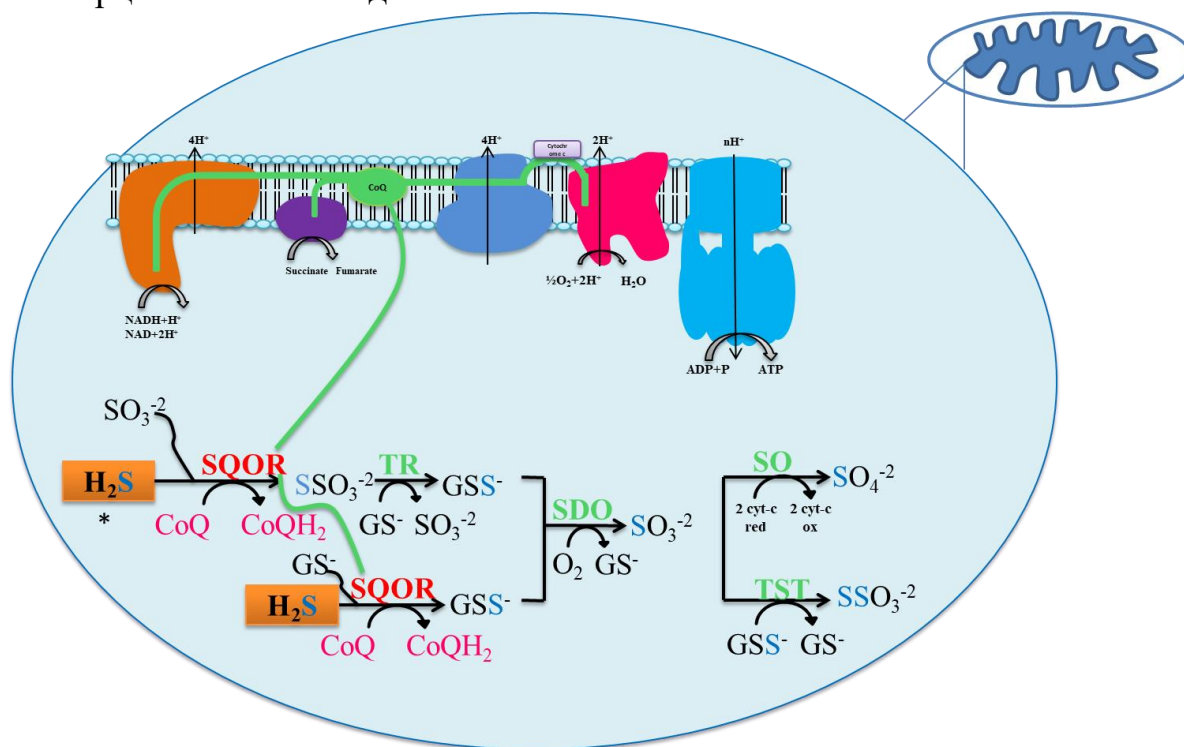
Митохондриялық геном ДНҚ молекуласының кішігірім шеңбері күйінде болады. Әрбір митохондрияның матриксінде көптеген митохондриялық ДНҚ көшірмелері кездеседі. Митохондриялық ДНҚ репликациясы клетка цикліне байланысы болмайды, соның арқасында көп рет жүзеге асырыла алады [78, 79]. Ал репликациялық ақаулардың нәтижесінде мДНҚ мутациясы бар ұрпақ пайда болады [80]. мДНҚ қайта қалыптасуы мен нүктелі мутациялар тотығу арқылы фосфорлану қызметіндегі ақаулардан пайда болып, ядролық гендердің мутациясы тәрізді ол да адамдардың түрлі митохондриялық ауруларын тудырады [81-86].

Энергия түзілуінен басқа митохондриялар клетканың өзге де қызметтерін атқаруға қатысады, мысалы клеткаішілік Ca^{2+} реттелуіне, оттегінің реактивті түрлерінің түзілуі мен тазартылуына, апоптотикалық клетка өлімінің реттелуіне, протеазаның каспаз тұқымдасының белсенділігін реттеп, криопирин белсенділігінің нәтижесінде пайда болған қабынуды реттейді. Біріншілік митохондриялық ақауларға қоса митохондриялардың дисфункциялары мен тотықтандырғыш стресс қартаюға, қатерлі ісік ауруларының дамуына, жасқа тәуелді нейродегенеративті-метаболикалық синдромдардың пайда болуына себепкер. Соңғы онжылдық ішінде митохондрияның құрылысы, атқаратын қызметтері мен диабет, семіздік, инсульт, гипертония мен жүрек ақауы сияқты метаболикалық синдромдардағы физиологиясын толығымен зерттеп-түсінуде орасан зор өрлеу байқалады. Бұдан басқа, өмір салтына көзқарасты (дұрыс тамақтану мен физикалық жаттығулар) қамтитын терапевтикалық стратегияларды және фармакологиялық стратегияларды жетілдіруде, сонымен қатар митохондрияға бағытталған амалдарда алға басулар бар. Бұл стратегиялар негізі митохондриялық дисфункциялары мен тотықтырғыш стрессті азайту, сонымен қатар метаболикалық синдромдардағы митохондрия қасиетін қолдауға бағытталған [87].

Күкіртті сутек (H_2S) – азот оксиді мен көміртегі тотығын қамтитын газотрансмиттерлер деп аталатын тұрақсыз биологиялық сигналдық молекулалардан тұратындығы анықталды.

Цистатионин- β -синтаза (CBS) және цистатионин- γ -лиаза (CSE) сүтқоректілердегі H_2S -нің бастапқы биологиялық көзі болып есептеледі. Олардың транссульфурация жолындағы рөлі де маңызды орынды алады. Цистатионин- γ -лиаза цистеиннен H_2S -ін өндіреді. Цистатионин- β -синтазасымен H_2S -ің түзілісі цистеин мен гомоцистеиннің конденсациясының арқасында жүреді. Ал үшінші кезекте цистеиннен цистеинаминотрансфераза мен 3MST (3-

меркаптопируват сульфотрансфераза) (сурет 6, 7) әсерімен комбинациялы әрекеті арқылы алына алады.

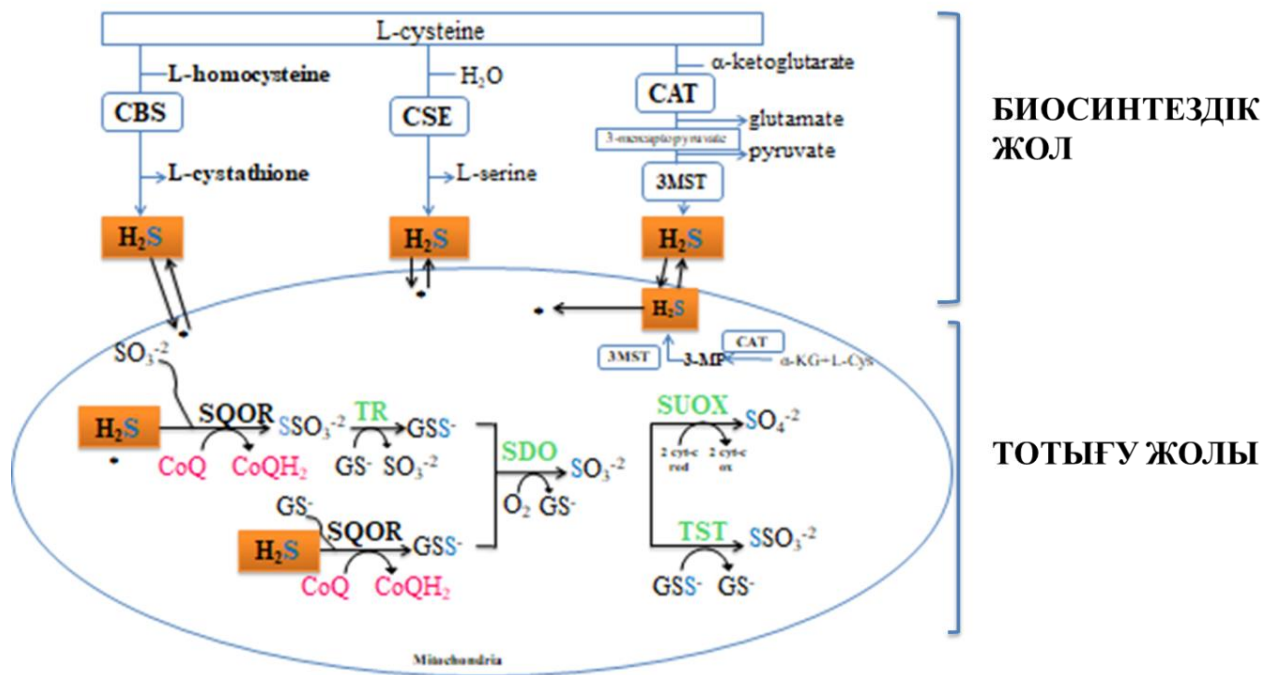


Сурет 6 – Митохондрия тыныс алу тізбегіндегі сульфидтік метаболизм жолы

Сүтқоректілерде H_2S газ тәрізді таратқыш ретінде әрекет етіп, бірнеше физиологиялық процесстерді реттеп отырады. Сульфидтер метаболизмінің өзгерісі ойық жаралы колитті, Альцгеймер синдромы мен Даун синдромы тәрізді кейбір аурулар қатарымен тікелей байланысты. Сульфидтердің әсері өте тар диапазон концентрациясында физиологиялық қалпынан жоғары күйіне ауысады, сондықтан да физиологиялық диапазон шегіндегі эндогенді сульфидтің деңгейін қадағалап отыратын реттеуші механизм қажет болады [88, 89].

Берілген жағдайда реттелу үшін H_2S -ің тотығуының митохондриялық жолы катаболиттік жолдың бір түрі ретінде көрсетілген. Бұл жолдағы алғашқы фермент ретінде SQOR кездеседі, ол H_2S -ің күкірт сульфаны атомын бос сульфиттерге тасымалдап, тиосульфатты түзеді.

Бұл реакция кезінде сульфид электрондары митохондриялық электронды тасымалдау тізбегіне орын алмастырады. Мұнда убихинон убихинолға ауысады. Сульфанды күкірттің доноры цистеинді тиоцистеинге ауыстырып, нәтижесінде сигналдың таралуы мен H_2S метаболизмі арасындағы байланыстың бар екендігін көрсетеді [90]. Кейін SDO (персульфиддиоксигеназа) осы реакциядан туындаған өнімді түрлендіреді, мысалы тотыққан глутатионды персульфидін ($GSSH$) сульфитке алмастырып бос глутатионды бөліп тастайды.



Сурет 7 – Сульфидтердің түзілуі мен тотығу жолының сызбанұсқасы
 Транс-сульфурация жолына қатысатын ферменттер – CBS (цистатион-β-синтаза), CSE (цистатион-γ-лиаза) мен 3MST (3-меркаптопируватсульфуртрансфераза). H₂S-ің митохондриялды тотығу жолына кіретін ферменттер – SQOR (сульфид:хинон оксидеродуктаза), SDO (персульфиддиоксигеназа), SO (күкірт тотығы), TST (тиосульфат сульфаттрансфераза) және TR (тиосульфат редуктазасы)

Келесі кезекте сульфит тотығып, сульфатқа айналады, ал TST сульфидке персульфидті қосып тиосульфатқа түрлендіреді. Күкірт трансферазасының бір түрі TR тиосульфаттан сульфид күкіртін бөліп алу қабілеті бар, нәтижесінде сульфид қанға бөлініп, зәрмен шығып кетеді. Митохондриядағы сутек сульфидінің метаболизмі қуатты толықтыруға қолданылуы мүмкін. H₂S тез арада метаболикалық қажеттіліктерді төмендете алу қабілеттілігі көрсетілген. Азот оксидіне ұқсас H₂S митохондриялық дем алуы мен оның қызметін қорғайды. Дегенімен де, жалпы түсінік бойынша цитоплазмада H₂S H₂S-түзуші ферменттердің цитозольдегі орналасуынан пайда болып, митохондрияларда тотығу арқылы қолданылады. Соңғы зерттеулер CoQ дефициті бар адамдарда молекулалық ақауларға қарамастан, H₂S тотығу жолы бұзылғанын айқындайды. Бұл SQOR-ның CoQ-не тәуелділігінің бір көрінісі [91].

1.4 Тотықтырғыш стресс пен митохондриялық дисфункция

Митохондриялық аурулар – орталық жүйке жүйесі мен бұлшықет жүйесінің, сондай-ақ дененің басқа да мүшелері мен жүйелерінің басым зақымдануында көрінетін клиникалық көріністердің полиморфизмімен сипатталатын жасушалық энергияның бұзылуынан туындайтын тұқым қуалайтын патологиялар тобы [92].

Митохондриялық патологияның баламалы анықтамасы бұл митохондриядағы генетикалық, құрылымдық және биохимиялық ақаулардан,

тіндердің тыныс алуының бұзылуынан және соның салдарынан энергия алмасуының жеткіліксіздігінен туындаған патологиялық жағдайлардың үлкен тобы екенін айтады.

Митохондриялық тыныс алу тізбектері – аэробты метаболизмнің негізгі соңғы жолы болып табылады. Сондықтан митохондриялық патология жиі «митохондриялық тыныс алу тізбегі аурулары» деп аталады, бұл салыстырмалы түрде жана аурулар класы.

Негізгі зат алмасу ақауының болуына байланысты митохондриялық аурулардың төрт негізгі тобын қарастыру әдетке айналған: 1) пируват алмасуының бұзылуы; 2) май қышқылдарының алмасуындағы ақаулар; 3) Кребс циклінің бұзылуы; 4) электрондарды тасымалдау және тотығу фосфорлану ақаулары [93].

Митохондриялық патологияның себептері жасушалардағы энергетикалық метаболизмге қатысатын ақуыздарды кодтайтын гендердің мутациялары болып табылады (оның ішінде пируватдегидрогеназа кешенінің суббірліктері, Кребс циклінің ферменттері, электронды тасымалдау тізбегінің компоненттері, электронды тасымалдау тізбегінің құрылымдық ақуыздары, митохондрияның ішкі мембраналық тасымалдаушылар, митохондриялық нуклеотидтер пулының реттеушілері, сонымен қатар митохондриялық ДНҚ-мен әрекеттесетін факторлар [94].

Митохондриялық бұзылулар бастапқы митохондриялық цитопатиялар болып табылмайтын көптеген аурулармен байланысты (сурет 8).

Сондықтан, митохондриялық аурулар адам ағзасының кез келген жүйелері мен мүшелеріне әсер етуі мүмкін [95]. Осыған байланысты бұл жағдайларды «митохондриялық цитопатиялар» деп атаған дұрыс болады [96, 97].

Митохондриялық цитопатиялардың негізгі белгілеріне клиникалық симптомдардың айқын полиморфизмі, зақымданудың көпжүйелі сипаты, ағымының өзгермелілігі, прогрессиясы және қолданылған терапияға сәйкессіз серпіліс жатады.

Бүгінгі күні митохондриялық ДНҚ мутациясынан туындаған 200-ден астам аурулар анықталған [98, 99].

Митохондриялық аурулар митохондриялық және ядролық геномдардың патологиясынан туындауы мүмкін.

Митохондриялық генетика классикалық мендельдік генетикадан үш маңызды аспектіде ерекшеленеді:

1) аналық тұқым қуалаушылық (бүкіл цитоплазманы, ондағы органоидтармен бірге ұрпағы жұмыртқамен бірге қабылдайды);

2) гетероплазмия – ДНҚ-ның қалыпты (жабайы) және мутантты түрлерінің жасушада бір мезгілде болуы;

3) митоздық сегрегация (мтДНҚ-ның екі түрі де жасушаның бөлінуі кезінде еншілес жасушалар арасында кездейсоқ таралуы мүмкін) [100, 101].

Митохондриялық ДНҚ мутацияларды ядролық геномға қарағанда 10 есе жылдамырақ жинақтайды, өйткені оның қорғаныш гистондары жоқ және оның ортасы митохондриядағы метаболикалық процестердің жанама өнімі болып табылатын реактивті оттегі түрлеріне өте бай. Жасушалар митохондриялық

тыныс алу тізбектерінің биохимиялық ауытқуларын көрсете бастағанға дейін мутантты мтДНК үлесі шекті деңгейден асуы керек. Мутантты мтДНК пайыздық деңгейі отбасылардағы жеке адамдарда, сондай-ақ органдар мен тіндерде әртүрлі болуы мүмкін. Бұл митохондриялық дисфункциялары бар науқастардағы клиникалық көріністің өзгермелілігін түсіндірудің бірі. Бірдей мутациялар әртүрлі клиникалық синдромдарды тудыруы мүмкін. Әртүрлі гендердегі мутациялар бірдей синдромды тудыруы мүмкін. Мұндай жағдайдың классикалық мысалы - MELAS синдромы [102].

Митохондриялық ауруларды диагностикалаудың клиникалық критерийлері салыстырмалы түрде көп:

- 1) миопатиялық симптомдық кешен (жаттығуларға төзбеушілік, бұлшықет әлсіздігі, бұлшықет тонусының төмендеуі);
- 2) құрысулар (миоклоникалық немесе мультифокальды);
- 3) церебеллярлық синдром (атаксия, қасақана тремор);
- 4) көз қозғалғыш нервтердің зақымдануы (птоз, сыртқы офтальмоплегия);
- 5) полиневропатия;
- 6) инсульт тәрізді пароксизмдер;
- 7) мигрень тәрізді бас аурулары;
- 8) бас сүйек-бет дисморфиясы;
- 9) дисметаболикалық көріністер (құсу, летаргия эпизодтары, кома);
- 10) тыныс алу бұзылыстары (апноэ, гипервентиляция, тахипноэ);
- 11) жүректің, бауырдың, бүйректің зақымдануы;
- 12) аурудың үдемелі ағымы [103-105].

Митохондриялық ауруларды диагностикалауда келесі клиникалық критерийлер қолданылады:

- 1) дәнекер ұлпасының зақымдану белгілері (гипермобилдік синдром, терінің гиперсерпімділігі, позаның бұзылуы және т.б.);
- 2) нейродегенеративті көріністер, мидың магнитті-резонанстық томографиясы (МРТ) кезіндегі лейкопатия;
- 3) жаңа туған нәрестелердегі сананың бұзылуының қайталанатын эпизодтары немесе түсіндірілмеген құсу эпизодтары;
- 4) түсініксіз атаксия;
- 5) нақты себептерсіз ақыл-ой кемістігі;
- 6) ауыр отбасы анамнезі;
- 7) бала жағдайының кенет нашарлауы (құрысулар, құсу, тыныс алу бұзылыстары, летаргия, әлсіздік, бұлшықет тонусының бұзылуы – жиі бұлшықет гипотензиясы, кома, летаргия; дәстүрлі терапияға жатпайтын бауыр мен бүйректің зақымдануы).



Сурет 8 – Митохондрияның дисфункциясы мен тотықтырғыш стресстің нәтижелері

Цитоморфоденситометриялық зерттеулер лимфоциттердің митохондрияларының белсенділігін (санының азаюы, көлемінің ұлғаюы, белсенділігінің төмендеуі) бағалауға мүмкіндік береді.

Дәлелді медицина тұрғысынан аурулардың осы өкілдік тобына тиімді ем жоқ деп саналады. Осыған қарамастан, әлемнің әртүрлі елдерінде метаболизмді қалыпқа келтіру және митохондрияларды тұрақты энергиямен қамтамасыз ету үшін фармакологиялық агенттер мен биологиялық белсенді заттар қолданылады.

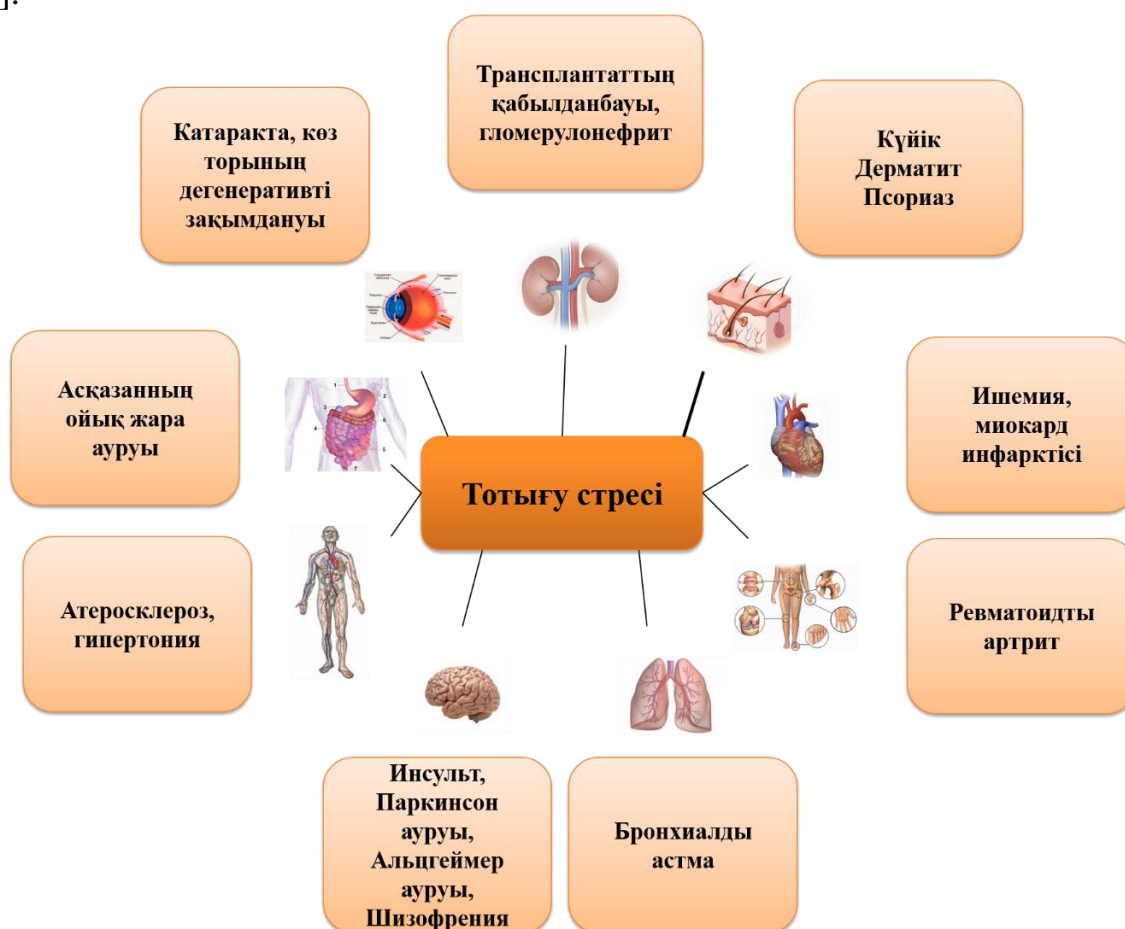
Митохондриялар тотықсыздану стрессінің бастапқы көзі болып саналады, себебі электрондарды тасымалдау барысындағы электрондардың шығып кетуі, 90% эндогенді оттегінің белсенді формаларының пайда болуына жауап беретін супероксидті анионның түзілуіне алып келеді. Функциялары бұзылған митохондриялардағы АТФ түзілісі төмендеп, керісінше оттегінің белсенді формаларының түзілісі артады деген болжамдар бар [106].

Бірнеше қорғаныс механизмдері клеткадағы бос радикалдардың шамадан тыс өндірілуінен болатын тотықтыру стрессін жеңілдету үшін қолданылады. Ферментативті қорғаныс жүйесі SOD, GR және GPx тәрізді антиоксидантты ферменттердің мелиоративті әсерін қоздырады. Ал екінші ферментативті емес қорғаныс жүйесі болса, тотықтырғыш стресстен клетканы қорғайтын

антиоксидантты қосылыстарды қоздырады. Оның құрамында CoQ, E және C витаминдері, GSH, каротиноидтар, флавоноидтар мен мелатонин бар. Қалыпты жағдайда митохондриядағы оттегінің белсенді формаларының қайта өндірілуі, ферментативті және ферментативті емес қорғаныс жүйелерінің арқасындағы тотықтырғыш бұзылыстарынан клетка органелласын қорғау мақсатында шектеліп тұрады. Егер антиоксидантты қорғаныста ақаулар болса, оттегінің белсенді формаларының қайта өндірілуі жүзеге асады, ал бұл келесі кезекте митохондриядағы белоктар, ДНҚ мен липидтердің тотығу арқылы бұзылуына әкеледі.

Құрылымы мен қызметі зақымданған митохондриялар аурудың алғашқы және өте байқалатын ерекшелігі болып саналады. Тотықтырғыш стресске митохондриялардың өздері де осал келеді. Бұдан басқа, қартаю, митохондриялды биогенезінің өзгерісі және антиоксидантты қорғаныс қабілетінің төмендеуі, генетикалық факторлармен қоса көптеген метаболикалық аурулардың себебі болатын инсулинге төзімділікті тудырады (сурет 9).

ОБФ (оттегінің белсенді формалары) қалыпты жағдайда түзіледі және бұл тікелей ОБФ түзілу жылдамдығы мен антиоксиданттар және оларға туыстас ферменттердің көмегімен бөліну жылдамдығы арасындағы баланстың арқасында, ОБФ дәрежесі салыстырмалы түрде төмен деңгейде сақталып тұрады [107].



Сурет 9 – Тотығу стресінің әртүрлі органдарға әсер етуі нәтижесінде пайда болатын аурулар

Нәтижесінде не ОБФ-ның шамадан тыс бөлінуі, не антиоксидантты жүйенің бұзылуы, клетканың тотығу-тотықсыздану балансын тотықтырғыш дисбалансқа әкеліп, ОБФ-ның шамадан тыс түзілуіне себепкер болады. Бұдан басқа, қартаю, митохондриялды биогенезінің өзгерісі және антиоксидантты қорғаныс қабілетінің төмендеуі, генетикалық факторлармен қоса көптеген метаболикалық аурулардың себебі болатын инсулинге төзімділікті тудырады [108].

1.5 Тыныс алу тізбегінің кешендері

Жасушалық тыныс алудың соңғы сатысы электрондарды тасымалдау тізбегінен және хемиосмостан тұратын тотығу фосфорлануы болып табылады (сурет 10).

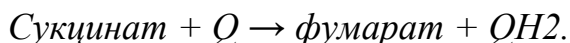
Электронды тасымалдау тізбегі эукариоттық жасушаларда ішкі митохондриялық мембранада және прокариот жасушаларында плазмалық мембранада кездесетін белоктар мен басқа органикалық молекулалардың жиынтығы. Электронды тасымалдау тізбегі екі негізгі функцияны орындайды: ол протон градиентін түзеді – хемиосмос кезінде АТФ құру үшін пайдалануға болатын энергияны сақтайды және гликолизде және лимон қышқылының циклінде қолданылатын NAD және FAD сияқты электрон тасымалдаушыларды түзеді.

Электронды тасымалдау тізбегінің молекулалары төрт кешенге (I-IV) реттелген. Молекулалар электрондарды бір-біріне бірнеше тотығу-тотықсыздану реакциялары арқылы тасымалдайды, тасымалдау тізбегі арқылы электрондарды жоғарыдан төмен энергия деңгейіне жылжытады. Бұл реакциялар энергияны босатады, оны кешендер ішкі мембрана арқылы (матрицадан стрембрана кеңістігіне) H⁺ айдау үшін пайдаланады. Бұл бүкіл ішкі мембранада протон градиентін құрайды [109].

НАДН және ФАДН₂ жасушалық тыныс алудың алдыңғы фазаларында түзілетін азайған электрон тасымалдаушылар болып табылады. НАДН электрондарды I кешеніне тікелей бере алады, ол алынған энергияны протондарды мембрана аралық кеңістікке айдау үшін пайдаланады. ФАДН₂ электрондарды II кешеніне береді, бұл протондарды мембрана аралық кеңістікке айдамайтын жалғыз кешен. Осылайша, ФАДН₂ НАДН қарағанда протон градиентіне азырақ үлес қосады. НАДН және ФАДН₂ сәйкесінше НАД және ФАД электронды тасымалдаушыларына қайта айналады.

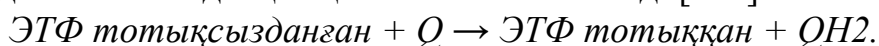
НАДН және ФАДН₂ екеуі де электрондарды III комплекске беретін жылжымалы электрон тасымалдаушы – убихинонға береді. Ол жерден электрондар цитохром *c* (сyt *c*) тасымалдаушысының жылжымалы электронына ауысады. *Cyt c* электрондарды IV кешенге жеткізеді, ол оларды O₂-ге береді. Оттегі екі оттегі атомын түзу үшін ыдырайды, олардың әрқайсысы суды қалыптастыру үшін екі протонды қабылдайды.

II кешен убихинонның тотықсыздануы арқылы сукцинатты фумаратқа дейін тотықтырады. Бұл реакция НАДН тотығуынан аз энергия беретіндіктен, II кешен протондарды мембрана арқылы тасымалдамайды және протон градиентін жасамайды.



Кейбір эукариоттарда, мысалы, *Ascaris suum* паразиттік құртында, фумаратты қалпына келтіру үшін кері бағытта жұмыс істейтін және убихинолды тотықтыратын II кешенді фумаратредуктазаға (менаквинол: фумарат-оксидоредуктаза) ұқсас фермент бар. Бұл құрттың тоқ ішектің анаэробты жағдайында өмір сүруіне және электронды акцептор ретінде фумаратпен анаэробты тотығу фосфорлануын жүзеге асыруға мүмкіндік береді. II кешеннің тағы бір ерекше қызметі безгек паразиті *Plasmodium falciparum*-да көрінеді. Мұнда II кешен оксидаза қызметін атқарады және паразит пиримидин синтезінің әдеттен тыс жолында пайдаланатын убихинонды қалпына келтіреді [114-118].

Электрон тасымалдағыш флавопротеин-оксидоредуктаза, ЭТТ-дағы электрондар келіп түсетін үшінші нүкте болып табылады. Бұл фермент митохондриялық матрицаның электронды тасымалдаушы флавопротеиндерінен электрондарды алып, оларды убихинонды азайту үшін пайдаланады [36]. Ол май қышқылының β -тотығуын және басқа процестерді тотығу фосфорлануымен байланыстырады. Әртүрлі ацетил-СоА-дегидрогеназалар электрондарды электронды тасымалдағыш флавопротеинге тасымалдау арқылы әртүрлі субстраттар (мысалы, май қышқылдары) тотықтырылады. Электронды тасымалдағыш флавопротеин дегидрогеназа, өз кезегінде, ақуызды тотықтырады және электрондарды ішкі митохондриялық мембранада еріген убихинонға береді, оны убихинолға дейін тотықсыздандырады, содан кейін ол тыныс алу электрондарын тасымалдау тізбегіне түседі. Электронды тасымалдағыш флавопротеин оксидоредуктазасының құрамында $[4Fe-4S]$ типті флавин және темір-күкірт кластері бар, бірақ ол басқа тыныс алу кешендері сияқты мембрана бетіне бекітіледі және липидті қос қабатты кесіп өтпейді [119].



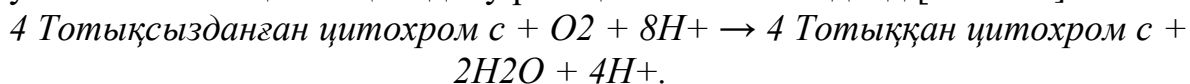
Сүтқоректілерде бұл фермент май қышқылының β -тотығуында, амин қышқылы мен холин катаболизмінде маңызды рөл атқарады [120]. Өсімдіктерде ЭТФ-Q-оксидоредуктаза ұзақ қаранғылық кезеңдерінде өмір сүру үшін маңызды.

Цитохром-bc1-кешені убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза немесе жәй ғана кешен III ретінде белгілі [122, 123]. Сүтқоректілерде бұл фермент димер болып табылады және кешеннің әрбір суббірлігі 11 ақуыз суббірлігінен, бір темір-күкірт кластерінен $[2Fe-2S]$ және үш цитохромнан тұрады: бір цитохром с1 және екі цитохром b [124]. Цитохромдар – кем дегенде бір гем тобы бар электронды тасымалдаушы ақуыздар. Электрондар белок бойымен қозғалған кезде гемдердегі темір атомдары тотықсызданған күйден (Fe^{2+}) тотыққан күйге (Fe^{3+}) өтеді.

III кешен убихинонның бір молекуласының тотығуын және митохондрияға еркін қозғалатын құрамында гемі бар ақуыздың цитохром с екі молекуласының тотықсыздануын катализдейді. Бірінші кезеңде фермент бір тотықсызданған

убихинонды, бір тотыққан убихинонды және бір цитохромды с байланыстырады, оның біріншісі QH₂ тотығады, одан бір электрон цитохром с-ға өтеді.

IV кешен соңғы ЭТТ реакциясын жүргізеді және электрондарды оттегіге береді, сонымен қатар матрицадан 4 протонды мембрана аралық кеңістікке айдайды [49]. Бұл жағдайда соңғы электронды акцептор оттегі суға дейін тотықсызданады. Протондарды айдау және суға оттегін азайту үшін матрица протондарын тұтыну протон градиентін жасайды. Жалпы, IV кешен цитохром с тотығу және оттегінің тотықсыздану реакциясын катализдейді [125-129]:



Көптеген эукариоттық организмдерде сүтқоректілерге тән жоғарыда сипатталғандардан басқа ЭТТ бар. Мысалы, өсімдіктерде баламалы НАДН редуктазалары бар, олар митохондрияда емес, цитозольда НАДН тотықтыратын және бұл электрондарды тікелей убихинондарға тасымалдайды. Бұл ферменттер протондарды айдамайды, сондықтан олар митохондриялық мембрананың электрохимиялық градиентін өзгертпей, убихинонды азайтады [130]. Өсімдіктерде, сондай-ақ кейбір саңырауқұлақтарда, протисталарда және мүмкін кейбір жануарларда электрондарды тікелей убихинолдан оттегіге тасымалдайтын балама оксидаза бар.

Осы балама НАДН редуктазалары мен оксидазаларын қамтитын электронды тасымалдау механизмдері толық ЭТТ-пен салыстырғанда ОБФ шығымдылығына ие. Электрондарды тасымалдау жолын осылайша қысқартудың артықшылығы толық анық емес. Дегенмен, белгілі балама оксидаза стресстік жағдайларға жауап ретінде қалыптасады: инфекциялар және басқалар толық ЭТТ жұмысын басатын суық, реактивті оттегі түрлерінің қалыптасуы [131]. Сондықтан альтернативті механизмдер ағзаның жағымсыз әсерлерге төзімділігін арттыра алады, тотығу стрессін азайтады.

Бастапқы ЭТТ моделі бойынша тыныс алу кешендері митохондриялық мембранада еркін және бір-бірінен тәуелсіз орналасқан. Соған қарамастан, қазіргі деректер тыныс алу кешендерінің жоғары дәрежелі суперкомплекстерді – респирасомалар түзетінін көрсетеді. Бұл модельге сәйкес тыныс алу кешендері өзара әрекеттесетін ферменттер жиынтығына бөлінеді. Бұл әрекеттесулер әртүрлі ферменттік кешендердің арасында субстрат алмасу мүмкіндігін береді, бұл электрондар алмасуының жылдамдығы мен тиімділігін арттырады [132]. Сүтқоректілердің суперкомплекстерінде кейбір компоненттер басқаларына қарағанда көбірек болады, ал кейбір деректерге сәйкес, I/II/III/IV комплекстер саны мен АТФ синтазасының арақатынасы шамамен 1:1:3:7:4 болады [133].

1.6 Глутатион (GSH)

GSH клеткадағы ең көп тараған антиоксиданттардың бірі екені анықталған. Оның саны апоптоз кезінде күрт төмендейді. Эндогенді пайда болған тотықтырғыш стресстің буферизациясының арқасында клеткаларды апоптоздан сақтап қалатын қасиеті бар деп болжаммен айтылады [134-136].

Ол бос радикалдардың сіңірушісі ретінде және тотықтырғыш реакциялардың бос өнімдерін буферлеуге көмегін тигізеді. Глутатион клетканың

өзге де маңызды қызметтерінің қатарын – ДНҚ репарациясы, простагландин мен белок синтезі, амин қышқылдарының тасымалдануы мен ферменттердің белсендірілуін жеңілдетеді [137-140]. Глутатион ас қорыту жүйесі мен иммунды жүйенің қызмет етуіне, сонымен қатар қорғасын мен сынап ауыр металлдары сияқты органикалық пен бейорганикалық ксенобиотиктердің залалсыздандырылуына қажет болады [141-143].

Глутатион – глутамат, цистеин мен глициннен тұратын ферментативті синтезделген трипептид. Осылайша, күкірт амин қышқылдарының бірі болып келетін цистеиннің қолжетімділігі, глутатион синтезінің қарқындылығына тікелей әсерін тигізіп отырады. Тотығу барысында тотықсызданған глутатион дисульфидті формалардың түзілістерімен әрекеттесе алады. GSH NADPH-глутатионредуктазасының белсенділігінің арқасында қалпына келеді. Клетка ішілік GSH ондағы глутатион құрамының 90%-нан көбін құрайды, бірақ тотықтырғыш стресс тәрізді қалпына келуші эквиваленттерді қолдану шарттарында, қалпына келген глутатион мен тотыққан глутатионға сәйкестілігі төмендейді. Глутатион оның тотығу-тотықсыздану реакциясындағы буферлік қызметінен басқа да маңызды рөлдерді атқарады. Соңғы зерттеу нәтижелері бойынша бұл стресс белгісі ретінде қызмет атқару мүмкіндігін көрсетеді. Глутатион глутатионпероксидаза (GPx) мен глутатионредуктаза (GRd) екі ферментінен тұратын жүйе арқылы әрекет етеді. CoQ дефициті бар екі түрлі тышқан моделіндегі глутатион жүйесінің әлсіреуі тіркелген болатын [144], бұл SQOR дефектімен байланысты болуы мүмкін.

Барлық аэробты ағзалар тотығу стресіне ұшыраған, оның себебі оттегінің толық тотықпағандығынан (моновалентті) түзілетін оттегінің белсенді формалары болып табылады. ОБФ мысалдарына супероксид және гидропероксидті радикал жатады, мембраналық липидтер, ақуыздар мен ДНҚ тотығуының зақымдануынан барлық жасушалар токсинді және мутаногенді әсерге ұшырайды [147]. Бұл радикалдар әлсіз реакциялық қабілетке ие, яғни, тотығу-тотықсыздану потенциал төмен. Алайда, супероксидтен келетін қауіп үлкен, себебі ОБФ басқа формаларының көзіне айналады: сутегі асқын тотығы, гидроксильді радикал, гипохлорит, озон, синглетті оттегі [145, 146]. Әр түрлі стресстерде супероксидтің түзілуі артады.

GSH – белсенділігі глутатионның тотығу-тотықсыздану потенциалының өзгеруіне негізделген бірқатар ферменттердің коферменті. Глутатион пероксидазасының белсенділігі және сутегі асқын тотығын пайдалану жылдамдығы жасушадағы төмендеген глутатион концентрациясына тікелей байланысты [148-158].

Ксенобиотиктердің конъюгациясы және глутатион-S-трансферазаның көмегімен жасуша мембраналарынан липидтердің асқын тотығының жойылуы GSH-сіз болмайды. Глутатионның төмендеуі сутегі асқын тотығын бейтараптандырумен байланысты аскорбат-глутатион циклінің реакцияларын сақтау үшін қажет. Мұнда тотықсыздандырығыш ретінде оның негізгі рөлі аскорбин қышқылын дегидроаскорбат редуктаза ферменті арқылы тотыққаннан тотықсызданған түрге қайта айналдыру болып табылады. Төмендетілген

глутатионның негізгі ортақтастығы осы циклдің маңызды элементі болып табылатын глутатионредуктаза арқылы сақталады.

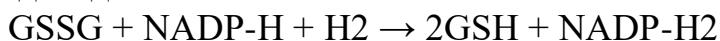
Сүтқоректілердегі глутатион синтезінің негізгі органы физиологиялық жағдайда жалпы айналымдағы глутатионның шамамен 90%-ын қамтамасыз ететін бауыр болып табылады [159]. Бауырдағы глутатион деңгейі ашығу кезінде шамамен 2 есе төмендейді және тамақтанғаннан кейін тез артады. Глутатионның бауырдан қан плазмасына және өтке енуі кейбір гормондармен, атап айтқанда глюкагонмен және вазопрессинмен ынталандырылады [160]. Плазмадағы глутатион жасуша мембраналары арқылы тасымалдау және глутамил циклі арқылы жасуша ішіндегі ресинтез арқылы ағзаның ұлпаларымен пайдаланылады.

Глутатионның әртүрлі және өте маңызды функциялары цистеин қалдығына жататын SH-тобының молекуласында болуымен байланысты. SH-тобымен тотыға отырып, көптеген маңызды процестердің қатысушысына айналады. Осылайша, глутатион сіңірілген ауыр металдарды, сондай-ақ метаболизмнен шығарылған өнімдерді детоксикациялауға байланысты процестердің негізгі қатысушысы болып табылады. Глутатион-S-трансфераза GSH конъюгациясының экзогендік те, эндогендік те әртүрлі улы қосылыстармен реакциясын катализдейді.

Көптеген реакцияларда тотықсызданған глутатион сутегі атомдарының доноры болып табылады, ал екі молекула тотыққанда дисульфидтік байланыс арқылы димер түзеді, бұл глутатионның тотыққан түрі:



Кері реакция NADP-H пайдаланған кезде глутатионредуктаза (GR) ферментімен катализденеді:



глутатионредуктаза

Сонымен қатар, белсенділігі редокс-реттелуіне жататын ферменттер бар: олардың белсенділігіне дисульфидті байланыста тотығу немесе тотықсыздану әсер етеді. Әдетте, тікелей немесе жанама түрде мұндай ферменттердің қалпына келуі глутатионның төмендеуімен қамтамасыз етіледі. Жасушадағы GSH/GSSG қатынасы осы қосылыстардың редокс-күйін және тиісінше олардың белсенділігін бақылайды.

Глутатион жасушаларды реактивті оттегі түрлерінен қорғайды деп санауға негіз береді, оның пайда болуы аэробты өмірдің сөзсіз салдары болып табылады [161-168]. Тірі организмде бос радикалдардың пайда болуы өз алдына қалыпты биологиялық процесс және қалыпты жағдайда бұл процестің сандық аспектілері қатаң реттеледі. Оттегі аэробты жасушалардың өмір сүруінің қажетті шарты бола отырып, сонымен қатар оттегі бос радикалдарының потенциалды тұрақты көзі болып табылады. Үлкен физикалық күш салу кезінде O₂ мөлшері 10 есеге дейін артуы мүмкін [169]. Жасушада, сондай-ақ жасушалық емес затта өздігінен жүретін автототығу физиологиялық антиоксиданттық жүйе арқылы тежеледі [170]. Бұл жүйеге липидті бос радикалдардың (токоферол) немесе реактивті оттегі түрлерінің (супероксид дисмутаза) түзілуінің бастапқы кезеңінде асқын тотығуды тежейтін биоантиоксиданттар кіреді. Антирадикалды тежеу тізбек

арқылы жүзеге асады: глутатион – аскорбат-токоферол, ол электрондарды (сутегі атомдарының құрамында) пиридин нуклеотидтерінен бос радикалдарға тасымалдайды. Осылайша, жасушадағы липидтер мен биополимерлердің бос радикалдық күйлерінің стационарлық өте төмен деңгейі қамтамасыз етіледі. Жасушаны тотығу стрессінен қорғаудағы негізгі рөл глутатион жүйесіне жүктелуі керек.

Тірі жасуша супероксид дисмутаза, каталаза және глутатион пероксидаза; глутатионпероксидаза және глутатионтрансфераза арқылы реактивті оттегі қосылыстарына қарсы ферментативті қорғаныстың үш желісін пайдаланады. Бұл үш қорғаныс желісі супероксидті радикалдарды, H_2O_2 және органикалық гидропероксидтерді ретімен азайтады. Төртінші қорғаныс желісі де ерекшеленеді – глутатионтрансфераза, глиоксилаза және формальдегиддегидрогеназа қатысатын басқа тотыққан қосылыстардың асқын тотығуының қайталама өнімдерін бейтараптандыру. Әлбетте, глутатион төрт қорғаныс сызығының үшеуіне қатысады, сондықтан негізгі үлес қосады.

Атмосферада оттегі пайда болғаннан бері жердегі тірі табиғаттың эволюциясы жасушаларда антиоксиданттық қорғаныстың биохимиялық жүйесінің қалыптасуымен қатар жүрді. Оның ең маңызды компоненттерінің бірі – L-γ-глутамил-L-цистеинилглицин трипептиді болып табылатын төмендетілген глутатион. Молекуланың кішігірім мөлшері және цистеиннің бүйірлік тізбегінде сульфгидрил тобының болуы глутатионды оттегінің белсенді формалары және бос радикалдық процестердің зақымдаушы әсерін болдырмауға бағытталған реакциялардың басым көпшілігінің әмбебап қатысушысы етеді. Глутатион классикалық мағынада пептид бола отырып, соған қарамастан белокты емес трипептид болып табылады, яғни ол шаблон синтезі немесе трансляциядан кейінгі модификация арқылы түзілмейді. Глутатион *de novo* синтезі тек глутамат цистеин-лигаза және глутатион синтетаза катализдейтін екі сатыда тек цитозольде жүреді [171-178]. Синтездің бірінші кезеңінің ерекшелігі цистеиннің амин тобына глутамин қышқылының α- емес, γ-карбоксил тобын қосу арқылы пептидтік байланыстың түзілуі болып табылады. Молекуланың осындай ерекше құрылымына байланысты мұндай пептидтік байланыстың гидролизін жасушалардың кейбір түрлерінің сыртқы беттерінде ғана орналасқан бір мембраналық фермент, γ-глутамил транспептидаза жүзеге асырады [179-182]. Нәтижесінде GSH жасушаішілік ыдырауға төзімді және тек γ-глутамил транспептидазасы бар тіндерде жасушадан тыс метаболизденеді. Глутатион барлық эукариоттық жасушаларда кездеседі. Прокариоттарда ол негізінен грамтеріс бактерияларда және грамоң бактериялардың кейбір түрлерінде ғана кездеседі [183]. Бұл трипептидтің негізгі резервуарлары, біріншіден, 90% дерлік шоғырланған цитозольге, 10% митохондрияларға түседі, ал аз ғана пайызы эндоплазмалық тордың үлесіне келеді [184]. GSH метаболизмі өте жылдам, мысалы, егеуқұйрықтардың бауырында оның жартылай шығарылу кезеңі небәрі 2-3 сағатты құрайды. Сүтқоректілерде көрсетілгендей, жасушалардағы глутатион гомеостазы үш механизммен қамтамасыз етіледі. Бұл *de novo* синтезі, плазмалық мембраналар арқылы экзогендік GSH тасымалдануы және тотыққан пішіннен қалпына келтіру. GSH тотықтырғыш және тотықсыздандырғыш

эквиваленттер концентрацияларының қатынасымен анықталатын жасушадағы тотығу-тотықсыздану күйін сақтауда шешуші рөл атқарады [185]. Ол тотықсыздандырылған және тотыққан (глутатион дисульфиді) екі тотықсыздандырғыш түрінде болады. GSH/GSSG қатынасы жасушалардың тотығу күйін анықтайды және жоғарыда аталған екі фермент арқылы реттеледі [186].

1.7 Рациондағы кездесетін күкірт амин қышқылдарының модуляциясы: N-ацетилцистеиннің (NAC) қосылуымен салыстырғандағы күкірт амин қышқылдарының (SAAR) шектелуі

Күкірт амин қышқылдарындағы (SAAR) күкірттің құрамын шектеу, кеміргіштердің моделінде көрсетілген бойынша олардың өміршеңдігін арттыратын диеталық араласу болып саналады. *Caenorhabditis elegans*-қа жүргізілген соңғы зерттеулер, белок синтезі қарқындылығының төмендеуі тікелей өміршеңдіктің артуына байланысты екенін көрсетті. SAAR-ның белок синтезі мен оның деградациясына әсері аз зерттелген [187-197].

Эндоплазматикалық тордағы тотығу-тотықсыздану ортасының өміршеңдікті арттырудағы рөлі мен оның протеостаздағы орыны аз зерттелген. Белок синтезінің ең маңызды орыны болып саналатын эндоплазматикалық тор қолайлы тотығу-тотықсыздану ортасы мен белоктардың өзгеруіне қажетті сүйемелдеу элементтерін талап етеді. Бұл жағдайдағы SAAR-ның орны ерекше, себебі ол глутатион (GSH) деңгейін реттеп отырады да, клеткалық тотығу-тотықсыздану дәрежесінің көрсеткіші ретінде болады [198-200].

GSH оттегінің белсенді формаларымен күресте, тотығу-тотықсыздану балансын реттеуші, ксенобиотиктердің залалсыздандырылуы мен клеткалық белгі беруде аса маңызды рөлді атқарады. GSH қалпына келуші эквиваленттікті оттегінің белсенді формасын қамтитын бірнеше биохимиялық интермедиаттарға жеткізе алады. Мұнда тотыққан GSH (GSSG) мен тотықсызданған биохимиялық интермедиаттардың түзілуі жүзеге асырады. GSH мен GSSG ара-қатынасы клеткалық тотығу-тотықсыздану деңгейін қадағалаудағы маңызы зор. GSH деңгейінің төмендеуі және/немесе GSSG / GSH ара-қатынасының жоғарылауы тікелей тотықтырғыш ортаны арттырады. Егер тотықтырғыш ортаның артуы антиоксиданттық қабілеттілікті басып тастаса, нәтижесінде тотықтырғыш стресс пайда болады.

Ұлпадағы GSH мен GSSG деңгейін ішкі факторлар (қартаю) да, сыртқы факторлар (тағамдық амин қышқылдары) да өзгертіп отыра алады.

Күкірт амин қышқылдарының (SAAR) төмендетілуі арқасындағы өміршеңдіктің артуының негізі болатын механизмдер әлі белгісіз. Цистеин мен метионин глутатион (GSH) белоктарының биосинтезіне қажетті [201-204].

N-ацетилцистеин (NAC) – бос радикалдарды сіңіретін және 1950 жылдардан бері қолданылып келетін антиоксидант. Ол биохимиялық тұрғыда антиоксидантты белсенділікті қозғайтын тиол алмасу реакцияларына қатысады да, гендердің транскрипциясы мен апоптозды өзгертіп отырады [205].

NAC – L-цистеин амин қышқылының туындысы. Ол психиатриялық және неврологиялық аурулардың жаңа терапиясы ретінде қолданылады. NAC берілген

ауруларда кездесетін тотықтырғыш стресс, нейроқабыну және дофамин мен глутаматтың нейрорегуляциясы сияқты патофизиологиялық процесстердің тежелуінде маңызы зор.

Трихотилломания патофизиологиясында глутаметриялық жүйедегі ақаулардың болуы айқындалған. Özcan мен бірлескен авторлары трихотилломаниясы бар екі аурудың жағдайында NAC көмегімен жүргізілген ем шараларының сәтті болуын жариялады. Авторлар екі ауруға да NAC мөлшерінің 1200 мг / тәул ішке қабылдауын ұсынды. Екі аурудың NAC емделуінен бастап 2 ай мен 2 апта өте салысымен, олардағы шаш түсуінің азайғандығын, ал 4 пен 6 ай ішінде олардың шаштарының толығымен қайта қалпына келуі анықталған. Олардың кері әсері жайлы мағлұматтар келтірілмеген [206, 207].

NAC берілген жолдарды өзгерту қабілетіне ие екендігін көрсетеді. Және NAC-тың аутистік аурулардағы орнын зерттеуіне түрткі болады. Қазіргі таңда жарияланған екі жетекші зерттеу жұмыстары бар, олар ашуланшақтық симптомдарына қатысты эффективтілікті ұсынып отыр. Берілген зерттеу жұмысының мақсаты болып NAC-тың аутистік ауруларды емдеудегі пайдасын анықтау болып саналады.

Жақында ғана NAC TNF- α -ның HeLa клеткаларына әсерін бұғап тұратындығы көрсетілген, бұл клеткалық белгі беру жолына қатысатын киназалармен әрекеттесудің арқасында болады деген болжалдар бар.

Глутатион (GSH) дефициті көптеген патологиялық жағдайлармен байланысты. NAC-ты енгізу арқылы глутатионның клетка ішілік деңгейін қалпына келтіреді [208].

Ацетаминофеннің зарарлығына қарсы тұра алу қабілетімен танымал NAC, цистеин немесе глутатион дефицитінің жақсы және қауіпсіз у қайтарушысы болып саналады. NAC инфекциялардың кең ауқымында, генетикалық ақаулар мен зат алмасудағы бұзылыстарда, сонымен қатар адамның иммун тапшылық вирус инфекциясы мен өкпенің хроникалық обструктивті ауруындағы глутатион дефицитін емдеу мақсатында қолданылады. Ішке енгізілген NAC-тың 46 клиникалық зерттеулерінің үштен екі бөлігінен астамы NAC-тың жағымды әсерін айқындайды. Бұл көрсеткіштер зерттеудің соңғы нәтижесіне негізделме немесе аурулардың жалпы өмір сүру сапасы мен амандығының көрсеткіштерімен өлшенген [211].

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу материалдары

2.1.1 CoQ жетіспеушілігі және комплекс I жетіспеушілігі бар тышқандар моделі

Тышқандардың CoQ9 гені 8-ші хромосоманың 9 экзондарынан қалыптасқан және болжам бойынша 313 амин қышқылдарынан тұратын белокты өндіреді. Ал адамдардың CoQ9 гені 16-шы хромосомада орналасқан 9 экзондардан тұрады және де болжаммен кристалды күйде болатын 318 амин қышқылы бар белокты өндіріп шығарады [32]. Екі белоктың 90,9% сәйкестігі бар, бұған қоса адамдардағы 244-ші орында, ал тышқандарда 239-шы орында аргинин бар және екі жағдайда да митохондрияға әкелудің мақсатты тізбегіне ие.

CoQ дефициті бар *Coq9*^{+/+} тышқан моделі Ingenious Targeting лабораториясында (АҚШ) генетикалық фоны C57BL/6N мен C57BL/6J линияларынан тапсырыспен жасалынып алынды [115]. *Coq9*^{R239X/+} (*Coq9*^{R239X}) гетерозиготалы тышқандарды будандастырғанда *Coq9*^{+/+} (қалыпты), *Coq9*^{R239X/+} (гетерозиготалы), *Coq9*^{R239X/R239X} (гомозиготалы) түрлері алынды. Комплекс I дефициті бар *Ndufs4* тышқан моделі Джексон лабораториясынан (АҚШ) тапсырыспен алынды. Нокаутты *Ndufs4* тышқандары генінің аллеліндегі 2 экзонын кесіп алу нәтижесінде *Ndufs4*^{-/-} тышқандары алынған (Джексон лабораториясының сайтында анықтама көрсетілген <https://www.jax.org/strain/027058>). Бұл мутантты тышқандар Ли синдромымен ауырады.

Берілген зерттеу жұмысында тек жабайы (*Ndufs4*) тышқандар мен мутантты (*Ndufs4*^{-/-}) тышқандар қолданылды.

2.1.2 Жануарлар және тәжірибелі топтар

Тышқандар Гранада университетінде арнайы жануарларға арналған SPF зонасында орналастырылды. Жарық таңғы 7:00-де қосылып, кешкі сағат 19:00-де өшіріліп тұрды. Тышқандардың суы мен арнайы кеміргіштерге арналған тамақты ішуге мүмкіншіліктері шектеусіз болды. Барлық тәжірибелер Гранада университетінің жануарларды бағу мен оларды қолдануына сай этикалық комитетінің бекітілген протоколы бойынша жүргізілді.

Тәжірибеге келесідей топтар қолданылды:

- *Coq9*^{+/+} жабайы тышқандар (бақылау тышқандары)
- *Coq9*^{R239X} гомозиготалы тышқандар (тәжірибелі тышқандар)
- *Coq9*^{R239X} + NAC гомозиготалы тышқандар (тәжірибелі тышқандар)
- *Coq9*^{R239X} + SAAR гомозиготалы тышқандар (тәжірибелі тышқандар)
- *Ndufs4*^{+/+} жабайы тышқандар (бақылау тышқандары)
- *Ndufs4*^{-/-} гомозиготалы тышқандар (тәжірибелі тышқандар)

Coq9^{R239X} тышқандарына тәжірибе жүргізу кезінде тамақтану рациондарына күкіртті амин қышқылдардың (SAAR) мөлшеріне диеталық шектеулер жасалды. Сондықтын *Coq9*^{R239X} тышқандарына тәулігіне күкіртті амин қышқылдардың (SAAR) мөлшері шамамен 0,1-1 г/кг дене салмағына қолданылды. Келесі тәжірибелік топта *Coq9*^{R239X} тышқандарына тәулігіне N-ацетил-L-цистеинді

(NAC) есеппен 1-3 г/кг дене салмағына қолданылды. Тышқандар тәжірибеге 1 айынан бастап зерттеуге алынды.

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 ДНҚ экстракциясы арқылы генотипті анықтау әдісі

Мутантты (гомозиготалы) тышқандардың көбею қабілеті төмен болғандықтан, гетерозиготалы тышқандардың будандасуынан алынады. Сондықтан да тышқандардың генотипін анықтау ДНҚ-ны бөліп алу жолымен жасалынды. Бұл мақсатта тышқандардың құйрықтары (құйрықтарының ұштары) қолданылды, оларға К протеиназасын (Amresco) қосып, 37°C-та түні бойы кезекті инкубацияға жіберілді. Инкубациядан кейін белоктарды тұнбаға келтіретін ерітіндіні (Protein Precipitation Solution, Quiagen) қосып, 5 минут бойы 13000 айн/мин көрсеткішінде центрифугада айналдырып, әрі қарай алынған супернатантқа изопропанол (Sigma-Aldrich) қосылды. Келесі кезекте қайтадан центрифугаға айналдырып, супернатант бөлініп алынады да, тұнбаны 70% этанолмен шайылды. Қалған қалдық супернатантты бөліп алу мақсатында соңғы рет центрифугада айналдырып, сынамалы үлгілерді термоблокта 10 мин бойы 50°C ұсталынып, содан кейін Nuclease free water (Amresco) суы қосылды. ДНҚ-ның сандық көрсеткіші NanoDrop құралында анықталды. Сандық талдауынан кейін 10 мкл сынамалы үлгілерге 15 мкл праймерлер қосылып ПЦР жүргізілді. Соq9 тышқандары үшін Neo Del-1 F-5'-GGT GTC CAG AGG GCT ATA TG-3 ' және Neo-2 R-5'-GCC TGG GTC AGA TTC TCT TA-3' праймерлері қолданылды.

Ndufs4 тышқандары үшін fw-5'-AGT CAG CAA TTT GGG AGT-3', common-5'-GAG CTT GCC TAG GAG GAG GT-3' және fw -5'-AGG GGA CTG GAC TAA CAG CA-3 ' праймерлері пайдалынды.

Жүргізілген әдістің нәтижесінде жабайы, гомозиготалы және гетерозиготалы тышқандардың сынамалы үлгілеріне электрофорез жүргізілді.

2.2.2 Белоктың мөлшерін анықтау әдісі

Белоктардың мөлшері Бредфорд (Bradford 1975) әдісінің көмегімен анықталды. Әрбір сынамалы үлгілер екі рет өлшеуге алынды. Спектрофотометр планшеттеріне бірінші 10 µl сынамалы үлгі, екінші 200 µl Бредфорд реагенті қосылды. Реакциялар жүру мақсатында қоспаны 10 минут бойы бөлме температурасында фольга қағазымен жауып (жарық сәулесінен сақтап), шейкерге үш минут бойы инкубацияға қойылды.

Барлық өлшемдер планшетті спектрофотометр BioTek Power-Wavex Microplate Scanning құралымен 595 нм ұзындығында жүргізілді. Бақылау ретінде бұрыннан бері қолданатын көптеген сынамалы үлгінің белок концентрациясын экстрополяция жолымен бағалануы BSA концентрациясы анықталған қалыпты тізбек арқылы жасалынды.

2.2.3 Тәжірибе үлгілерін дайындау және оларға Вестерн-блоттинг анализін жүргізу

Вестерн-блоттинг анализі ми, бүйрек және бұлшық еттердің гомогенаттарында жүргізілді. Барлық тәжірибелі үлгілерді А буферінде (50 мМ Трис-НСІ, 1% Тритон X-100, 1 мМ дитиотрейтол, рН 7,6, протеаза ингибиторы (Protease cocktails-inhibitors) шыны-тефлон гомогенизаторында 5 секундтан үш рет 1100 айн/мин ұсақталынды. Гомогенаттарды ультрадыбыстық өңдеуден кейін 5 минут бойы 4°C 1000 g центрифугада айналдырып, нәтижесінде алынған супернатантты Вестерн-блоттинг анализінде қолданылды. Тәжірибелі үлгі экстракттарынан алынған 60 мкг белоктарға 12%-дық Mini-PROTEAN TGX™ (Bio-Rad) гель-жиынтығында электрофорез mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) жүйесін қолдана отырып, жүзеге асырылды.

Барлық тәжірибелерде белоктар 0,45 мкм PVDF мембранасы арқылы транс-блот (Trans-Blot, Bio-rad) құралы арқылы тасымалданды. Алынған мембранадағы үлгіні 30 мин бойы нысанды антиденелермен (antimouse) әрекеттестіріліп шейкерге қойылды. Содан кейін 10 мин үш рет натрий фосфаты буферімен (PBS) шейкерге қойылып шайылды.

Белок-антидене әрекеттесулері тәжірибеде тышқанның IgG антидене мен пероксидазаның конъюгациясынан Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection реагенті (GE Healthcare, Бакингемшир, Великобритания) көмегімен анықталды. Диапазонның сандық анықтамалары Image Station 2000R (Kodak, Испания) және Kodak 1D 3.6 бағдарламасымен жүргізілді.

2.2.4 Тышқан ұлпаларындағы CoQ₉ мен CoQ₁₀ дәрежесінің сандық көрсеткіштерін анықтау

Ұсақталған (гомогенизацияланған) ұлпалардан липидтерді бөліп алуан кейін CoQ₉ мен CoQ₁₀ көлемдерін кері фазалық жоғары эффективті сұйық хроматография (ЖСХ) көмегімен анықталынды. Нәтижелер нг CoQ/мг көрсеткіштермен берілген (73).

Хинондарды ұлпалардан бөліп алу әдісі. Хинон экстракциясы ұлпалардың 10-40 мг көлемімен жүргізілді. Барлық сынамалы үлгілер 1100 айн/мин шыны-тефлон гомогенизаторында (Stuart Scientific) және оған 350 мкл MilliQ суы қосылып, бірге ұсақталынды. Алынған гомогенаттағы митохондриялық мембраналарды жою үшін оны ультрадыбыспен (Sonuplus HD-2070) өңделді. Белоктар концентрациясын анықтауға 10 мкл (Бредфорд әдісі) алынды. Ал, 50 мкл аликвотаға 950 мкл пропанол-1 қосылды. Алынған қоспаны 2 минут бойы вортексте араластырып, 5 минут бойы 11300 g жылдамдықта центрифугада айналды. Хроматографиялық анықтауларға 200 мкл супернатантты қолданып, ЖСХ ампулаларына енгізілді (ұлпаның түріне байланысты қосымша пропанол-1-мен сұйылту қажеттілігі болады).

2.2.5 Нативті электрофорез әдісімен (BNGE) суперкомплексдерді анықтау

2.2.5.1. Тышқан ұлпаларындағы митохондрия фракцияларын (бөліктерінде) нативті электрофорез арқылы бөліп алу

Нативті электрофорез тышқан ұлпаларының митохондриялық фракцияларында жүргізілді. Митохондрияны бөліп алу әдісі протокол бойынша жасалды (74,75). Тәжірибелі топтағы тышқандардың миы, бүйректері мен бұлшық еттерін тез арада бөліп алып, физиологиялық ерітіндімен шайып, шыны-тефлон гомогенизаторымен ұсақталынды (Stuart scientific). Бүкіл экстракция процесі қалыпты 4°C температурасында жүзеге асырылды. Әрбір ұлпаны ұсақтау үшін қажетті буфер қолданылды. Бүйректе, 320 mM сахароза, 1 mM EDTA және Tris-10 mM HCl, pH 7.4; ал мида бүйректе қолданылған буферге қосымша құрамында майлы қышқылдары болмайтын 0.2% альбумин; бұлшық еттерге 120 mM KCl, 20 mM HEPES, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA және майлы қышқылдары болмайтын 0.5% альбумин, pH 7.4 жағдайында 600 айн/мин шыны-тефлон гомогенизаторымен ұсақталынды.

Ми мен бүйректен алынған гомогенаттарды 5 минут бойы 1000 айн/мин-да центрифугада айналды. Бөлініп алынған супернатантты 2 минут бойы 14400 айн/мин-да 2 рет центрифугада айналдырғаннан кейін митохондриялардың тұнбасын алынды. Бұлшық еттерінің гомогенаты 10 минут бойы 600 g жылдамдықта центрифугада айналды. Супернатант (S1) мұздың үстінде сақталып, әрі қарай алынған тұнбаны суспензиялап да 10 минут бойы 600 g жылдамдықта центрифугада айналдырылды. Алынған супернатантты (S2) бастапқыға супернатантқа (S1) қосып, бірге 10 минут бойы 17000 g/мин центрифугада айналды. Бұлшық еттен бөлінген тұнбаны қоректік ортаның 10 есе көлемінде қайтадан суспензиялап, 10 минут бойы 7000 g/мин центрифугада айналдырылды. Жаңа тұнбаны 300 mM сахароза, 2 mM HEPES мен 0.1 mM EGTA қоректік ортада суспензиялайды да 10 минут бойы 3000 g /мин центрифугада айналды.

Ұлпалардың митохондриялық тұнбаларын 120 мкл қоректік ортада қайта суспензияланды. Әрбір тәжірибе үлгілерінен белокты анықтау үшін аз көлемде аликвота қалдырылып отырды, ал қалған бөлігі -80°C-та қолданысқа дейін сақталынды.

2.2.5.2. Нативті электрофорезге қажетті тәжірибе үлгілерін даярлау

Электрофорезге қажетті тәжірибе үлгілерін даярлау үшін 100 мкг митохондрия 3 мин бойы 4°C 17000 g жылдамдықпен центрифугада айналды. Митохондриялық гранулаларды 10 мкл арнайы митохондрияның қоректік ортасында суспензияланды (100 mM 6-аминогексонды қышқыл, Bis-50 mM Tris-HCl, pH 7.0), нәтижесінде митохондрияның ең ақырғы концентрациясы 10 мг/мл болды. Келесі кезекте мембраналық протеиндерді 4г/г дигитонин қосу арқылы ерітіп, мұздың үстінде 5 минут бойы қалдырылды. 30 мин бойы 4°C 17000 g/мин центрифугада айналдырғаннан кейін супернатантты басқа пробиркаға орналастырып, 3 мкл буфер (5% Serva Blue G-250, 100 mM 6-аминогексонды қышқыл) қосады, нәтижесінде тәжірибе үлгілері электрофорез геліне жүктелуіне даяр болды. Белоктар бір қатарға 100 мкг жүктелінді.

2.2.5.3. Денатурацияламайтын электрофорез.

Сынамалы үлгілерді жүктеп болғаннан кейін Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-rad) электрофорез жүйесінде жүзеге асырылды. Концентрациялы гельге белоктардың шығуы мақсатында электрофорезді 30 минут бойы 90 В-тен бастап, ажыратушы гельге белоктардың өте салысымен кернеуді 300 В-қа арттырып, 75 мин бойы жүргізілді. Бүкіл процесс бойына тоқтың күші 15 мА/гель шектеулі болды және 4°C төмен температурасы бар суық камерада жүргізілді.

Анализдің соңғы сатыларында кері әсерін тигізетін артық кумасси бриллиант көгін жою үшін А буферлі катод Б буферлі катодқа алмастырылды.

2.2.5.4. Орын алмастыру мен иммунодетекция.

Орын алмастыру мақсатында гель (метанолмен алдын ала 1 минут бойына шайылған) және мембрана қажетті буфермен (25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 20% метанол, рН 8.3) ылғалдандырылды.

Белоктар PVDF мембранасында (Immobilon®-P, Millipore) тұрақты 4°C температурасында 1 сағ бойы 100 В Trans-Blot (Bio-Rad) құралы арқылы жүзеге асырылды.

Орын алмастыру сәтті аяқталысымен иммунодетекция жүргізілді. Мұнда белок цитохром I с редуктазасының анти-убихинолдың арнайы антиденесі (Abcam, ab110252), сонымен қатар anti-VDAC1 (Abcam, ab14734) қолданылды. Алынған мембранадағы үлгіні 30 мин бойы нысанды антиденелермен (antimouse) әрекеттестіріліп шейкерге қойылды. Содан кейін 10 мин үш рет натрий фосфаты буферімен (PBS) шейкерге қойылып шайылды.

Белок-антидене әрекеттесулері тәжірибеде тышқанның IgG антидене мен пероксидазаның конъюгациясынан Amersham ECL™ Prime Western Blotting Detection реагенті (GE Healthcare, Бакингемшир, Великобритания) көмегімен анықталды. Диапазонның сандық анықтамалары Image Station 2000R (Kodak, Испания) және Kodak 1D 3.6 бағдарламасымен жүргізілді.

2.2.6 Глутатион концентрациясын анықтау әдісі

Глутатион арнайы флуорометриялық әдіспен өлшенді. Ұлпаның фракцияларын натрий фосфатты (А) буферінде (100 мМ натрий фосфат, 5 мМ EDTA-Na₂, рН 8.0) суспензияланды. Содан кейін мұзды 40% ТСА-да депротеинденіп, әрі қарай 15 минут бойы 20000 г/мин-да центрифугада айналды. Глутатионды өлшеу үшін супернатантты (А) ерітіндісінде және (В) ортофталъ альдегиді/этанол (1 мг/мл) ерітіндісінде 25°C 15 мин инкубацияланды. Тәжірибелі үлгілердің флуоресценциясын планшеттерді оқитын спектрофотометрде (Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) 340 нм мен 420 нм толқынында анықталды. Тотыққан глутатион өлшемін жүргізу барысында супернатантты алдын ала N-этилмалеимид ерітіндісінде (5 мг/мл) 40 минут инкубацияда ұстап, келесі кезекте 0.1N NaOH (С) ерітіндісінде сілтілендірілді. Бұл қоспалардың аликвоталарын (В) және (С) ерітінділерінде 15 мин бойы 25°C температурасында инкубацияланды. Флуоресценция ертеректе айтылып өткен әдіспен өлшенді. Қарапайым глутатион мен тотыққан глутатион

концентрациясы стандартты қисыққа негізделе отырып өлшенді де, олардың дәрежелері нмоль/мг белок көрсеткішімен белгіленді.

2.2.7 Нәтижелерді статистикалық өңдеу

Зертеу нәтижесінде алынған мәліметтер Prizm 6 Software (Graph Pad) бағдарламасымен жүргізілді. Excel қолданбалы бағдарламасында статистика әдістерімен өңделді. Стьюдент критерийі негізінде нақтылық мәні анықталды. Мәліметтер орташа арифметикалық шамалар, стандартты ауытқулар түрінде ақпарат берілді. Зерттеу жұмыстары 3-4 қайталаумен жүргізілді.

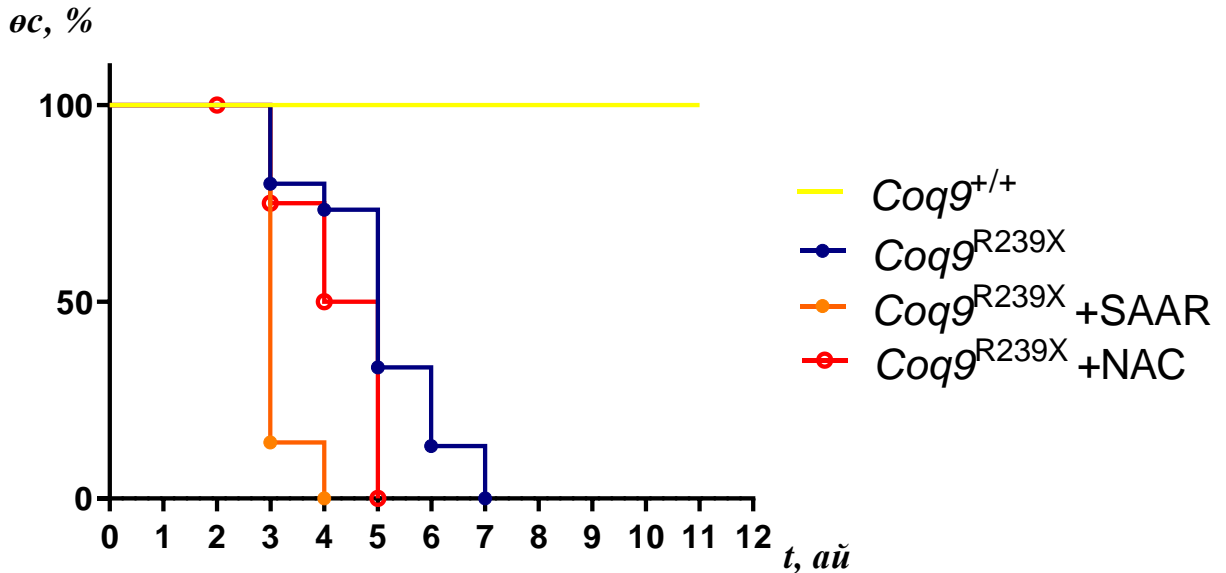
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ

3.1 Coq жетіспеушілігі бар тышқандардың фенотиптік сараптамасын анықтау

Диссертациялық жұмыстың қойылған міндеттеріне сәйкес, зерттеуіміз ең бірінші Coq жетіспеушілігі бар тышқандардың фенотиптік сараптамасын анықтауға бағытталды.

Coq^{R239X} тышқандарына құрамында әртүрлі күкіртті аминқышқылы бар тағам рационы берілді: 1 тәжірибелік топқа - 0,6% метионин, 0,42% цистин, 2 тәжірибелік топқа құрамы SAAR - 0,15% метионин. Үшінші тәжірибелік топқа бақылау тамағын және суға 1% N-ацетил-L-цистеин қосылып берілді.

Зерттеулерді жүргізу нәтижесінде қолданылған рациондардың тәжірибелік топтарға әсер етуі әртүрлі деңгейде көрінетіні белгілі болды. 11 суретте өмір сүрудің жалпы пайыздық деңгейі көрсетілген.



Абцисс өсі: *t* - айлар берілген; ординат өсі: % - өмір сүру пайызы. Тәжірибе 1 ай жас шамасында басталды: *Coq9^{+/+}* (*n* = 50), *Coq9^{R239X}* *n* = 40, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелік тышқандар *n* = 35, *Coq9^{R239X}+NAC* тобы *n* = 35. Мантель-Кокс (log-rank) және Гехан-Бреслоу-Вилкоксон тесттерін пайдалана отырып жасалған сараптама: *Coq9^{R239X}* тышқандары мен *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелік тышқандар (*P* < 0.0006 және *P* < 0.0012, сәйкесінше); *Coq9^{R239X}* тышқандары *Coq9^{R239X}+NAC* тәжірибелік тышқандар (*P* = 0.0906 және *P* = 0.1784, сәйкесінше) арасындағы біршама айырмашылықтарды көрсетті.

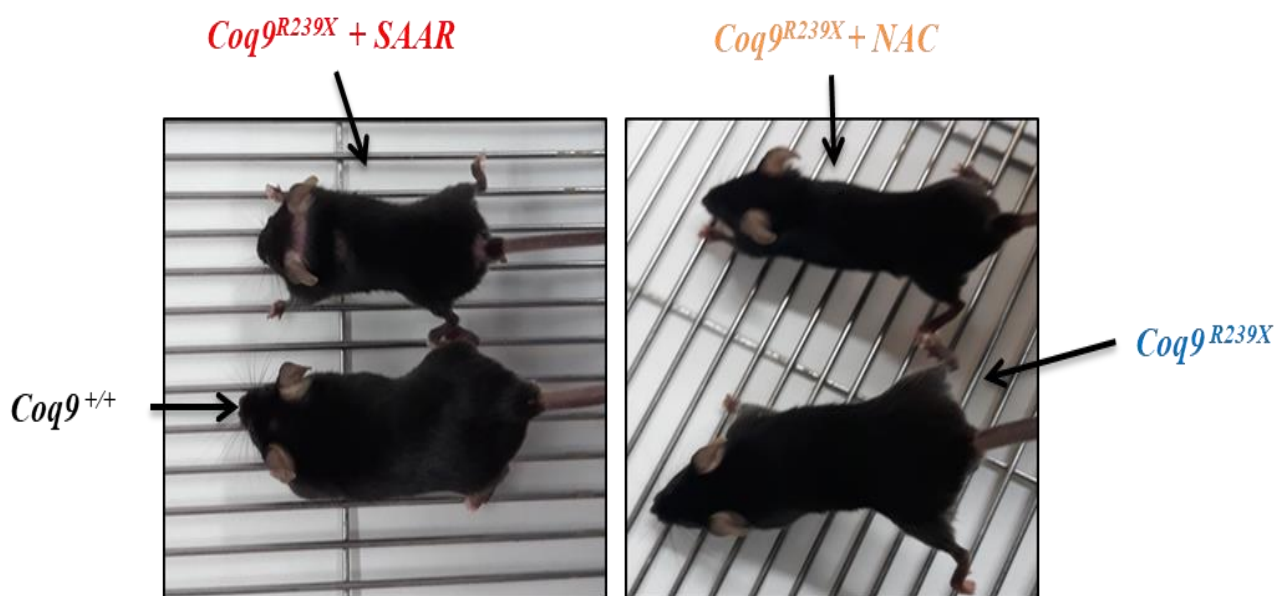
Сурет 11 – *Coq9^{+/+}* тышқандарының, *Coq9^{R239X}* тышқандарының және *Coq9^{R239X}* тышқандарын SAAR немесе NAC өңдеуінен кейінгі өмір сүрудің орташа пайыздық деңгейі

Тәжірибеде өңдеу жолы бірінші айдан, тышқандарды бөлу сәтінен басталды. Жалпы *Coq9^{R239X}* гомозиготалы тышқандардың өмір сүру ұзақтығы жеті айға созылды. Ал, алғашқы үш айдан бастап өле бастады. Бұл тышқандарға қалыпты түрде виварий жағдайында қолданылатын тамақ пен су беріліп отырды.

Құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағам берілген мутант тышқандар стандартты тағам берілген мутант-тышқандармен салыстырғанда ертерек өлген. N-ацетил-L-цистеинді суға қолдану арқылы берілген тышқан топтары бес айға дейін тіршілік еткен. Бұл дегеніміз, басқа тәжірибе тобына қарағанда $Coq9^{R239X}+NAC$ тәжірибелік тышқандардың өмір сүру ұзақтығы екі ай артық екенін көруімізге болады (сурет 11).

12 суретте тәжірибеде қолданылған $Coq9^{+/+}$ бақылау тобы және $Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X} + NAC$, $Coq9^{R239X} + SAAR$ тәжірибе топтарының фенотиптік көрінісі көрсетілген. Фенотиптік көрініс бойынша $Coq9^{R239X}+SAAR$ тәжірибелі топ тышқандарында басқа топпен салыстырғанда жүннің түсуі бірден байқалады.

$Coq9^{R239X}$ тышқандарда, тағам құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген $Coq9^{R239X}+SAAR$ тышқан топтарында және N-ацетил-L-цистеинді (NAC) қолданған $Coq9^{R239X} + NAC$ тышқан топтарында еркек және ұрғашы тышқандардың $Coq9^{+/+}$ тышқандарымен салыстырғанда дене өлшемі мен массасы аз болды. Бұл айырмашылықтар алғашқы айларында байқалды және одан кейінгі айларда айқын көріне бастады. Құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) өңдеу және N-ацетил-L-цистеинді (NAC) терапия ретінде қолдану дене массасының төмендеуіне ықпал етті және $Coq9^{R239X}$ тышқандарының өмір сүргіштігін арттырмады.



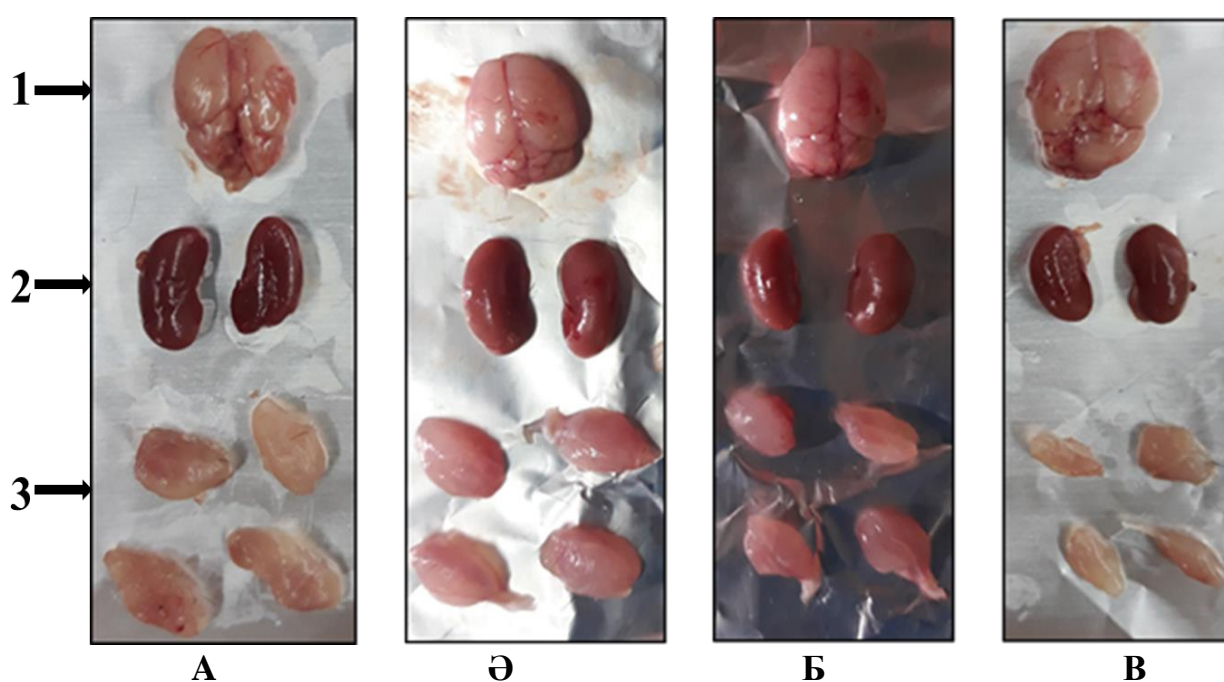
Сурет 12 – $Coq9^{+/+}$, $Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X} + NAC$ және $Coq9^{R239X} + SAAR$ тышқандарының фенотиптік көрінісі

Құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) және N-ацетил-L-цистеинді өңдеудің әсерін ұлпалар негізінде бақылауға болады.

$Coq9^{R239X} + SAAR$ топ тышқандарының бас миының көлемі $Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X} + NAC$ топтарына қарағанда үлкен, ал $Coq9^{+/+}$ бақылау тобымен салыстырғанда бірдей шамада. $Coq9^{R239X}$ тышқан тобы бас миының көлемі $Coq9^{R239X} + NAC$ тышқан тобына қарағанда үлкен, бірақ $Coq9^{R239X} + SAAR$ және $Coq9^{+/+}$ тышқан топтарымен салыстырғанда салмағы аз болды.

Жұмыс барысында әрбір тышқан топтарының бүйректері де фенотиптік көрінісі бойынша салыстырылды. *Coq9^{+/+}* бақылау тобы бүйрек салмағы *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X} + NAC*, *Coq9^{R239X} + SAAR* тәжірибе топтарына қарағанда көлемді болды. *Coq9^{R239X}* тышқан тобының бүйрек көлемі *Coq9^{R239X} + NAC*, *Coq9^{R239X} + SAAR* тышқан топтарына қарағанда салмағы жоғары, ал *Coq9^{+/+}* бақылау тобымен салыстырғанда төмен болды. Тәжірибелік топ *Coq9^{R239X} + NAC* бүйрек салмағы *Coq9^{R239X} + SAAR* тобынан жоғары болса, *Coq9^{+/+}* бақылау тобымен және *Coq9^{R239X}* тәжірибелік топпен салыстырғанда төмен болды. Барлық топ тышқандарын салыстырғанда бүйрек көлемі ең кіші салмақты *Coq9^{R239X} + SAAR* тәжірибелік топта анықталды.

Тәжірибе барысында аяқ бұлшық ет ұлпалары да зерттелді. 13 суретте көрсетілгендей салыстырмалы түрде *Coq9^{+/+}* бақылау топта ең көлемді бұлшық ет ұлпалары анықталды.



А-*Coq9^{+/+}*, Ә-*Coq9^{R239X}*, Б-*Coq9^{R239X} + NAC*, В-*Coq9^{R239X} + SAAR*

Сурет 13 – Фенотиптік көрінісіне байланысты тәжірибеде қолданылатын ішкі органдары (1-ми, 2-бүйрек, 3-бұлшық ет)

Coq9^{R239X} + SAAR тәжірибе тобының бұлшық ет салмағы *Coq9^{+/+}* бақылау тобы және *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X} + NAC*, *Coq9^{R239X} + SAAR* тәжірибелік топтармен салыстырғанда ең кіші көлемді көрініс көрсетті. Ал *Coq9^{R239X} + NAC* тышқан тобының бұлшық ет салмағы *Coq9^{+/+}* бақылау тобы және *Coq9^{R239X}* тәжірибе тобына қарағанда төмен болса, *Coq9^{R239X} + SAAR* тобымен салыстырғанда жоғары болды.

Қорыта келгенде, тәжірибеде қолданған SAAR өндеуінен өткен *Coq9^{R239X}* тышқан топтарының бүйрегі мен бұлшық еттерінің көлемі бақылау тобының тышқандармен салыстырғанда аз салмақта болғандығы байқалды.

3.2 CoQ жетіспеушілігі кезінде сульфидхиноноксиредуктаза (SQOR) деңгейіне құрамында күкірті бар аминқышқылдар сіңімділігінің әсері

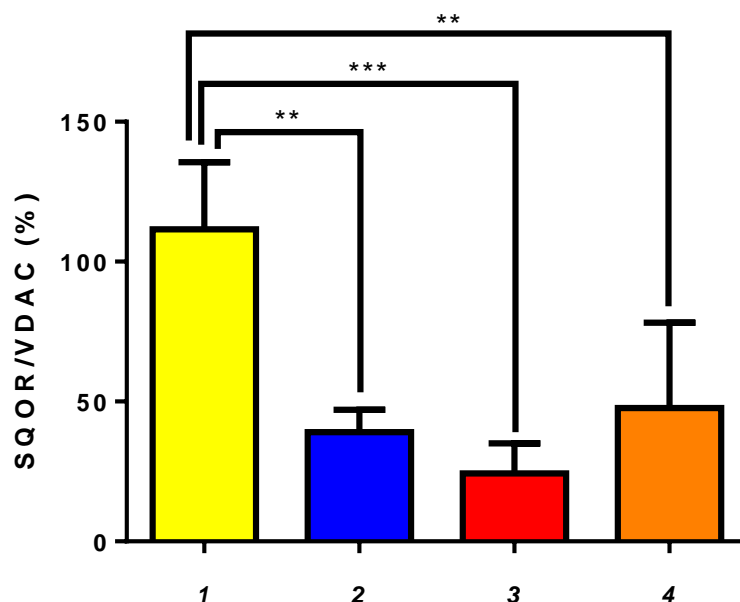
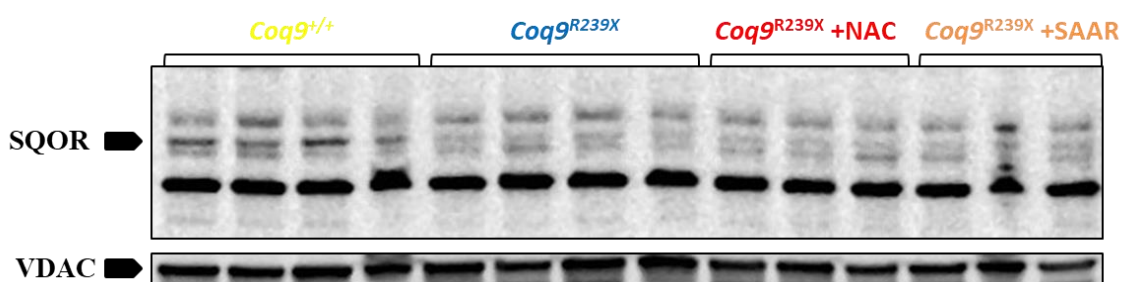
CoQ жетіспеушілігі барысында сульфидті метаболизм жолының бұзылысы тотығу стресіне, яғни бос радикалдардың көбеюіне алып келеді. Митохондрия сульфидтерінің тотығу жолында сульфидхиноноксиредуктаза (SQOR) катализдейтін реакциядағы электрондардың CoQ акцепторы болып табылады. CoQ жетіспеушілігі H_2S тотығу жолындағы бірінші фермент - сульфидхиноноксидоредуктазаның деңгейін төмендетеді. Осылайша, SQOR төмендеуі H_2S тотығуының бұзылуына, яғни H_2S жинақталуына және глутатион жүйесінің жетіспеушілігіне әкеледі.

Сондықтан да бұл жол күкірті бар аминқышқылының метаболизмімен байланысты болғандықтан, CoQ жетіспеушілігі кезінде сульфидхиноноксиредуктаза деңгейіне құрамында күкірті бар аминқышқылдар сіңімділігінің әсері бағаладық.

Зерттеулердің келесі сатысында *Coq9^{+/+}* бақылау тышқандары және *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}* + NAC және *Coq9^{R239X}* + SAAR тәжірибе топ тышқандарының бас миы, бүйректегі және бұлшықет ұлпаларындағы сульфидхиноноксиредуктазаның деңгейі анықталды.

SQOR ақуыз деңгейі *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}* + NAC және *Coq9^{R239X}* + SAAR тәжірибелік топтардың барлығында бақылау тобымен салыстырғанда ми ұлпаларындағы көрсеткіштері төмен болды. Яғни, *Coq9^{R239X}*+NAC тышқан тобы салыстырмалы түрде *Coq9^{R239X}* және *Coq9^{R239X}*+SAAR тышқан топтарына қарағанда SQOR ақуыз деңгейінің әлсіз сызықты көрінісін байқауымызға болады. Бұл жағдайда ми ұлпаларының митохондриялық фракциялары қолданылды. Себебі бас ми ұлпасының өзін қолданғанда ешқандай дәлдік нәтиже көрсетпеді. Бас ми ұлпасы өте нәзік сезімтал болғандықтан, митохондрия фракцияларын қолдану барысында бас ми ұлпасындағы SQOR ақуыз деңгейінің жалпы көрсеткіші анықталынды (сурет 14).

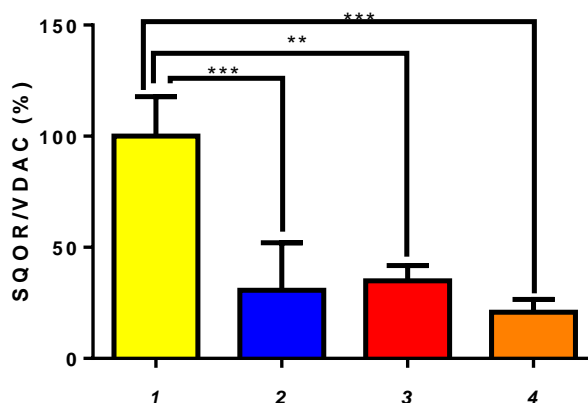
Coq9^{+/+} бақылау тышқандарының SQOR ақуыз деңгейі қалған топқа қарағанда, қалыпты көрсеткіші анықталды. *Coq9^{R239X}*+SAAR тышқан топтары қалған екі тәжірибелік топқа қарағанда көрсеткіштері жоғары мәнге ие болды. Құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) өңделген тышқан тобы негізгі тәжірибелік топпен салыстырғанда көрсеткіштің мәні жоғары, яғни оң әсерін байқадық.



Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR). Ординат осі: SQOR/VDAC арақатынасы - %. SQOR Вестерн-блоттинг мидағы ақуыздың төмен деңгейіне байланысты оқшауландырылған церебральды митохондрияларда жүзеге асты. VDAC ақуызы бақылау ретінде қолданылды. Орташа мәндермен жинақталған \pm SD, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4).

Сурет 14 – Тышқанның ми ұлпасының митохондрия фракцияларындағы SQOR ақуыз деңгейі

15 суретте көрсетілгендей бүйрек ұлпасындағы SQOR ақуыз деңгейінің көрсеткіші бақылау тобы *Coq9*^{+/+} тышқандарында тәжірибелік топтармен *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} + NAC, *Coq9*^{R239X} + SAAR салыстырғанда мәні жоғары болды. Мұнда, *Coq9*^{R239X} тышқандарына қарағанда *Coq9*^{R239X} + NAC тышқандарында аз ғана көрсеткіштің жоғарылағандығы анықталды. Бұл жағдайда N-ацетил-L-цистеинмен өндеудің оң әсерін байқауға болады. Ал құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) өңделген *Coq9*^{R239X} + SAAR тышқан топтары *Coq9*^{R239X} тышқандарымен салыстырғанда төмендеген. Бас ми ұлпасы мен бүйрек ұлпасын салыстыра отырып, N-ацетил-L-цистеинмен өндеу бүйрек ұлпасында жақсы көрсеткіш көрсетсе, ми ұлпасында төмендеген, ал тағамның құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) өңделген топпен салыстырса ми ұлпасының митохондрия фракцияларында жоғары, ал бүйрек ұлпасында төмен көрсеткіштер анықталды (сурет 14, 15).

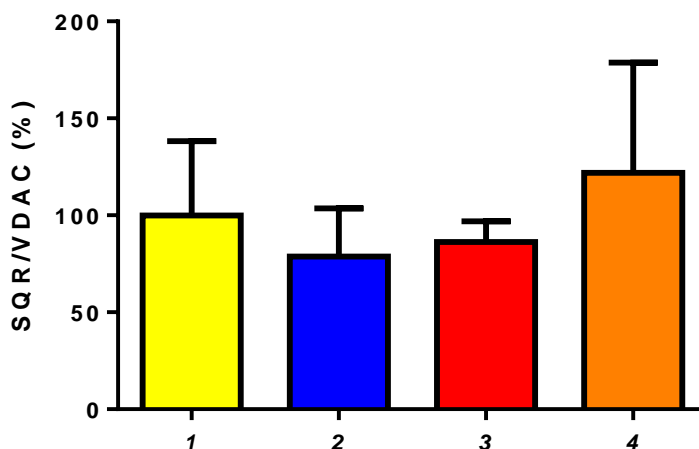


Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9^{+/+}*), 2-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}*), 3-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + SAAR). Ординат осі: SQOR/VDAC арақатынасы - %. VDAC ақуызы бақылау ретінде қолданылды. Орташа мәндермен жинақталған \pm SD, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-5).

Сурет 15 – Тышқанның бүйрек ұлпаларындағы SQOR ақуыз деңгейі

SQOR ақуыз деңгейі *Coq9^{R239X}* және *Coq9^{R239X}*+NAC тышқандарындағы бұлшықет ұлпаларындағы *Coq9^{+/+}* тышқандарымен салыстырғанда төмендесе, ал *Coq9^{R239X}*+SAAR тышқан тобының көрсеткіші жоғары болды. Дегенмен, *Coq9^{R239X}* тышқандарынан SQOR деңгейінің төмендеу тенденциясы байқалды, ал бұлшықеттерде айтарлықтай айырмашылықтар болмады (сурет 16).

Тышқан миының митохондриялық фракцияларында және бүйрек, бұлшықет ұлпаларындағы SQOR ақуыз деңгейін нақтылау мақсатында VDAC (Voltage Dependent Anionic Channel) ақуызы бақылау ретінде қолданылды. VDAC кернеуге тәуелді анионды каналдар немесе митохондриялық пориндер - бұл сыртқы митохондриялық мембранада орналасқан ақуызды иондық каналдарының класы. Тәжірибеде VDAC ақуызын бақылау ретінде қолдану себебіміз, тәжірибенің дұрыстылығы анықталынды және дәлдік көрсеткіші алынды.



Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9^{+/+}*), 2-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}*), 3-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + SAAR). Ординат осі: SQOR/VDAC арақатынасы - %. VDAC ақуызы бақылау ретінде қолданылды. Орташа мәндермен жинақталған \pm SD (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4).

Сурет 16 – Тышқанның бұлшықет ұлпаларындағы SQOR ақуыз деңгейі

Қорыта келгенде, CoQ жетіспеушілігі SQOR деңгейі мен белсенділігінің төмендеуіне әкелетіні белгілі болды, бұл өз кезегінде митохондриялық сульфидтер алмасуының өзгеруіне алып келді. Мидың митохондриялық фракцияларында SQOR деңгейі SAAR-мен өңделген топтарына оң нәтиже бергендігі анықталды. Ал, бүйрек ұлпасында *Coq9^{R239X}*+NAC тобына оң әсері байқалды. Бұлшықет ұлпасындағы SQOR деңгейі берілген өндеулердің *Coq9^{R239X}* + NAC, *Coq9^{R239X}* + SAAR топтарында *Coq9^{R239X}* тәжірибелік тобына қарағанда оң әсер еткендігі анықталды.

3.3 Цистатионин- γ -лиаза (CSE) және цистатионин- β -синтаза (CBS) деңгейіне құрамында күкірті бар аминқышқылдардың әсері

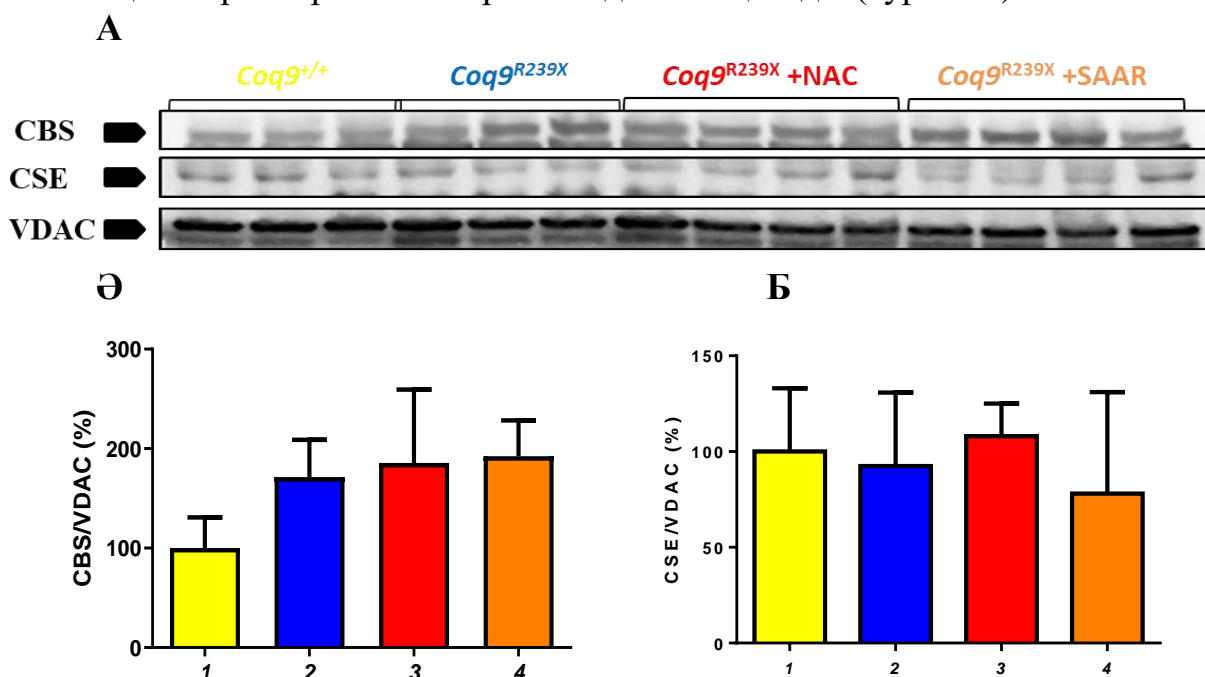
Митохондрия АТФ-ң тотығу фосфорлану арқылы түзілетін эукариоттық жасушалардың қуат көзі болып табылады. Ал, күкіртті сутегінің метаболизмі энергия алу құралы ретінде қызмет ете алады. H₂S - газ модуляторы (азот оксиді мен көміртегіге ұқсас) болып табылады. H₂S цистеиннің катаболизмі арқылы цитоплазмалық ферменттер цистатионин- β -синтаза (CBS), цистатионин- γ -лиаза және 3-меркаптопируват сульфотрансфераза эндогендік жолмен түзіледі (3-MCT). CBS негізінен жүйке жүйесінде, бүйректе және бауырда белсенді.

H₂S метаболикалық қажеттіліктерді күрт төмендете алатыны көрсетілді. Цистатионин- β -синтаза (CBS) және цистатионин- γ -лиаза (CSE) сүтқоректілердегі H₂S-нің бастапқы биологиялық көзі болып есептеледі және транссульфурация жолындағы рөлі де маңызды орынды алады. Цистатионин γ -лиаза цистеиннен H₂S-ін өндіреді. Цистатионин- β -синтаза H₂S-ің түзілісі цистеин мен гомоцистеиннің

конденсациясынан жүреді. Ал үшінші кезекте цистеинаминотрансфераза мен 3MST (3-меркаптопируват сульфотрансфераза) комбинациялы әсерімен цистеиннен алына алады. Сүтқоректілерде H₂S газ тәрізді таратқыш ретінде жұмыс істейді және бірнеше физиологиялық процестерді реттеп отырады.

Митохондрияның H₂S тотығу жолы тікелей транссульфурация жолымен байланысты болғандықтан, цистатионин-β-синтаза және цистатионин γ-лиаза деңгейлерінің сандық мөлшері қарастырылды.

Цистатионин-β-синтаза деңгейі ми ұлпаларындағы *Coq9*^{+/+} бақылау тобы көрсеткіші *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X}+NAC, *Coq9*^{R239X}+SAAR тәжірибелік топтармен салыстырғанда төмен болды. Ми ұлпаларындағы цистатионин γ-лиаза деңгейлерінің сандық мөлшері *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X}+SAAR тәжірибе топтарында *Coq9*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда төмен болса, ал *Coq9*^{R239X}+NAC тобының жоғары көрсеткіш көрсеткендігі анықталды (сурет 17).



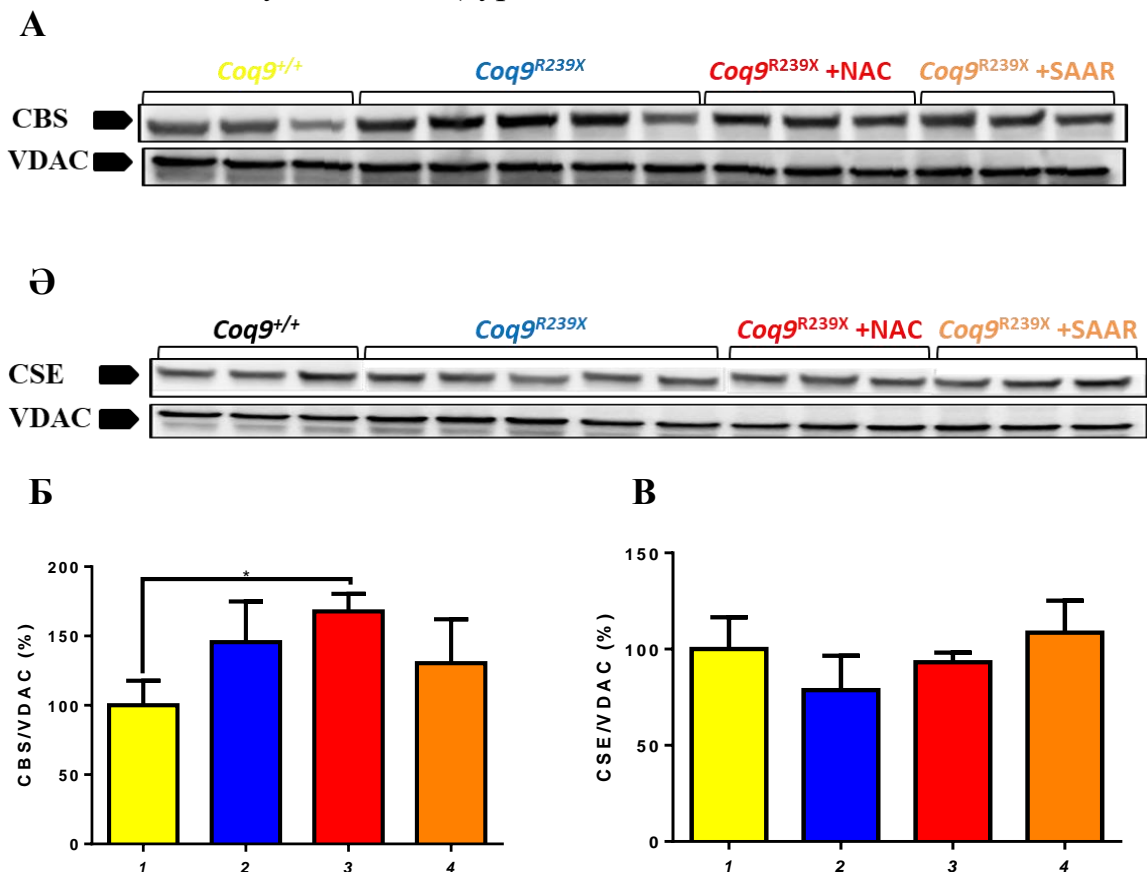
А) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың ми ұлпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі;

Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған ± SD мәліметтер (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR). Ординат осі: CBS/ VDAC және CBS/ VDAC арақатынасы - %. VDAC ақуызы бақылау ретінде қолданылды.

Сурет 17 – Бақылау тобы *Coq9*^{+/+} тышқандарының, тәжірибелік топтар *Coq9*^{R239X} тышқандары және SAAR, NAC өңдеу жүргізілген тышқандардың ми ұлпаларындағы CBS және CSE деңгейін анықтау

Бүйрек ұлпаларындағы цистатионин-β-синтаза деңгейі *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X}+NAC, *Coq9*^{R239X}+SAAR тәжірибелі топтарын *Coq9*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда жоғары болды.

Бүйрек ұлпаларындағы цистатионин γ -лиаза деңгейінің сандық мөлшері $Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X}+NAC$ тәжірибелік тобында $Coq9^{+/+}$ бақылау тобымен салыстырғанда төмен болса, ал $Coq9^{R239X}+SAAR$ тәжірибе тобында жоғары көрсеткіші анықталды. Яғни, құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) тышқандарды өңдеу нәтижесі бүйрек ұлпасында қалыпты реттелгендігін байқауға болады (сурет 18).



А, Ә) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың бүйрек ұлпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер *P < 0.05 (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-5). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы ($Coq9^{+/+}$), 2-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X}$), 3-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X} + NAC$), 4-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X} + SAAR$). Ординат осі: CBS/VDAC және CSE/VDAC арақатынасы - %. VDAC ақуызы бақылау ретінде қолданылды.

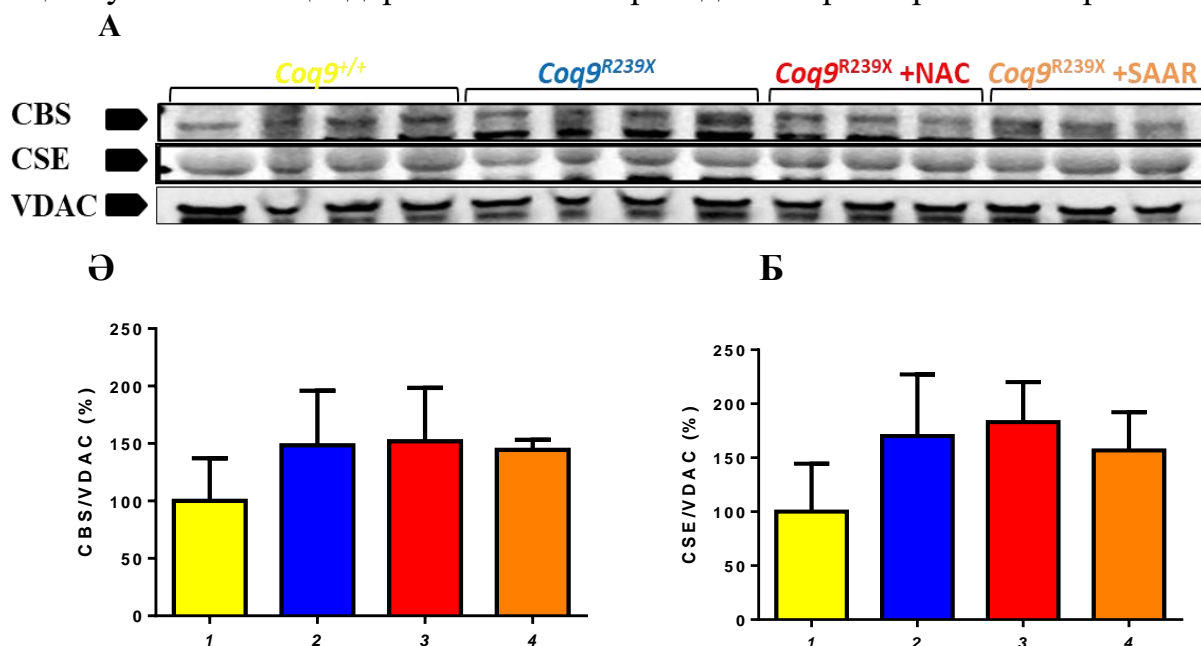
Сурет 18 – Бақылау тобы $Coq9^{+/+}$ тышқандарының, тәжірибелік топтар $Coq9^{R239X}$ тышқандары және SAAR, NAC өңдеуден кейін тышқандардың бүйрек ұлпаларындағы CBS және CSE деңгейін анықтау

Тышқандардың ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларындағы цистатионин- β -синтаза және цистатионин γ -лиаза деңгейлерін нақтылау мақсатында VDAC ақуызы бақылау ретінде қолданылды.

Бұлшықет тіндеріндегі цистатионин- β -синтаза және цистатионин γ -лиаза деңгейлерінің сандық мөлшері анықталды. Алынған нәтижелер екі жағдайда бірдей мәндер көрсетті. N-ацетил-L-цистеинмен өңдеу және құрамында күкіртті

амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) тышқандарды өңдеу гетерозиготалы тәжірибелік топтағы тышқандарға ешқандай әсер етпеді.

19 суретте цистатионин-β-синтаза және цистатионин γ-лиаза ақуыз деңгейлері *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибе топтарында және *Coq9^{+/+}* бақылау тобы тышқандарымен салыстырғанда жоғары көрсеткіш көрсетті.



А) СоQ жетіспеушілігі бар тышқандардың бұлшықет ұпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер *P < 0.05 (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9^{+/+}*), 2-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}*), 3-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}+NAC*), 4-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}+SAAR*). Ординат осі: CBS/VDAC және CSE/VDAC арақатынасы - %. VDAC ақуызы бақылау ретінде қолданылды.

Сурет 19 – Бақылау тобы *Coq9^{+/+}* тышқандарының, тәжірибелік топтар *Coq9^{R239X}* тышқандары және SAAR, NAC-пен өңдеуден кейінгі тышқандардың бұлшықет тіндеріндегі CBS және CSE деңгейінің Вестерн-блот-анализі

СоQ жетіспеушілігі бар тышқандардың негізгі белгісі ми және бұлшықет қызметтерінің бұзылысынан басталады.

Өмірлік маңызды молекула СоQ тапшылығы негізгі функцияларының гетерогенді клиникалық митохондриялық бұзылыстарына байланысты бес негізгі фенотиптік көрінісіне сай топтастырылған: (1) энцефаломиопатия және қайталанатын миоглобинурия, (2) энцефалопатия-балалық шақтағы көпжүйелі бұзылыстар, әдетте нефропатиямен байланысты және басқа мүшелердің ауыспалы зақымдануы, (3) церебральды атрофиямен атаксиялық синдром, (4) оқшауланған миопатия және (5) стероидқа төзімді нефротикалық синдром [100].

Қорытындылай келе, СоQ жетіспеушілігі кезінде H₂S-нің бастапқы биологиялық көзі болып цистатионин-β-синтаза (CBS) және цистатионин-γ-лиаза (CSE) деңгейі бұлшықет ұпасында оң нәтиже бермегендігі анықталды. CSE деңгейі ми ұлпаларында тәжірибелік топ *Coq9^{R239X}+NAC* және CBS деңгейінің бүйрек ұлпаларында оң нәтиже бергендігі көрсетілді.

3.4 Күкіртті амин қышқылдарының глутатион жүйесіне әсері

Митохондрия оттегінің белсенді формаларының бір мезетте негізгі өндірушілері және нысандары болып табылады. Митохондрияны ОБФ-нан қорғайтын көптеген антиоксиданттардың ішінде глутатион (GSH) органеллалардың антиоксиданттық қызметі үшін өте маңызды деп саналады.

Осылайша, диетадағы күкірт амин қышқылдарының қол жетімділігінің глутатион жүйесіндегі әсерін анықтау үшін, GSH және GSSG деңгейлерін өлшедік [161].

Тәжірибеде GSH деңгейі *Coq9^{+/+}* бақылау тобында *Coq9^{R239X}* тышқан тобымен салыстырғанда жоғары, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелі топтарымен салыстырғанда көрсеткіштері төмен болды. Ал GSH деңгейі *Coq9^{R239X}+NAC* тәжірибелік топты *Coq9^{+/+}* бақылау тобы және *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелік топтармен салыстырғанда ең жоғарғы көрсеткіш көрсетті. Құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) өңделген тышқан топтарының GSH деңгейі *Coq9^{+/+}* бақылау тобы және *Coq9^{R239X}* тәжірибе тобымен салыстырғанда жоғары, ал *Coq9^{R239X}+SAAR* тышқан тобымен салыстырғанда төмен болды.

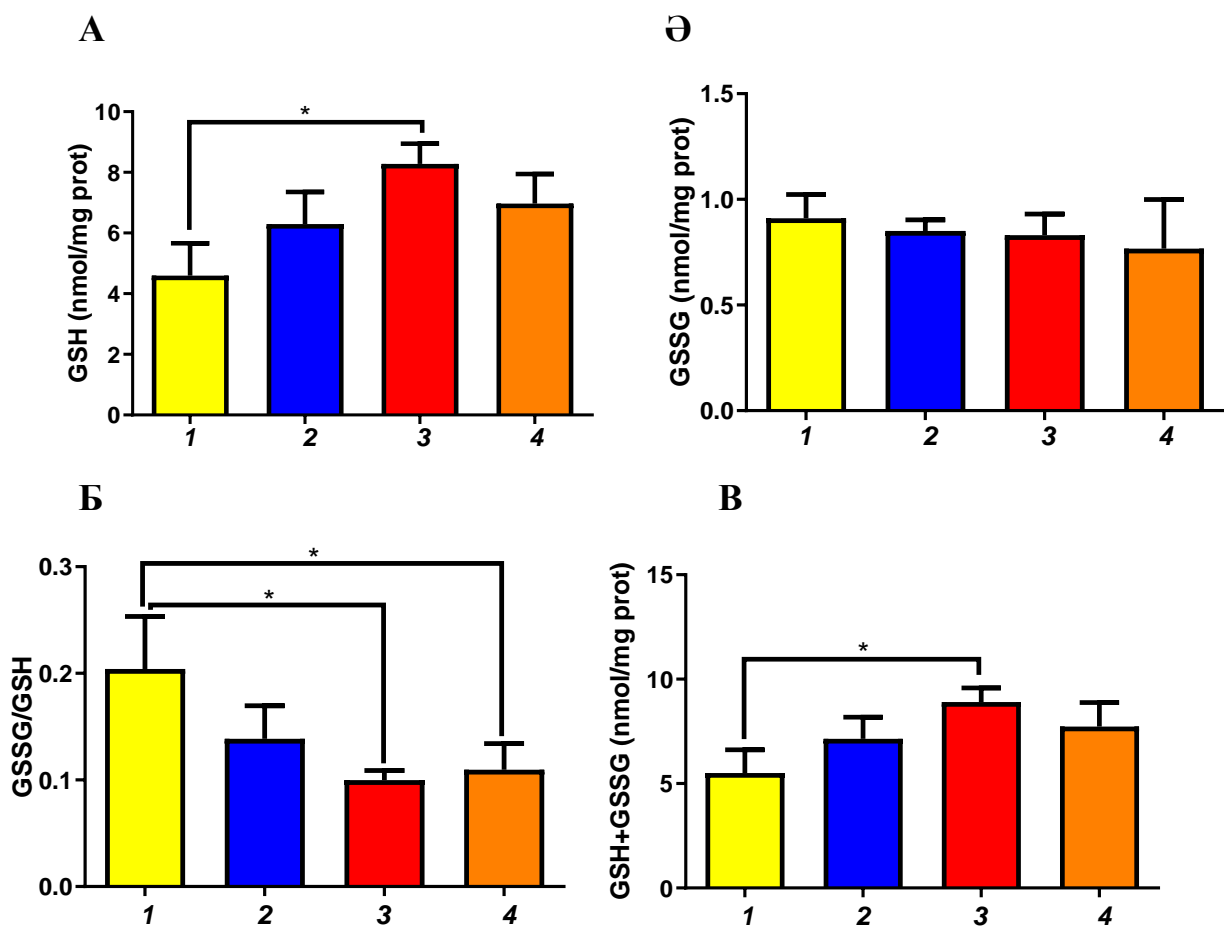
Зерттеудегі GSSG деңгейі *Coq9^{R239X}+NAC* тышқан тобында *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+SAAR* топтарымен салыстырғанда көрсеткіші төмен болды. GSSG деңгейін анықтауда ең жоғары көрсеткіш *Coq9^{R239X}* тәжірибе тобында көрсетілді. GSH/GSSG қатынасы *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+SAAR* топтарда *Coq9^{R239X}+NAC* тышқан тобымен салыстырғанда әлдеқайда төмен көрсеткіш көрсетті. GSH+GSSG деңгейлерінің қосындысы *Coq9^{R239X}* тышқан тобында *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тышқан топтармен салыстырғанда төмен көрсеткіш көрсетсе, ал *Coq9^{R239X}+NAC* тышқан тобы *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тышқан топтарымен салыстырғанда жоғары деңгейді көрсетті (сурет 20).

Жұмыс барысында бүйрек ұлпасындағы глутатион жүйесі қарастырылды. Тәжірибеде бүйрек ұлпасындағы GSH деңгейі *Coq9^{+/+}* бақылау тобында *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелі топтарымен салыстырғанда жоғары ($P \leq 0.05$) болды. Ал *Coq9^{R239X}+SAAR* тышқан тобында GSH деңгейі *Coq9^{+/+}* бақылау тобы және *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC* тәжірибе топтарына қарағанда төмен көрсеткіш көрсетті.

Зерттеудегі GSSG деңгейі *Coq9^{+/+}* бақылау тобы тәжірибелі топтарымен (*Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR*) салыстырғанда $P \leq 0.001$ шамада жоғары болса, ал *Coq9^{R239X}* тәжірибе тобымен салыстырғанда $P \leq 0.01$ шамада жоғары болды.

GSH+GSSG деңгейлерінің қосындысы *Coq9^{+/+}* бақылау тобында *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелі топтарымен салыстырғанда $P \leq 0.05$ шамада жоғары көрсеткіш көрсетті.

GSH/GSSG арақатынасы *Coq9^{R239X}+SAAR* тобында *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC* тышқан топтарымен салыстырғанда төмен көрсеткіш көрсетті. Ал *Coq9^{+/+}* бақылау тобы салыстырмалы түрде тәжірибелік топтардан көрсеткіші жоғары болды (сурет 21).

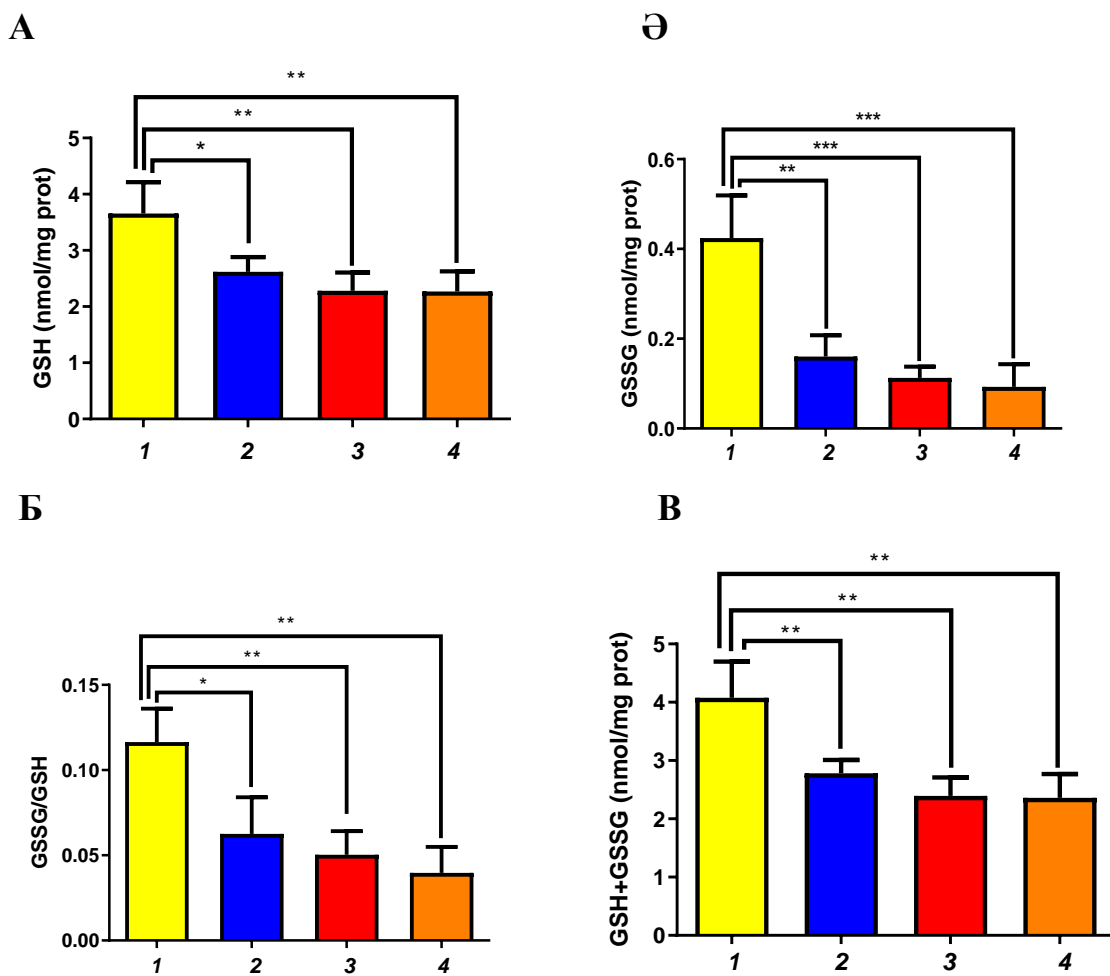


А, Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін $n = 3-4$).
 Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9^{+/+}*), 2-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}*), 3-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + SAAR). Ординат осі: GSH, GSSG, GSH/GSSG, GSH+GSSG арақатынасы.

Сурет 20 – Ми ұлпасындағы глутатион жүйесі

Глутатион глутатионпероксидаза (GPx) мен глутатионредуктаза (GRd) ферменттерінен тұратын жүйе арқылы әрекет етеді. Тәжірибеде N-ацетил-L-цистеин және тағамның құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) тәжірибе тышқандарын өңдеудің глутатион жүйесіне әсерін анықтау үшін GPx және GRd белсенділіктері анықталды.

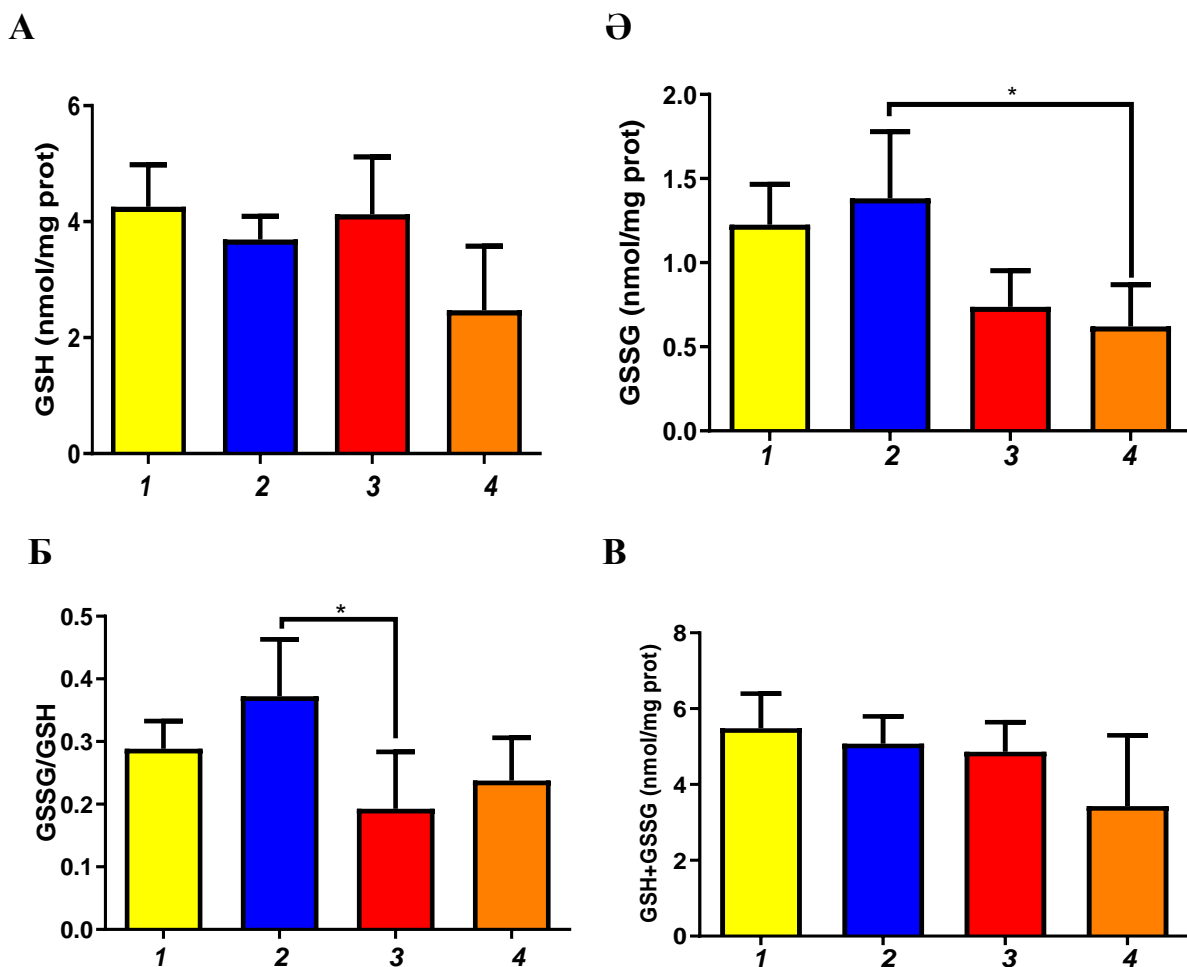
Бұлшық ет ұлпасындағы GSH деңгейі өз кезегінде *Coq9^{R239X}*+NAC тышқан топтары бақылау тобымен бірдей шамалас оң нәтиже көрсетті (сурет 22).



А, Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR). Ординат осі: GSH, GSSG, GSH/GSSG, GSH+GSSG арақатынасы-нмоль/мг.

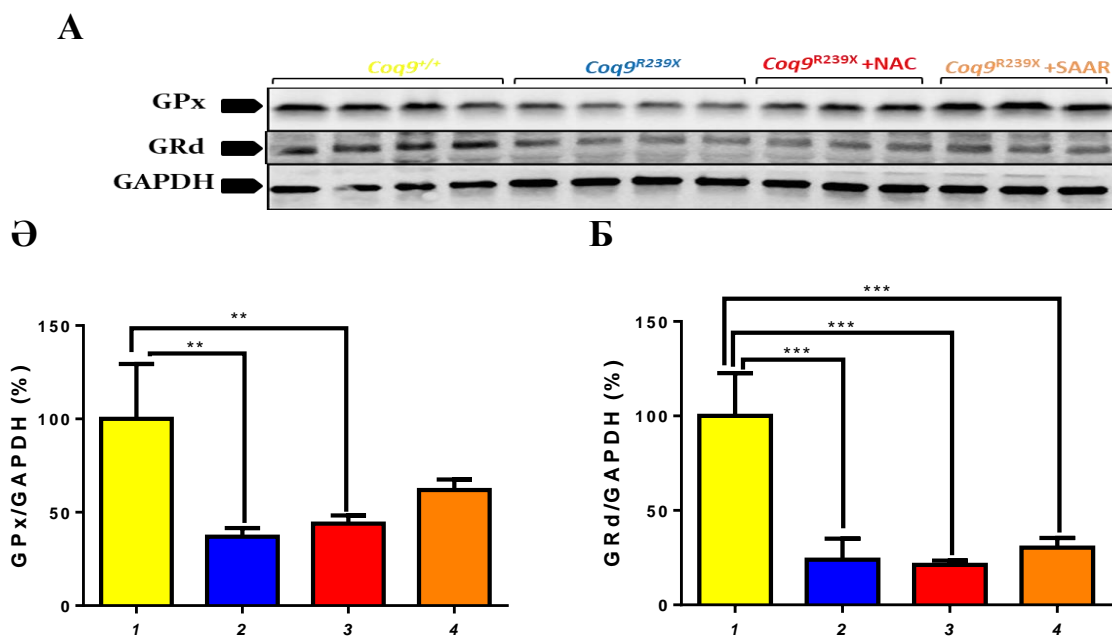
Сурет 21 – Бүйрек ұлпасындағы глутатион жүйесі

Тәжірибеде ми, бүйрек және бұлшық ет ұлпалары зерттелді. GPx деңгейі *Coq9*^{+/+} бақылау тобында *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} + SAAR, *Coq9*^{R239X} + NAC тәжірибелік топтармен салыстырғанда жоғары көрсеткіш көрсетті. Яғни, *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} + SAAR тышқан топтарымен салыстырғанда P ≤ 0.05 шамада жоғары болды. Ми ұлпасындағы GRd деңгейі *Coq9*^{+/+} бақылау тобында барлық *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} + SAAR, *Coq9*^{R239X} + NAC тәжірибе топтарынан P ≤ 0.001 шамада жоғары көрсеткішті көрсетті (сурет 23).



А, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR). Ординат осі: GSH, GSSG, GSH/GSSG, GSH+GSSG арақатынасы-нмоль/мг.

Сурет 22 – Бұлшық ет ұлпасындағы глутатион жүйесі



А) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың ми ұлпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9^{+/+}*), 2-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}*), 3-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X} + NAC*), 4-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X} + SAAR*). Ординат осі: GRx/GAPDH GRd/GAPDH арақатынасы - %. GAPDH ақуызы бақылау ретінде қолданылды.

Сурет 23 – Тышқанның ми тіндеріндегі GPx4 және GRd ақуыз деңгейі

Зерттеуде бүйрек ұлпасындағы GPx4 деңгейі *Coq9^{+/+}* бақылау тобында *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X} + SAAR*, *Coq9^{R239X} + NAC* тәжірибелік топпен салыстырғанда жоғары болды, ал *Coq9^{R239X}* тобымен салыстырғанда да P ≤ 0.05 шамада жоғары көрсеткіш көрсетті.

Бүйрек ұлпасындағы GPx4 деңгейі *Coq9^{R239X} + NAC* тәжірибелік тобында *Coq9^{+/+}* бақылау тобымен салыстырғанда жоғары, ал *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X} + SAAR* тәжірибелік топтары төмен көрсеткіш көрсетті.

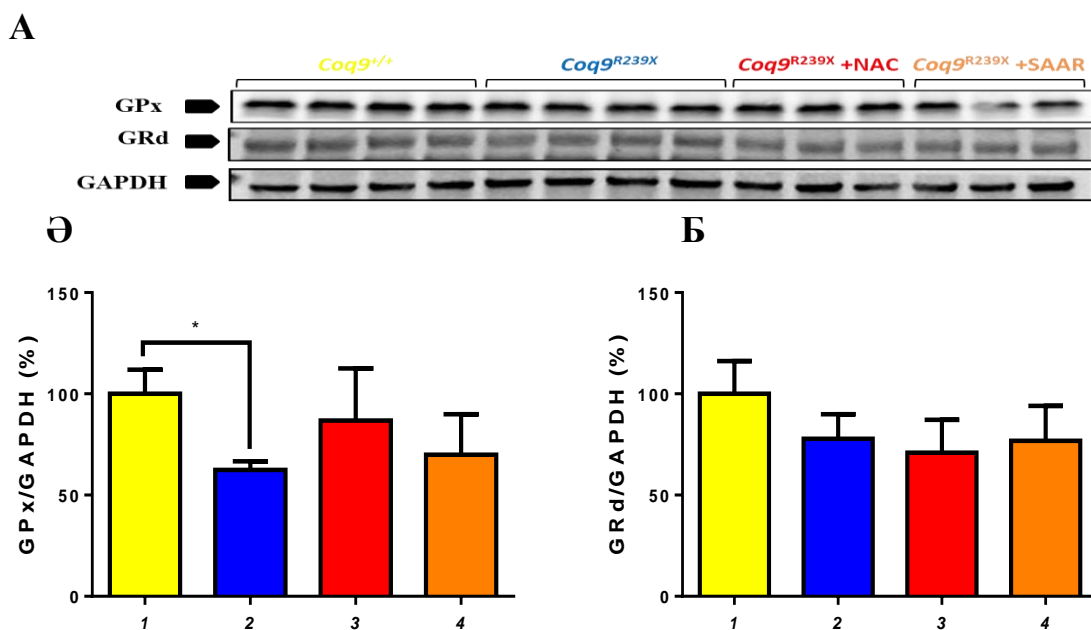
Бүйрек ұлпасындағы GRd ақуыз деңгейі *Coq9^{+/+}* бақылау тобында *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X} + SAAR*, *Coq9^{R239X} + NAC* тәжірибе топтарымен салыстырғанда жоғары көрсеткіш көрсетті (сурет 24).

Жұмыс барысында ми және бүйрек ұлпасымен бұлшықет ұлпасында қарастырылды. Бұлшықет ұлпасында *Coq9^{+/+}*, *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X} + SAAR* топтарымен салыстырғанда *Coq9^{R239X} + NAC* тышқандарында GPx4 деңгейі едәуір жоғарылады.

Бұлшықет ұлпасындағы GRd ақуыз деңгейі *Coq9^{R239X} + SAAR*, *Coq9^{R239X} + NAC* тәжірибе топтар арасында шамалас көрсеткіш көрсетті, ал *Coq9^{+/+}* бақылау тобы және *Coq9^{R239X}* тәжірибе тобымен салыстырғанда жоғары көрсеткіш көрсетті (сурет 25).

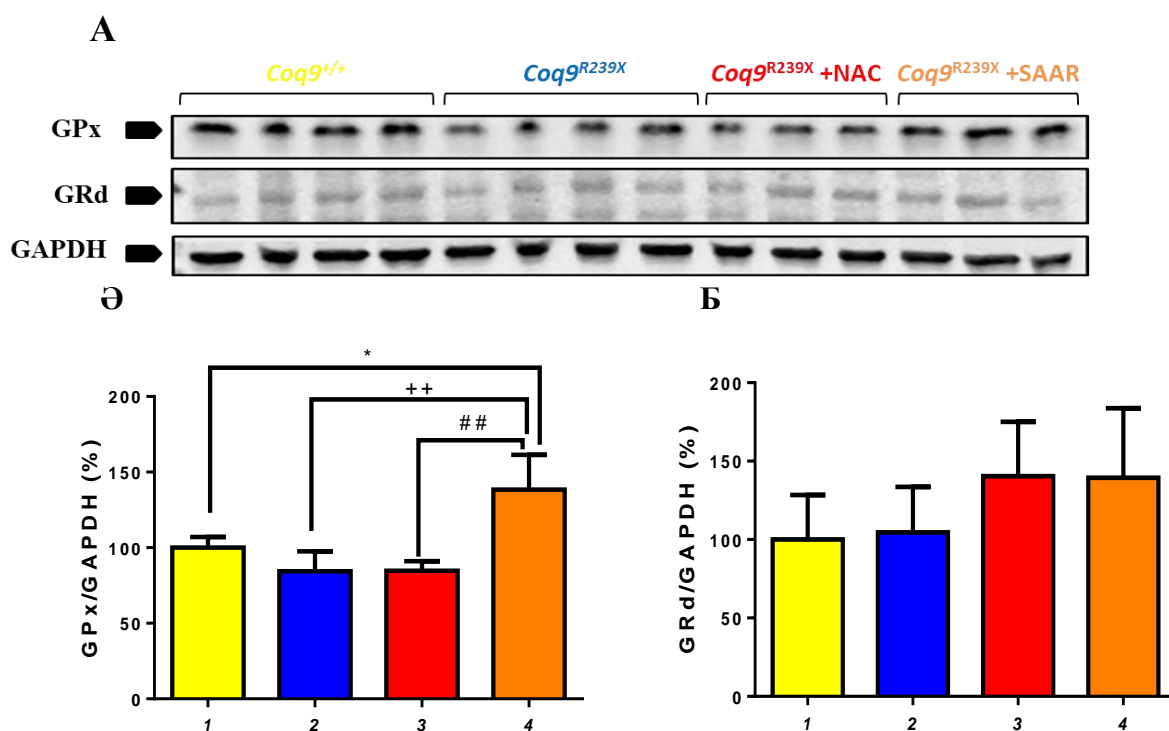
Глутатион – глутамат, цистеин мен глициннен тұратын ферментативті синтезделген трипептид. Осылайша, күкірт амин қышқылдарының бірі болып келетін цистеиннің қолжетімділігі, глутатион синтезінің қарқындылығына

тікелей әсерін тигізіп отырады. Тотығу барысында тотықсызданған глутатион дисульфидті формалардың түзілістерімен әрекеттесе алады. GSH НАДФН-глутатион редуктаза белсенділігінің арқасында қалпына келеді. Клетка ішілік GSH ондағы глутатион құрамының 90%-нан көбін құрайды, бірақ тотықтырғыш стресс тәрізді қалпына келуші эквиваленттерді қолдану шарттарында, қалпына келген глутатион мен тотыққан глутатионға сәйкестілігі төмендейді. Глутатион тотығу-тотықсыздану реакциясындағы буферлік қызметінен басқа да маңызды рөлдерді атқарады [153].



А) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың бүйрек ұпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін $n = 3-4$). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы ($Coq9^{+/+}$), 2-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X}$), 3-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X} + NAC$), 4-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X} + SAAR$). Ординат осі: GRx/GAPDH GRd/GAPDH арақатынасы - %. GAPDH ақуызы бақылау ретінде қолданылды.

Сурет 24 – Тышқанның бүйрек ұпасының GPx4 және GRd ақуыз деңгейі



А) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың бұлшықет ұпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (Coq9^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (Coq9^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (Coq9^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (Coq9^{R239X} + SAAR). Ординат осі: GRx/GAPDH GRd/GAPDH арақатынасы - %. GAPDH ақуызы бақылау ретінде қолданылды.

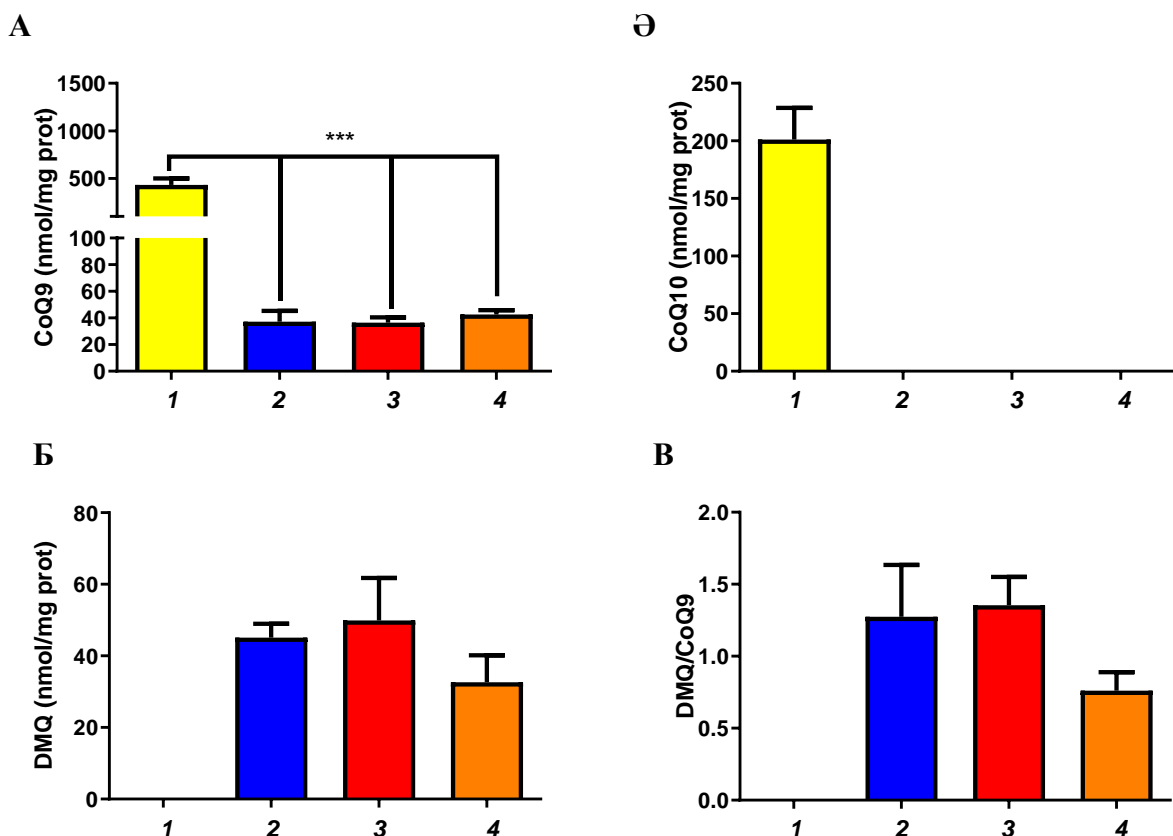
Сурет 25 – Тышқанның бұлшықет тіндеріндегі GPx4 және GRd ақуыз деңгейі

Тышқандардың ми, бүйрек, бұлшықет ұлпаларындағы GPx4 және GRd ақуыз деңгейін нақтылау мақсатында GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) ақуызы бақылау ретінде қолданылды. Тәжірибеде GAPDH ақуызын бақылау ретінде қолдануы, қандай ауытқу болмасын толық дәлдік көрсеткіш көрсетеді. Қорытындылай келе, тәжірибеде жалпы глутатион жүйесінің және жеке-жеке белок деңгейлері ми, бүйрек, бұлшықет ұлпаларында жақсы нәтиже көрсеткендігі анықталды.

3.5 Coq9^{R239X} тышқандарының тіндерінде SAAR және NAC-пен өндеуден кейінгі CoQ9, CoQ10, DMQ9 деңгейлеріндегі және DMQ9/CoQ9 қатынасындағы айырмашылықтарды анықтау

Жұмыс барысында CoQ9, CoQ10, DMQ9 және DMQ9/CoQ9 қатынасындағы деңгейлерін, яғни сандық көлемдерін анықтауда жоғары сұйық хроматография қолданылды.

26 суретте көрсетілгендей тышқандардың ми ұлпаларында CoQ9 деңгейі Coq9^{+/+} бақылау топтарында Coq9^{R239X}, Coq9^{R239X} + SAAR, Coq9^{R239X} + NAC тәжірибе топтарымен салыстырғанда жоғары көрсеткіш көрсетті.



А, Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-5). Абсцисс осі: 1- бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4- тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR).

Ординат осі: CoQ9, CoQ10, DMQ, DMQ/CoQ9 арақатынасы – нмоль/мг.

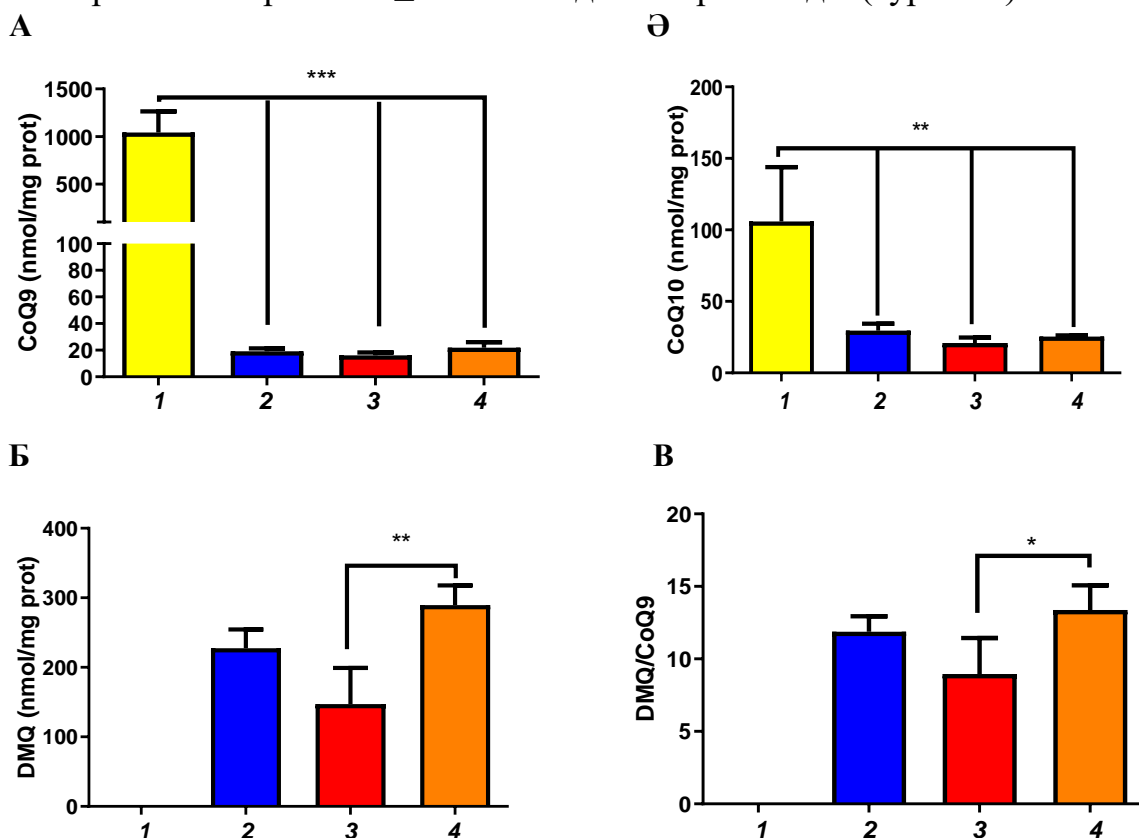
Сурет 26 – Тышқанның ми ұлпаларындағы CoQ9 деңгейі

CoQ10 деңгейі тек *Coq9*^{+/+} бақылау топтарында ғана анықталды, себебі кездесуі шартты. *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} + SAAR, *Coq9*^{R239X}+NAC тәжірибелік топтарда CoQ10 деңгейі бұл топтарда физиологиялық жағынан кездеспейді. DMQ деңгейі *Coq9*^{R239X}+NAC топтарда *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} + SAAR топтарымен салыстырғанда көрсеткіші жоғары болса, ал *Coq9*^{R239X} + SAAR тәжірибелік топ *Coq9*^{R239X}+NAC және *Coq9*^{R239X} топтардан ең кіші өлшемді көрсетті. *Coq9*^{R239X} тәжірибелік тобында DMQ және DMQ/CoQ9 қатынасындағы деңгейі *Coq9*^{R239X} + SAAR тобынан жоғары көрсеткіш көрсетсе, *Coq9*^{R239X}+NAC тобымен салыстырғанда кіші деңгейді көрсетті.

Тәжірибемізде жоғарыда аталған хроматография әдісін қолдану арқылы тышқандардың ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларындағы CoQ9, CoQ10, DMQ9 және DMQ9/CoQ9 қатынасындағы деңгейін анықтадық. *Coq9*^{+/+} тышқан топтарында CoQ9, CoQ10 кездесуі шартты. Ал *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X}+NAC, *Coq9*^{R239X}+SAAR тәжірибелік топтарда CoQ9 ақуыз деңгейінің жетіспеуі дәлелденген, бұл топтарда жоғарыда келтірілгендей CoQ биосинтезі бұзылған.

Тәжірибеге алынған тышқандардың бүйрек ұлпаларында CoQ9 деңгейі *Coq9*^{+/+} бақылау топтарында *Coq9*^{R239X}, *Coq9*^{R239X} + SAAR, *Coq9*^{R239X} + NAC

тәжірибе топтарынан $P \leq 0.001$ шамада жоғары көрсеткішті көрсетсе, CoQ10 деңгейі $Coq9^{+/+}$ бақылау топтарында $Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X} + SAAR$, $Coq9^{R239X} + NAC$ тәжірибе топтарынан $P \leq 0.01$ шамада жоғары болды (сурет 27).

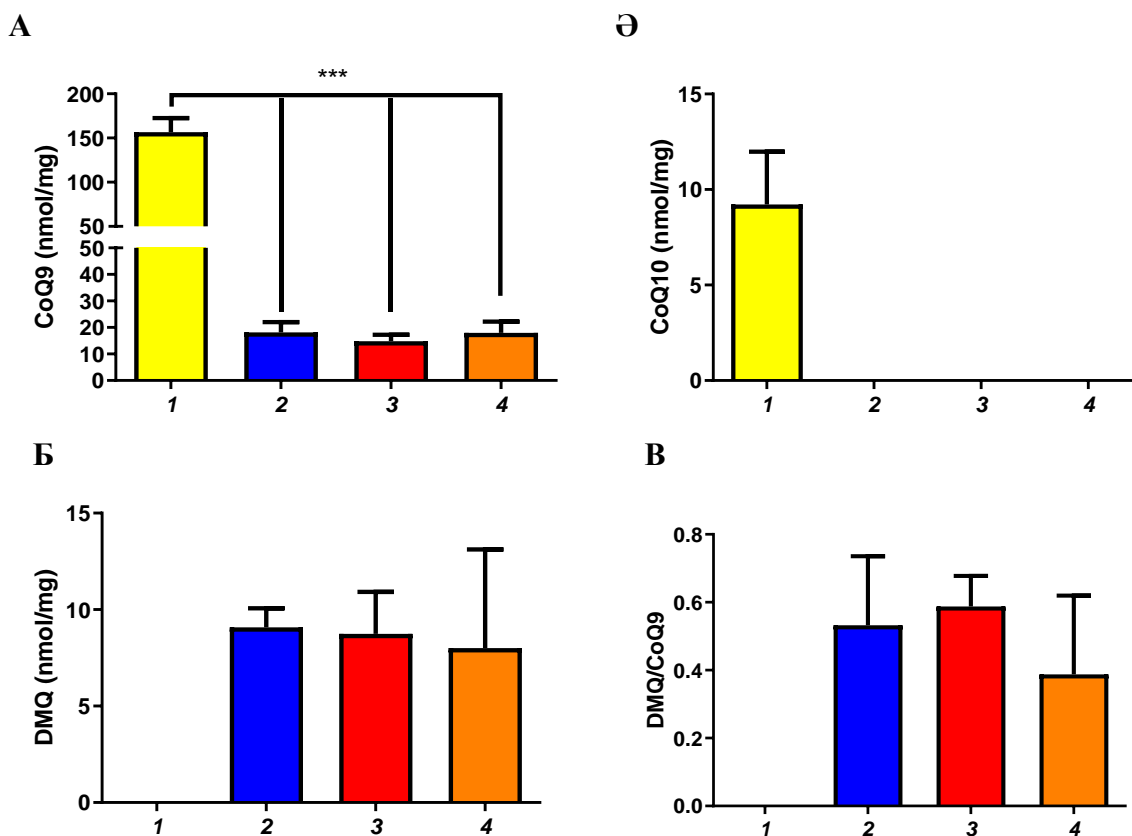


А, Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін $n = 3-5$). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы ($Coq9^{+/+}$), 2-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X}$), 3-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X} + NAC$), 4-тәжірибелік топ ($Coq9^{R239X} + SAAR$). Ординат осі: CoQ9, CoQ10, DMQ, DMQ/CoQ9 арақатынасы – нмоль/мг.

Сурет 27 – Тышқанның бүйрек ұлпаларындағы CoQ9 деңгейі

DMQ9 деңгейі және DMQ9/CoQ9 қатынасында $Coq9^{+/+}$ бақылау тобында болмады. $Coq9^{R239X} + SAAR$ тәжірибелік тобы $Coq9^{R239X} + NAC$ және $Coq9^{R239X}$ топтарымен салыстырғанда көрсеткіші жоғары болды. $Coq9^{R239X}$ тобының көрсеткіші $Coq9^{R239X} + NAC$ тобына қарағанда жоғары болса, ал $Coq9^{R239X} + SAAR$ тәжірибелік тобымен салыстырғанда төмен көрсеткішті көрсетті. Тәжірибелік топ $Coq9^{R239X} + NAC$ көрсеткіші $Coq9^{R239X} + SAAR$ және $Coq9^{R239X}$ топтарымен салыстырғанда төмен болды.

Тәжірибедегі тышқандардың бұлшықет ұлпаларында CoQ9 деңгейі $Coq9^{+/+}$ бақылау тобында тәжірибе топтарынан ($Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X} + SAAR$, $Coq9^{R239X} + NAC$) жоғары көрсеткіш көрсетті. CoQ10 деңгейі ми және бұлшықет ұлпаларында $Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X} + SAAR$, $Coq9^{R239X} + NAC$ тәжірибелік топтарда болмайтындығы бізге дейінгі жүргізілген зерттеулерде дәлелденген [75,76]. Жұмыс барысында да расталып отыр (сурет 28).



А, Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 3-5). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9^{+/+}*), 2-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}*), 3-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9^{R239X}* + SAAR).

Ординат осі: CoQ9, CoQ10, DMQ, DMQ/CoQ9 арақатынасы – нмоль/мг.

Сурет 28 – Тышқанның бұлшықет ұлпаларындағы CoQ9 деңгейі

2001 жылы *Coq7* ақуызын кодтайтын *Coq7* генінің болмауынан убихинон жетіспеушілігіне бар алғашқы тышқан модельдері туралы мақалалар жарық көрді. *Coq7* ақуызы деметоксиубихинонның (DMQ) гидроксилденуін катализдейді. Биохимиялық зерттеулер *Coq7* болмауы деметоксиубихинонның жиналуын тудыратынын көрсетті [22]. Дегенмен, ашытқыда DMQ митохондриялық тыныс алу тізбегінде де, антиоксиданттық агент ретінде де электронды тасымалдаушы ретінде жұмыс істеу қабілетін көрсетпейді [23]. N-ацетил-L-цистеинмен және құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен (SAAR) тышқандарды өңдеу тәжірибелік топтардағы CoQ9 және DMQ9 деңгейлерінің өзгерістері анықталды.

Қорытындылай келе, тәжірибеде қолданылған ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларында DMQ9 деңгейлері айтарлықтай арта түсті және *Coq9^{R239X}* тышқандарында DMQ9/CoQ9 қатынасының пайыздық көрсеткіші жоғарылады.

Алайда, егер *Coq9* ақуызы CoQ биосинтезіне қатысатын болса, бұл дисфункционалды ақуыз осы липидтің ауыр тапшылығын тудырады. Хинон сығындыларын HPLC арқылы бөлу және сандық анықтаудан кейін біз гомозиготалы тышқандары зерттелген ұлпаларда (ми, бүйрек, бұлшықет) CoQ9

(кеміргіштердегі убихинонның негізгі түрі) және CoQ10 деңгейлерінің айтарлықтай төмендеуін көрсеткенін растадық.

3.6 Митохондрия тыныс алу тізбегі кешендерінің қалыптасуы мен тұрақтылығын анықтау

Электрондарды тасымалдау тізбегі реакцияларының соңғы өнімі метаболизмдік су болып табылады (тәулігіне 300-400 мл). Екіншіден, АТФ синтезі және энергияның осы молекуланың биохимиялық байланыстарында сақталуы жүреді. Тәулігіне 40-60 кг аденозинтрифосфаты синтезделеді және сол мөлшерде жасушаның ферментативті реакцияларына жұмсалады.

Электрондар тасымалының тыныс алу тізбегі - митохондриялардың ішкі мембранасында қалқып жүретін, тізбек бойымен электрондарды бір-біріне тасымалдайтын және сол арқылы энергияны жасап шығаратын ақуыз кешендері мен электрон тасымалдаушылары. Ақуыздық тыныс алу кешендері төртеу және олардың мембранада қалай ұйымдастырылғаны әлі күнге дейін белгісіз: олар бір-бірінен тәуелсіз қалқып жүр ме, әлде суперкешендер түзе отырып бірігеді ме беймәлім. Испандық зерттеушілер тобы SCAFI (supercomplex assembly factor I) деп аталатын ақуыздың тыныс алу кешендерінің суперкешендерге жиналуын арнайы реттейтінін анықтады.

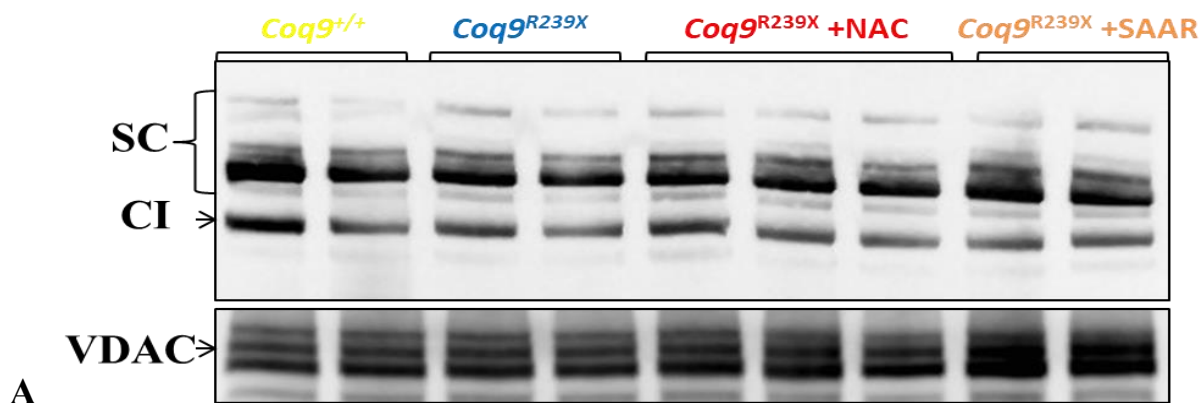
Coq9^{R239X} тышқандарының биоэнергетикасы айтарлықтай төмендегендіктен, митохондриялы суперкомплектің қалыптасуындағы әртүрлі әдістердің ықпалдары зерттелді [14]. Кешен III (CIII) пен еркін суперкешендер (SC) қатынастарының айырмашылықтары байқалғанын атап өткен жөн.

I, III, IV кешендердің (CI, CIII, CIV) және SC ақуыз деңгейлерін анықтау үшін молекулалық деңгейде көк гелді электрофорез әдісі қолданылды. Тәжірибе екі ай бойы N-ацетил-L-цистеинмен және құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағаммен тышқандарды өңдеуден кейін жасалды.

Митохондрия тыныс алу тізбегінің кешендерін анықтауда тәжірибеде ми, бүйрек және бұлшықеттің митохондрия фракциясынан алынды. Жұмыс барысында мидың және бұлшықеттің митохондрия фракцияларында CI, CIII, CIV және SC ақуыз деңгейлерін 3-4 рет қайталау кезінде де нәтижесі анық болмады.

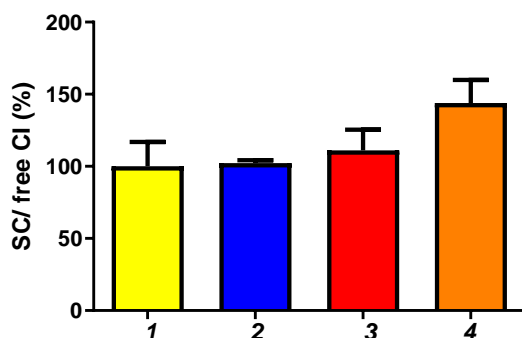
CI ақуыз деңгейінің көрсеткіші Вестерн-Блот анализінде *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелік топтар мен *Coq9^{+/+}* бақылау тобында да айқын жолақтар көрінді. SC/free CI қатынасында тәжірибелік топтар *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* бақылау тобымен салыстырғанда жоғары болды. Ал SC пен бос CI ақуыз деңгейлерінде *Coq9^{+/+}* бақылау тобы *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелік топтармен салыстырғанда жоғары көрсеткіш көрсетті. Бақылау ретінде VDAC ақуызы алынды (сурет 29).

30 суретте көрсетілгендей SC/бос CIII қатынасында және SC ақуыз деңгейінің көрсеткіштері *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC*, *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелік топтарында *Coq9^{+/+}* тобымен салыстырғанда төмен болды. Ал бос CIII ақуыз деңгейі *Coq9^{+/+}* тобымен салыстырғанда *Coq9^{R239X}* тышқан топтарында жоғары болса, *Coq9^{R239X}+NAC* және *Coq9^{R239X}+SAAR* топтарында төмен көрсеткішті көрсетті (сурет 30).

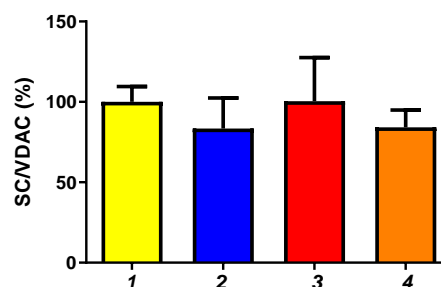


A

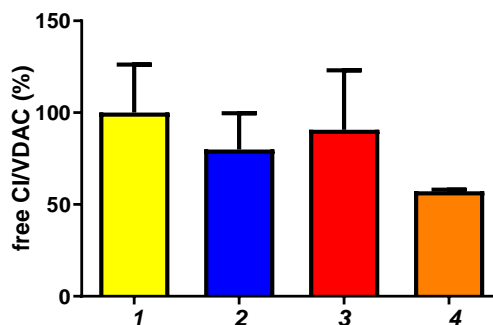
Ә



Б



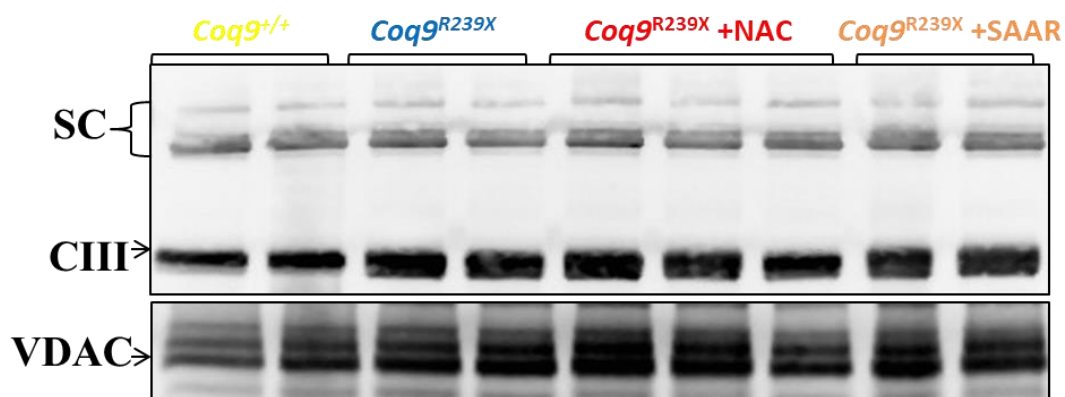
В



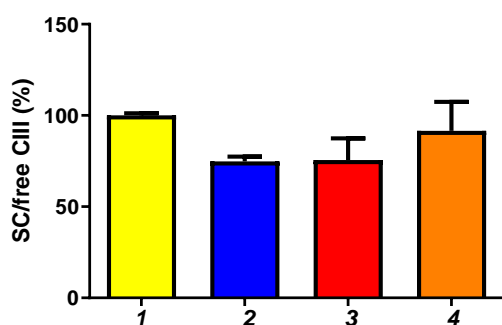
А) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың бүйректің митохондрия сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 2-3). Абсцисс өсі: 1-бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR). Ординат өсі: SC/бос CI, SC/VDAC, бос CI/VDAC арақатынасы – %.
Митохондриялы фракциясын бақылау ретіндегі анти-VDAC қолданылды.

Сурет 29 – *Coq9*^{R239X} тышқандарының бүйректің митохондриялық фракцияларының митохондриялы тыныс алу тізбегі CI және SC кешендерінің қалыптасуы мен тұрақтығы

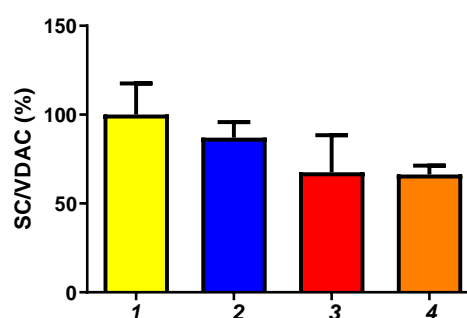
A



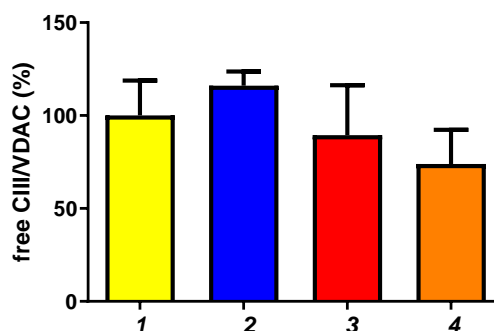
Ә



Б



В

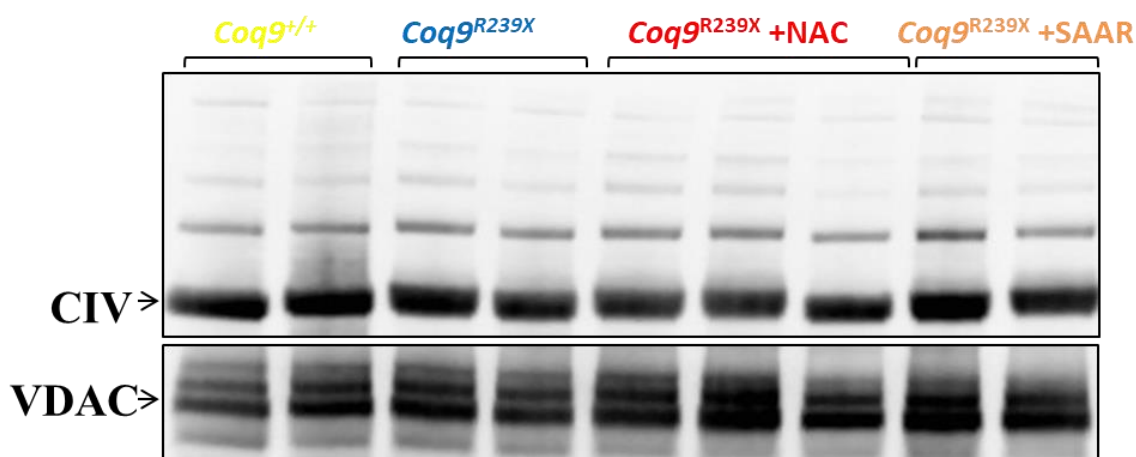


А) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың бүйректің митохондрия сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған ± SD мәліметтер (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін n = 2-3). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR). Ординат осі: SC/бос CIII, SC/VDAC, бос CIII/VDAC арақатынасы – %. Митохондриялы фракциясын бақылау ретіндегі анти-VDAC қолданылды.

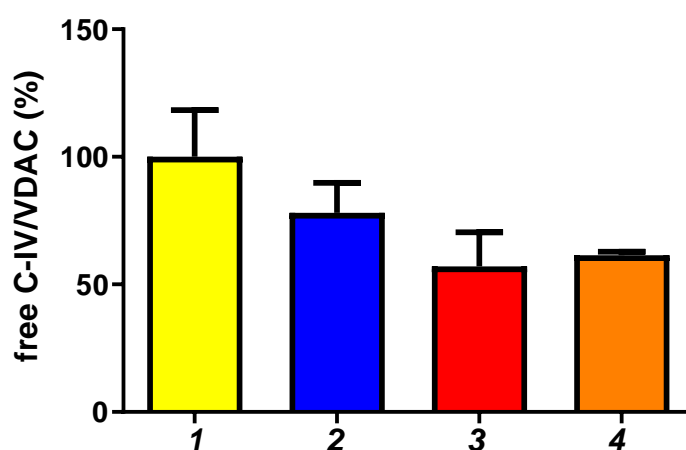
Сурет 30 – *Coq9*^{R239X} тышқандарының бүйректің митохондриялық фракцияларының митохондриялы тыныс алу тізбегі CIII және SC кешендерінің қалыптасуы мен тұрақтығы

CIV ақуыз деңгейі тәжірибелік топтардың барлығында бақылау тобымен салыстырғанда төмен болды (сурет 31). Барлық кешендердің деңгейін анықтауда VDAC бақылау ретінде алынды.

A



Ә



А) CoQ жетіспеушілігі бар тышқандардың бүйректің митохондрия сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер (Тьюки апостериорлы ANOVA біржақты тесті; әрбір топ үшін $n = 2-3$). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Coq9*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X}), 3-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + NAC), 4-тәжірибелік топ (*Coq9*^{R239X} + SAAR). Ординат осі: бос CIV/VDAC арақатынасы – %. Митохондриялы фракциясын бақылау ретіндегі анти-VDAC қолданылды.

Сурет 31 – *Coq9*^{R239X} тышқандарының бүйректің митохондриялық фракцияларының митохондриялы тыныс алу тізбегі еркін CIV кешендерінің қалыптасуы мен тұрақтығы

Митохондриялар кез келген жасушаның қуат көзі болып саналады. Олардың саны белгілі бір қызметтер үшін қажетті энергияның шығындалуына байланысты болады. Мысалы, нейрондарда 1000-ға дейін митохондриялар болады, олар көбінесе синаптикалық деп аталатын түйіндерде шоғыр түзеді.

Бірнеше онжылдықтар бұрын, митохондриялардың тыныс алу ақуыздық кешендері енді ғана оқшауланған және зерттелген кезде, олардың мембранада бір-бірінен тәуелсіз өмір сүретіндігі және олардың арасында жүретін электронды тасымалдаушылардың, убихинон мен цитохромның көмегімен ғана байланысатындығы туралы болжам болған. 1). Бұл болжам «сұйықтық моделі» деген атқа ие болды (fluid model). Алайда жағдайдың қарапайым емес екендігі

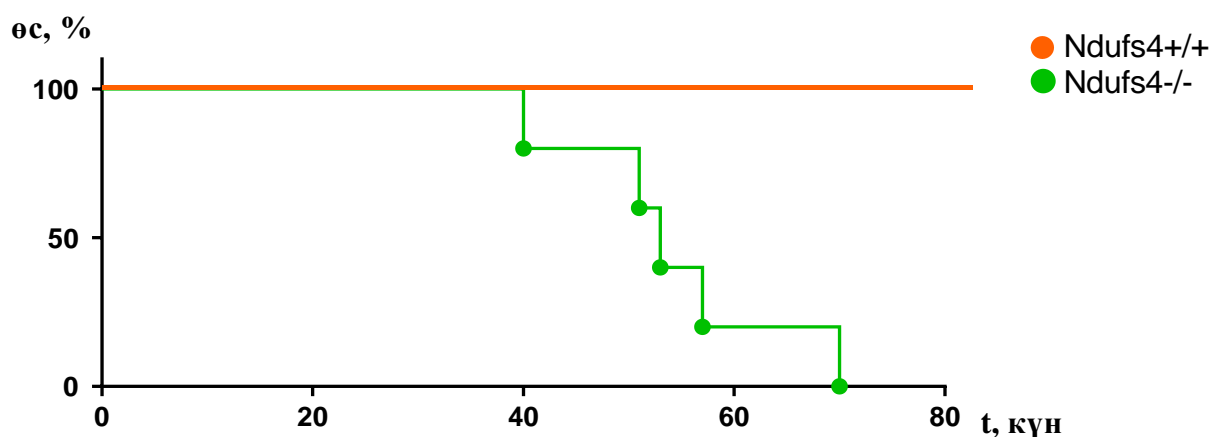
және тыныс алу кешендері бір-бірімен біршама үлкен құрылымдарға - «суперкешендерге» бірігуі мүмкін екендігі туралы мәліметтер бірте-бірте пайда бола бастады.

Қорытындылай келе, тәжірибе барысында тек қана бүйректің митохондриялық фракциялары айқын көрінді. Ал ми және бұлшықеттің митохондриялық фракцияларын қолдана отырып тәжірибені 4-5 рет қайталағанда ақуыздар анық көрінбеді. Мұның себебі тәжірибеде қолданылатын тышқан топтарының ең бірінші ми және бұлшықет ұлпалары зақымдануы CoQ биосинтезінің бұзылысымен байланысты.

3.7 Кешен I жетіспеушілігі бар тышқандардың өмір сүру пайызының, фенотиптік көрінісінің сараптамасын және глутатион жүйесін анықтау

Зерттелініп отырған жұмыс барысында алдымызға қойған мақсаттардың біріне сәйкес, зерттеулеріміз кешен I жетіспеушілігі тышқандардың фенотиптік сараптамасын анықтауға бағытталды. Кешен I жетіспеушілігі бар екі топ: бақылау - *Ndufs4*^{+/+} және тәжірибелік - *Ndufs4*^{-/-} топ тышқандары қолданылды. Екі топтың фенотиптік көрінісін салыстыратын болсақ, тәжірибелік топ *Ndufs4*^{-/-} бақылау тобымен салыстырғанда салмағының азайғандығын көрсетті. Тәжірибеде екі топтың ми, бүйрек және бұлшықет ұлпалары қолданылды. Ішкі органдардың айырмашылығы бойынша алынған ұлпалардың салмағы барлық тәжірибелік топтың көлемі де кішірек және салмағы да аз болды. Мұның себебі ретінде, тәжірибелік топта қолданылған тышқандар гомозиготалы жануарлар (синдром Ли) болып келеді.

Жалпы *Ndufs4*^{-/-} гомозиготалы тышқандардың өмір сүру ұзақтығы жетпіс күнге созылды. Ал, тәжірибелік тышқандар алғашқы қырық күнінен бастап өле бастады. Бұл тышқандарға қалыпты түрде виварий жағдайында қолданылатын тамақ пен су беріліп отырды (сурет 32).

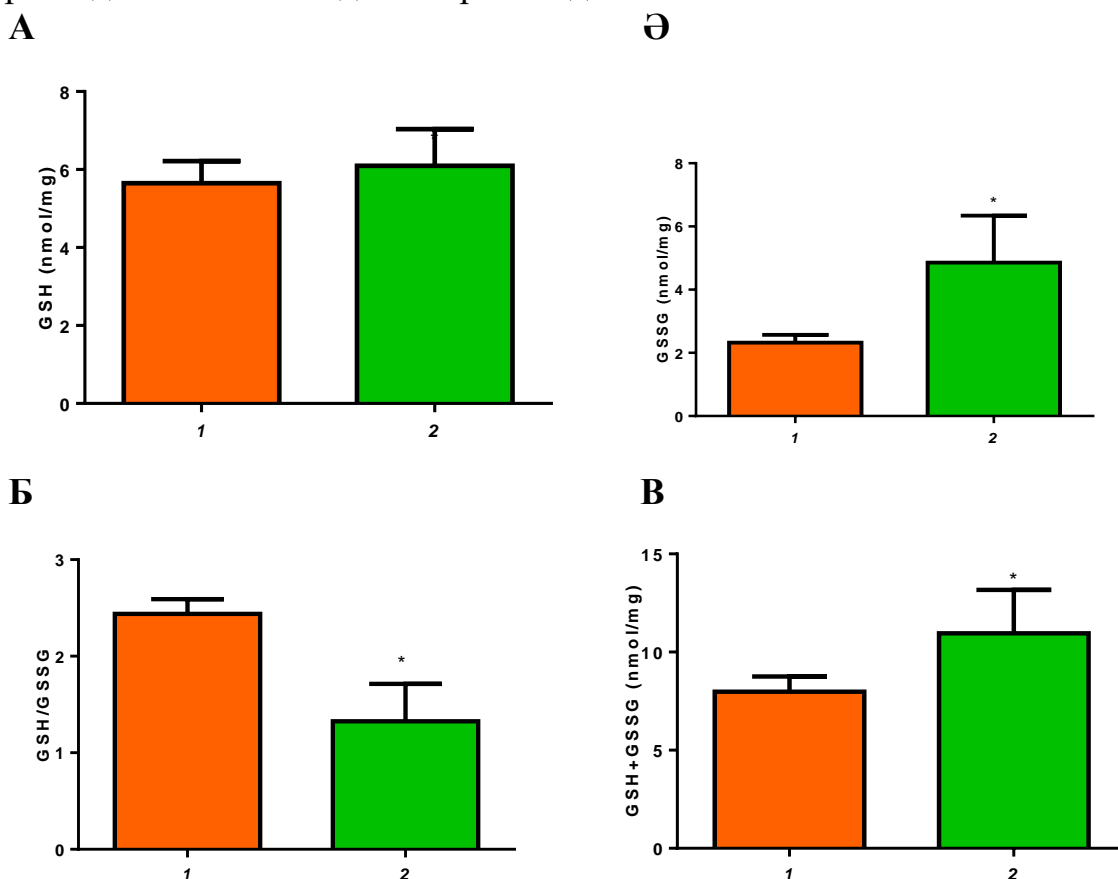


Абсисс өсі: t - күндер берілген; ординат өсі: өс, % - өмір сүру пайызы. Тәжірибе 1 ай жас шамасында басталды: *Ndufs4*^{+/+} (n=40), *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік тышқандар n=40. Мантель-Кокс (log-rank) және Гехан-Бреслоу-Вилкоксон тесттерін пайдалана отырып жасалған сараптама

Сурет 32 – *Ndufs4*^{+/+} және *Ndufs4*^{-/-} тышқандарының өмір сүрудің орташа пайыздық деңгейі

MitoLab UGR зертханасында (Гранада университеті, Испания) келесідей тәжірибе жасалынды: *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік тышқандардың ми ұлпаларында CoQ деңгейі аз ғана артқаны және оның салдарында SQOR деңгейі де жоғарылағаны көрсетілген. Осының нәтижесінде, SQOR деңгейі глутатион жүйесіне ықпал етуі туралы сұрақ туындайды. Зерттеу барысында күтілгендей *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелі тышқандарының бас ми ұлпаларындағы GSH жалпы деңгейі артты (сурет 33).

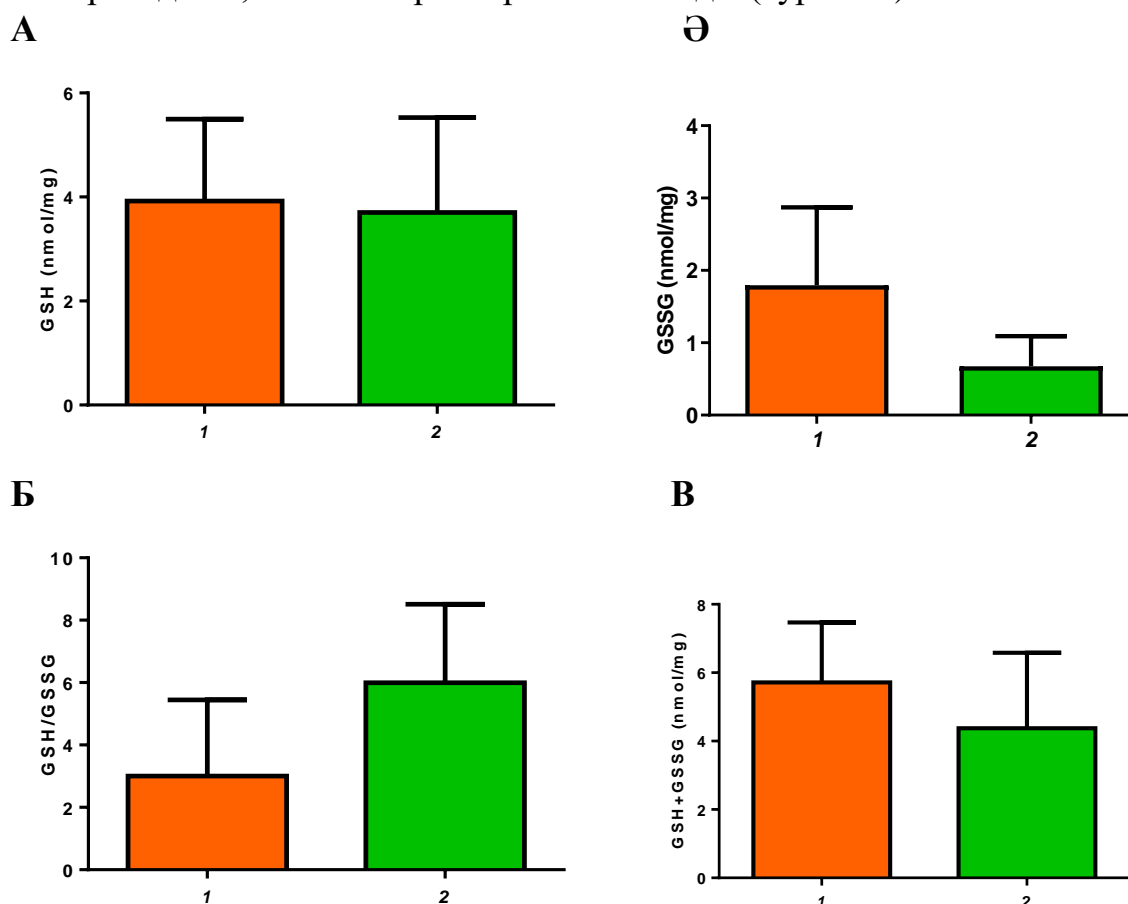
Алайда, бүйрек және бұлшықет ұлпаларындағы GSH деңгейлерінде айырмашылық байқалмады. Тотыққан және тотықсызданған глутатионның деңгейлері *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топтарда *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда жоғары көрсеткішін көрсетті. Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан топтарында GSH жүйесінің деңгейі ми ұлпаларында көп болатындығын, яғни мұнда тотығу стресінің бар екендігін айта аламыз. GSH деңгейі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда жоғары болды. Ал GSSG деңгейі $P \leq 0.05$ шамада тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда жоғары болды. GSH/GSSG қатынасы бақылау топта тәжірибелік топпен салыстырғанда $P \leq 0.05$ шамада айырмашылық байқалды. GSH+GSSG қосындысы *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік тышқан топтарында *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобына қарағанда $P \leq 0.05$ шамада жоғары болды.



А, Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, * $P < 0.05$ (t-test, әрбір топ үшін $n = 4$). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Ndufs4*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Ndufs4*^{-/-}). Ординат осі: GSH, GSSG, GSH/GSSG қатынасы, GSH+GSSG қосындысы – нмоль/мг.

Сурет 33 – *Ndufs4*^{+/+} және *Ndufs4*^{-/-} тышқан топтарының ми ұлпаларындағы глутатион жүйесі

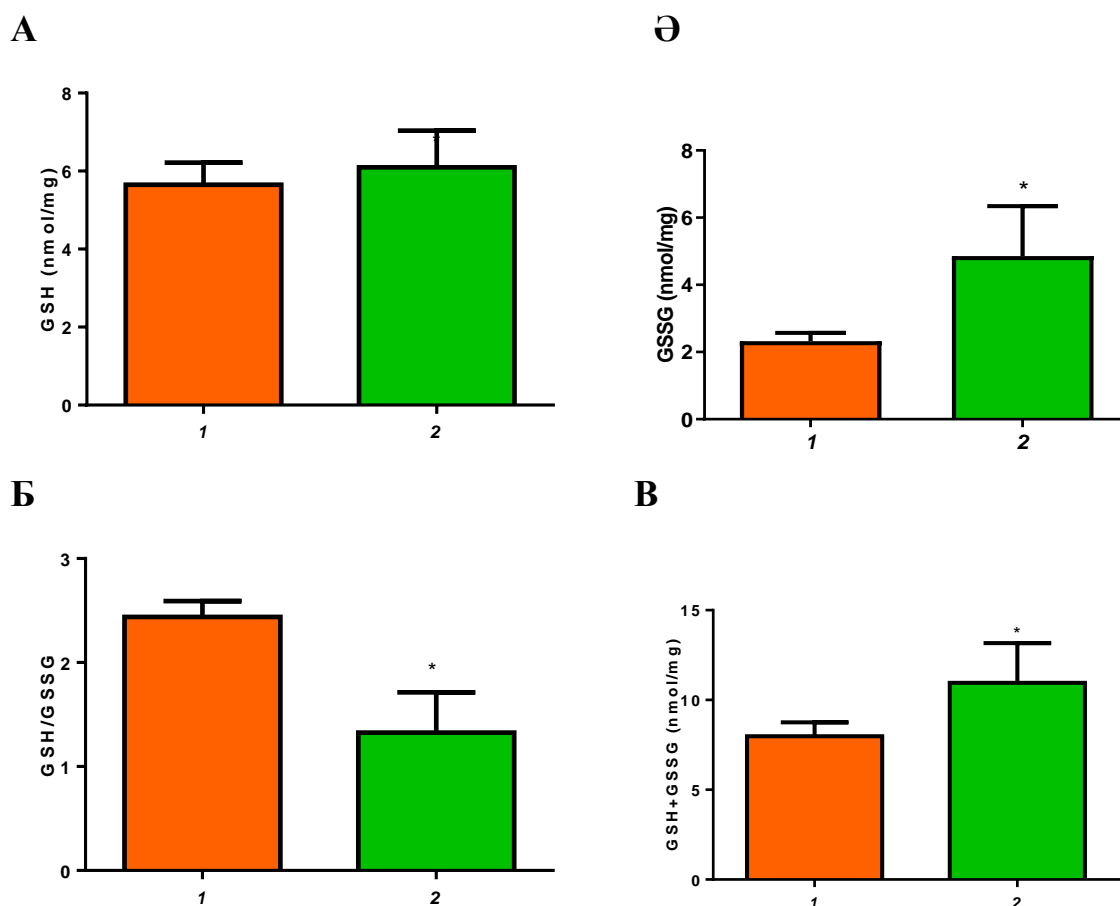
Тәжірибе барысында бүйрек ұлпаларындағы глутатион жүйесінде де өзгеріс болды. GSH деңгейі *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобында *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топпен салыстырғанда айырмашылық байқалмады. GSSG деңгейі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобынан 37,67 % төмендеді. GSH/GSSG қатынасы *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда екі есе жоғарылады. GSH+GSSG қосындысы бақылау топта тәжірибелік топпен салыстырғанда 76,57 % жоғары көрсеткіш болды (сурет 34).



А, Ә, Б, В) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, (t-test, әрбір топ үшін n = 4). Абсцисс өсі: 1-бақылау тобы (*Ndufs4*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Ndufs4*^{-/-}). Ординат өсі: GSH, GSSG, GSH/GSSG қатынасы, GSH+GSSG қосындысы – нмоль/мг.

Сурет 34 – *Ndufs4*^{+/+} және *Ndufs4*^{-/-} тышқан топтарының бүйрек ұлпаларындағы глутатион жүйесі

35 суретте көрсетілгендей бұлшықет ұлпаларында GSH деңгейі *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобында *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топпен салыстырғанда айырмашылық байқалмады. GSSG деңгейі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобынан 37,4% төмен пайызды көрсетті. GSH/GSSG қатынасы *Ndufs4*^{+/+} бақылау топта *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топпен салыстырғанда 54,4 % жоғарылады. GSH+GSSG қосындысы бақылау тобы тәжірибелік топпен салыстырғанда 37,2 % төмен көрсеткіш көрсетті.



А, Б, В, Г) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер, *P < 0.05 (t-test, әрбір топ үшін n = 4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Ndufs4*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Ndufs4*^{-/-}). Ординат осі: GSH, GSSG, GSH/GSSG, GSH+GSSG арақатынасы – нмоль/мг.

Сурет 35 – *Ndufs4*^{+/+} және *Ndufs4*^{-/-} тышқан топтарының бұлшықет тіндеріндегі глутатион жүйесі

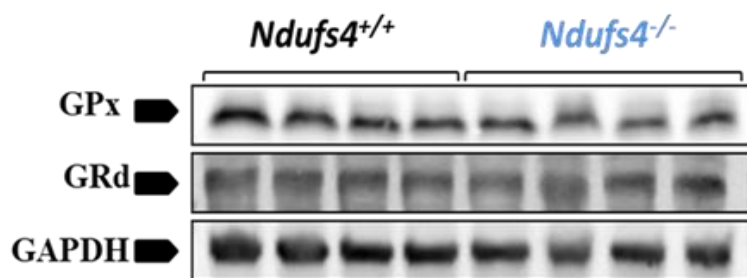
Қорытындылай келе, I кешенінің жетіспеушілігі бар бақылау және тәжірибелік тышқан топтарының өмір сүру пайызы мен фенотиптік көрінісінің айырмашылықтары анықталды. Глутатион жүйесі бойынша ми және бұлшықет ұлпаларының GSH, GSSG деңгейі тәжірибелік топпен салыстырғанда бақылау тобы төмен деңгейді көрсетті.

3.8 I кешенінің жетіспеушілігі бар тышқан моделіндегі GPx4 және GRd ақуыз белсенділігі

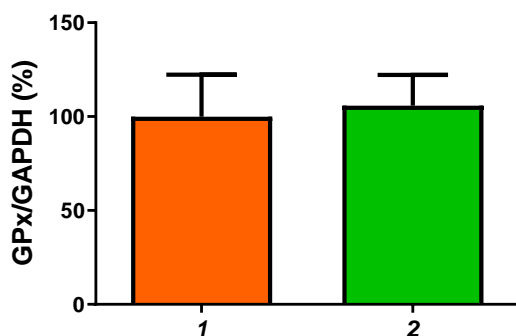
Зерттеу барысында жалпы глутатион жүйесі анықталынды. Жұмысты нақтылау мақсатында GPx4 және GRd ақуыз белсенділігі зерттелді. Тәжірибеде жоғарыда аталғандай ми, бүйрек және бұлшықет ұлпалары алынды.

Ми ұлпаларындағы GPx4 және GRd ақуыз белсенділігінің көрсеткіші бақылау және тәжірибе топтарда айтарлықтай айырмашылық көрсетпеді. Ми ұлпаларындағы GPx4 ақуыз деңгейі *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобы *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топпен салыстырғанда 5% төмендеді. GRd ақуыз белсенділігі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда 10% жоғарылады (сурет 36).

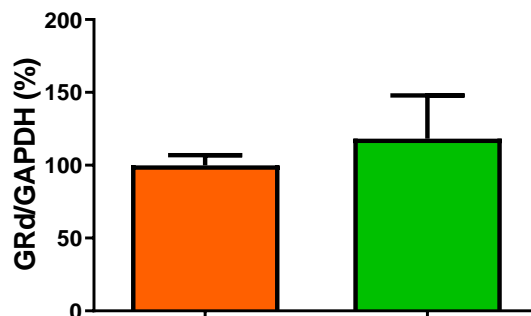
A



Ә



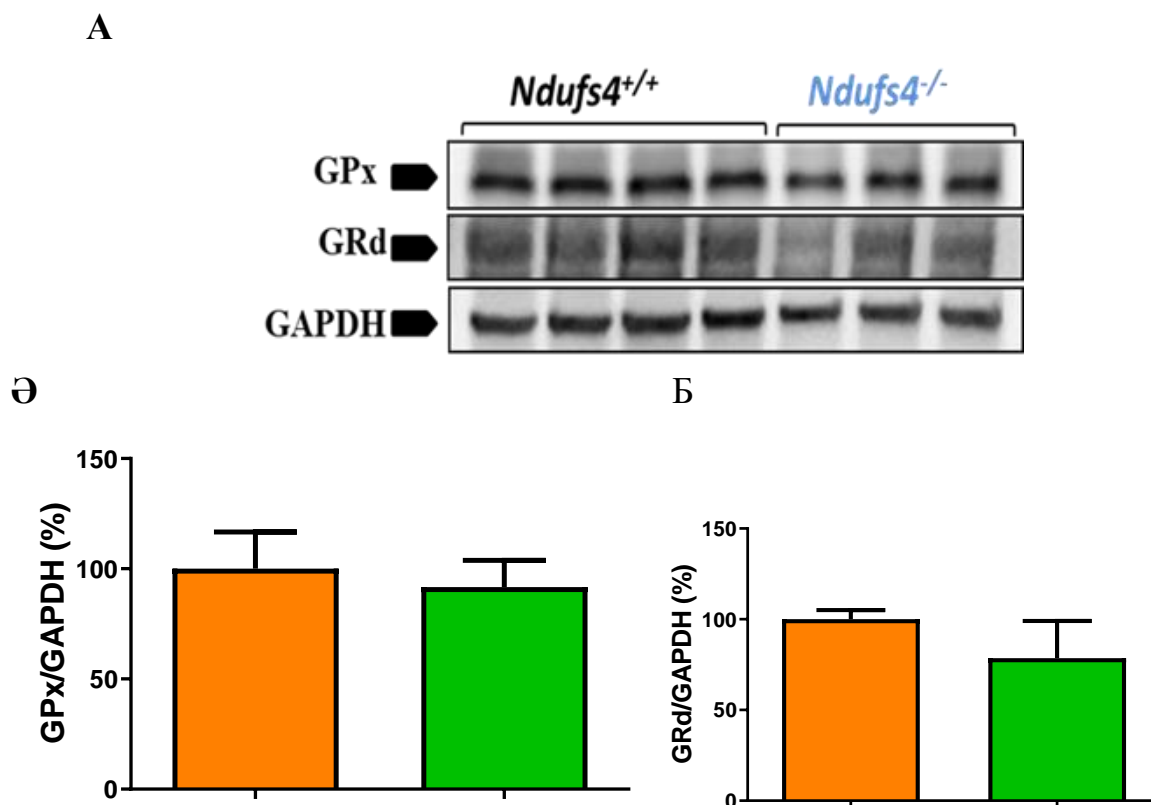
Б



А) Кешен I жетіспеушілігі бар тышқандардың ми ұлпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер . (t-test, әрбір топ үшін $n = 4$). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Ndufs4*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Ndufs4*^{-/-}). Ординат осі: GPx, GRd арақатынасы – нмоль/мин/мг.

Сурет 36 – *Ndufs4*^{+/+} және *Ndufs4*^{-/-} тышқандарының бас ми ұлпаларындағы ақуыз белсенділігінің өлшемі

Жұмыс барысында алынған бүйрек ұлпаларында GPx4 ақуыз деңгейі *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобы тәжірибелік топпен салыстырғанда 12 % жоғарылаған. Ал GRd ақуыз белсенділігі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда 11% жоғарылады (сурет 37).

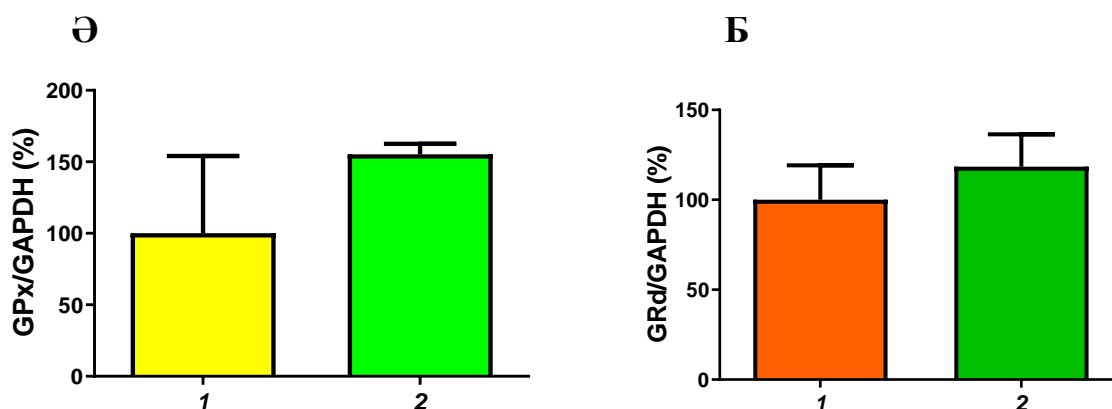
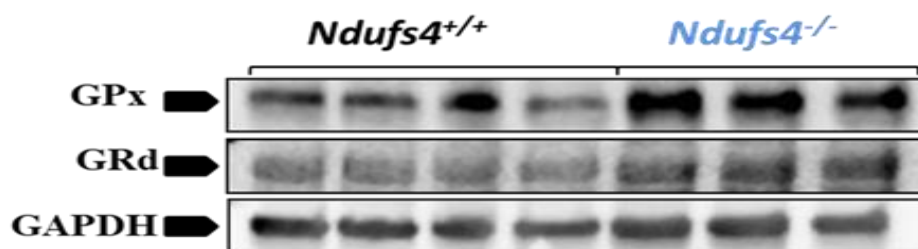


А) Кешен I жетіспеушілігі бар тышқандардың бүйрек ұлпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер . (t-test, әрбір топ үшін n = 4). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы (*Ndufs4*^{+/+}), 2-тәжірибелік топ (*Ndufs4*^{-/-}). Ординат осі: GPx, GRd арақатынасы – нмоль/мин/мг.

Сурет 37 – *Ndufs4*^{+/+} және *Ndufs4*^{-/-} тышқандарының бүйрек ұлпаларындағы ақуыз белсенділігінің өлшемі

Бұлшықет ұлпаларындағы GPx4 және GRd ақуыз белсенділігін зерттеу барысында, GPx4 ақуыз деңгейі бақылау тобында тәжірибелік топпен салыстырғанда 51% төмендеді. GRd ақуыз белсенділігі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда 18 % жоғарылады (сурет 38).

A



А) Кешен I жетіспеушілігі бар тышқандардың бұлшықет ұлпасы сығындысының Вестерн блоттинг анализі; Ә, Б) Орташа мәндермен жинақталған \pm SD мәліметтер. (t-test, әрбір топ үшін $n = 4$). Абсцисс осі: 1-бақылау тобы ($Ndufs4^{+/+}$), 2-тәжірибелік топ ($Ndufs4^{-/-}$). Ординат осі: GPx, GRd арақатынасы – нмоль/мин/мг.

Сурет 38 – $Ndufs4^{+/+}$ және $Ndufs4^{-/-}$ тышқандарының бұлшықет ұлпаларындағы ақуыз белсенділігінің өлшемі

Қорытындылай келе, ми, бүйрек, бұлшықет ұлпаларындағы GPx4 және GRd ақуыз деңгейі анықталды. Ми және бұлшықет ұлпасындағы бақылау топтары тәжірибелік топтармен салыстырғанда төмен деңгейді көрсетті, бұл дегеніміз митохондриялық энцефалиопатиямен ауыратын балалардың ерекшеліктеріне сәйкестігін білдіреді. Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан топтарында ең алдымен ми және аяқ бұлшықеттерінің қызметтері тоқтай бастайды.

4. Зерттеу нәтижелерін талқылау

Митохондрия жасуша энергиясын өндірудің негізгі орны болып табылады, сонымен қатар жасушалардың басқа да өмірлік функцияларын орындай алады. Митохондрия дисфункциясы нейродегенеративті ауруларды, метаболикалық синдромды, кардиомиопатияны, саркопенияны және жасқа байланысты ауруларда кездеседі.

Глутатион және сульфид метаболизмінде бір көміртегінің бұзылуы митохондриялық дисфункциясы бар ауруларда жаңа патомеханизм ретінде пайда болады. Алайда, бұл ауытқулардың негізіндегі механизмдер анық емес. Сонымен қатар, сульфидтердің тотығуы коэнзим Q10 жетіспеушілігімен бұзылатынын

көрсетеді. SQOR-дің ұлғаюы цистатиониннің β -синтаза және цистатионин- γ -лиазаның, транссульфурация жолының екі ферментінің, серин биосинтезінің нуклеотид метаболизмі және глутатион жүйесі сияқты сульфидпен байланысты басқа жолдардың бейімделуіне әкеледі.

Ертеректе айтылып кеткендей, CoQ10 жетіспеушілігі гетерогенді клиникалық суреттемесі бар митохондриялы синдром болып табылады. Жақында сульфидті метаболизмнің бұзылуы алғашқы CoQ жетіспеушілігінің маңызды патомеханизмі ретінде айқындалды.

In vivo жағдайында SQOR, CBS глутатион деңгейлерімен байланысты. Әдебиеттерде келтірілген зерттеулер нәтижесі бойынша глутатион жүйесі CoQ жетіспеушілігі бар жануарлардың белгілі бір ұлпаларында төмендегені көрсетілді, бұл сульфид алмасуының бұзылуымен жүзеге асырылады.

Митохондриялық дисфункция митохондрия метаболизмімен байланысты көптеген метаболикалық жолдардың әртүрлі қатысуымен гетерогенді клиникалық көріністерді тудырады, мысалы, бір көміртегі метаболизмі немесе май қышқылдарының тотығуы. Сондықтан, осы дисфункцияларды жоюдың терапиялық тәсілдерін табу негізгі міндет болып табылады.

CoQ тапшылығы SQOR деңгейінің айтарлықтай төмендеуі сульфидтер алмасуының бұзылуына және глутатион деңгейінің төмендеуіне әкеледі. Осы зерттеулерде CoQ жетіспеушілігі күкірт бар аминқышқылдарының болуына қарамастан, транссульфурация жолына да әсер ететінін көрсетілді. Сонымен қатар, кешен I суббірліктеріндегі белгілі бір молекулалық ақаулар сульфид алмасуының бұзылуына әкелетіні көрсетілді. Алайда, бұл өзгерістер кешен I қалдық белсенділігімен және SQOR митохондриялық суперкешендердің әрекеттесуімен байланысты емес екені анықталды. Бұл деректер сульфидтер алмасуының кешен I тапшылығына өзгермелі реакциясы гетерогенді аурудың фенотипіне әсер етуі мүмкін, осы реакцияның цистеин мен глициннің теңдестірілген метаболизміне қажет ететін глутатион жүйесіне де септігін тигізеді.

Қорыта келгенде, жасалған зерттеу жұмыстары мен әдебиеттерде келтірілген мағлұматтарға сүйенсек, емханаға дейінгі зерттеулер SAAR шектелген диеталар оның ішінде өмір сүру ұзақтығының артуы мен әртүрлі аурулардың дамуының алдын алу секілді көптеген пайдалы әсерлерге ие екендігін көрсетті. Алдыңғы жұмыстарда көрсетілгендей ашытқыдағы метионинді шектеулер өмір сүру ұзақтығын арттырады. Шыбындардағы негізгі аминқышқылдарының (EAA), оның ішінде метиониннің жетіспеушілігі яғни диеталық шектеулер өмір сүру ұзақтығын бақылайды. Сонымен бірге, диеталық метионин өмір сүру ұзақтығын бақылауда ақуыздың жалпы деңгейімен өзара әрекет етеді. Кеміргіштерде цистеиннің негізгі емес аминқышқылдары (NEAA) жетіспейтін және метионинді шектелген диеталар олардың өмір сүруін ұзартады және гепатиттік стресске төзімділігін арттырады.

Күкірт аминқышқылының құрамының диеталық шектеулерінің басымдығы метиониннің цистеинге айналуын бақылайтын TSP-мен байланысты болуы мүмкін және шыбындардың өмір сүру ұзақтығын диеталық шектеу арқылы арттыру үшін қажет екені белгілі болды, осыған байланысты екі маңызды фермент - CBS және CSE болып табылады. Кейбір алынған мәліметтер бойынша, тышқан

моделіне диеталық шектеу нәтижесінде ишемиялық стресске төзімділік салдарынан бауырдың реперфузиялық зақымдалуын анықтады. Бұл SAAR ферментінің CSE, TSP экспрессиясын арттырды. Осы жағдай күкіртсутегінің өнімділігі мен қорғанысының артуына алып келді. SAAR арқылы H₂S өнімділігі автономды түрде анықтау үшін гепатоциттерден алынған Hepa1-6 тышқандарға түні бойы құрамында SAAR (-Met & Cys) жоқ дақылдар берілді. In vivo жағдайында диеталық және SAAR-мен шектеу кезінде CBS және CSE экспрессиясының, сульфидтік метаболизмның in vitro өнімділігі артты. Дегенмен, әртүрлі ортада өсірілген барлық сыналған штаммдардағы сульфид деңгейі цистеин қосу арқылы төмендеді, яғни цистеиннің сульфид қалыптасуын бақылайды деп болжауға мүмкіндік береді. NAC (N-ацетил цистеин) – цистеиннің негізгі көзі болып табылады және тотықсыздырғыш тәуелсіз белсенділікке ие.

Модуляцияға ұшыраған тағамдық күкірт аминқышқылының көптеген артықшылықтарына қарамастан, H₂S митохондриялық тотығу жолының бұзылуы - бұл тышқан моделінің патомеханизмдерінің бірі болып табылса да, біздің зерттеуіміз CoQ жетіспеушілігі салдарынан энцефаломиопатияның тышқан моделіне әсер етуінің қандай да бір терапевттік оң нәтижесін көрсете алу. Осылайша, жұмыс нәтижелері күкірт аминқышқылдарын шектеу және NAC қосу арқылы өңдеу жүргізу CoQ бастапқы жетіспеушілігін емдеудің қолжетімді әдістердің бірі болатындығын көрсете алды.

Рациондағы күкірт аминқышқылының модуляциясы аурудың барысын өзгертуі мүмкін. Жұмыс барысында құрамында күкірт бар аминқышқылы қосылған диеталық шектеулі тағамдар және N-ацетил-L-цистеин қосылған *Coq9^{R239X}* тышқан моделіне жасалынды. Сонымен, жасалған тәжірибелер нәтижесінде NAC немесе SAAR - мен өңделген *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқан бүйректеріндегі глутатион жүйесін, сондай-ақ *Ndufs4^{-/-}* тышқандарының ми ұлпалары бағаланды. SQOR деңгейінің төмендеуі, CBS деңгейінің жоғарылауы және *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқан бүйрек ұлпаларының жалпы глутатион деңгейінің төмендеуі NAC немесе SAAR өңделгенде де сақталды. Сонымен қатар, *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқандарда GSSG/GSH қатынасы NAC немесе SAAR өңделгеннен кейін *Coq9^{+/+}* бақылау тобы тышқандарымен салыстырғанда төмендеді.

GPx және GRd глутатион ферменттерінің деңгейі, *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC* және *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелі тышқан топтарында *Coq9^{+/+}* бақылау тобымен салыстырғанда аздап төмендеді, дегенмен статистикалық тұрғыдан төмендеу тек *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқандарда GPx жағдайында ғана ықтималдылықты көрсетті.

Біздің зерттеулеріміздің нәтижелері әдебиеттерде көрсетілген мәліметтермен толық үндесіп отыр. Тәжірибеде қолданылған өңдеу SAAR барысында және NAC қосқан соң *Coq9^{R239X}* тышқандарының бүйректеріндегі, бас миындағы және бұлшықеттеріндегі CoQ биосинтезінің жақсарғандығы байқалды. Алайда, *Coq9^{R239X}* тышқандарының бүйректері мен бас миындағы SQOR деңгейі айтарлықтай төмендеген және SQOR деңгейінің төмендеуі SAAR барысында да немесе NAC қосқан соң да сақталды. Цистатионин-бета-синтазаның

транссульфурацияға қатысатын ферменттің деңгейлері $Coq9^{+/+}$ тышқандарымен салыстырғанда $Coq9^{R239X}$ тышқандарының бүйректерінде, бас миында және бұлшықеттерінде жоғары болғандығы қызығушылық тудырады. Бұл нәтиже TPS және H_2S тотығуының митохондриялы жолы өзара реттелген болуы керек екендігін, SAAR немесе NAC енгізу айтарлықтай әсер етпеді деп болжауға болады.

Сульфид метаболизмі глутатион жүйесімен байланысты болғандықтан, біздің тәжірибемізде глутатион және оның ферменттерінің деңгейін де қарастырдық. $Coq9^{R239X}$ тышқандарының бүйректеріндегі жалпы GSH деңгейі төмендеді және бұл өзгерістер SAAR немесе NAC өңдеуден кейін де сақталды. Бұл нәтиже CoQ сульфид метаболизмін реттеу арқылы глутатион синтезімен жанама түрде байланысты екендігін болжауға мүмкіндік берді. Жүргізілген жұмыс барысында $Coq9^{+/+}$ бақылау тышқандарымен салыстырғанда $Coq9^{R239X}$, $Coq9^{R239X}+NAC$ және $Coq9^{R239X}+SAAR$ тәжірибелі тышқандарының бүйректері мен бас миларындағы GPx және GRd деңгейлерінің төмендеуі корреляциялық байланыста болатыны айқындалды. Ми және бұлшықет ұлпаларындағы жалпы GSH деңгейі айтарлықтай өзгеріс болмады. Бұлшықет ұлпаларында SAAR өңдеу қолданған тәжірибелі тышқандарда GPx ақуыз деңгейі тышқандардың бақылау тышқан тобымен салыстырғанда артты. Сонымен, жасалған тәжірибелер нәтижесінде $Coq9^{R239X}$ тышқандарындағы сульфидтер мен глутатиондар метаболизмінің бұзылуы CoQ деңгейіне тікелей байланысты екендігін көрсетеді. Сәйкесінше, рационда күкірт аминқышқылының болғандағы өзгерістер $Coq9^{R239X}$ тышқандарының сульфид метаболизм және глутатиондар жүйесінің айтарлықтай өзгерістер байқалмады. SAAR немесе NAC енгізу $Coq9^{R239X}$ тышқандарының өміршеңдігіне әсер етпеді.

Жоғарыда баяндалғандай, $Coq9^{R239X}$ тышқандарының бүйректеріндегі митохондрия суперкешендер қалыптастырудағы қандай да бір бұзылымды көрсетпеді. Сондықтан, бақылау мен тәжірибелі топ тышқандар арасындағы еркін СШ/суперкешендер қатынасындағы айқын айырмашылық байқалған ми және бұлшықет митохондрияларындағы суперкешендер анық көрінбеді, себебі молекулалық деңгейде қарағанымызда энцефаломиопатиямен ауыратын тышқандарда ми мен бұлшықет ұлпасы бірінші зақымдалуына алып келеді.

CoQ жетіспеушілігінен митохондрия дисфункциясының тағы бір түрі – кешен I жетіспеушілігі болып табылады. Кешен I жетіспеушілігімен байланысты ең кең таралған симптомдарға Ли ауруы жатады. Оның негізгі көріністері: ақыл-ой, сенсорлы-моторлық жетіспеушілік, соқырлық, жүрек ритмінің бұзылуы, физикалық жүктемені көтере алмау және гипотония жатады. Ли синдромы бар тышқан моделінде кешен I жетіспеушілігіне байланысты ($Ndufs4^{-/-}$ тышқаны) CoQ және SQOR деңгейінің жоғарылауы байқалды. Осылайша, жұмыс барысында SQOR деңгейінің артуы глутатион жүйесіне ықпал ететіндігі анықталды. Жалпы глутатионның жоғарылауы мидың симптоматикалық ұлпасынан байқалды. Осы нәтиженің негізгі үлесі глутатион тотықтанған формада болғанымен сипатталады. Демек, симптоматикалық ұлпада тотығу стресінің артқандығын байқауға мүмкіндік береді. Бұл митохондриялы дисфункция барысындағы қалыпты құбылыс болып табылады. Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан модельдеріне NAC

және E дәруменін қолдану, олардың өмір сүру ұзақтығын арттыратындығын көрсетеді.

Зерттеу кезінде алынған келесі тышқан модельдері кешен I жетіспеушілігі бар *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топ және *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобы болды. Тәжірибеде бұл тышқан модельдерінің өмір сүруінің орташа пайыздық көрсеткіші, глутатион жүйесі, GPx4 және GRd ақуыз белсенділігі ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларында зерттелді.

Ми ұлпаларындағы GPx4 ақуыз деңгейі *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобы *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топпен салыстырғанда 5 % төмендеді. GRd ақуыз белсенділігі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда 10 % жоғарылады. Тәжірибе барысында алынған бүйрек ұлпаларында GPx4 ақуыз деңгейі *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобы тәжірибелік топпен салыстырғанда 12 % жоғарылаған. Ал GRd ақуыз белсенділігі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда 11 % жоғарылады. Бұлшықет ұлпаларындағы GPx4 ақуыз деңгейі бақылау тобында тәжірибелік топпен салыстырғанда 51 % төмендеді. GRd ақуыз белсенділігі *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелік топта *Ndufs4*^{+/+} бақылау тобымен салыстырғанда 18 % жоғарылады. Антиоксидантты ферменттер глутатионпероксидаза және глутатионредуктаза белсенділігі кезінде ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларындағы бірқатар өзгерістер анықталды. *Ndufs4*^{-/-} тәжірибелі тышқан топтарының ми ұлпаларында *Ndufs4*^{+/+} бақылау тышқан топтарына қарағанда SQOR деңгейі жоғарылауы, CBS деңгейінің төмендеуі, жалпы глутатион деңгейінің және GSSG/GSH қатынасының жоғарылауы анықталды, ал глутатион ферменттерінің деңгейінде айтарлықтай айырмашылық байқалмады. Ғаламдық масштабта бұл деректер сульфидтердің метаболизмі күкірт аминқышқылдарының болуына қарамастан глутатион деңгейіне әсер ететіндігін растайды.

Қорыта келгенде, жасалған зерттеу жұмыстары мен әдебиеттерде келтірілген мағлұматтарға сүйенсек, бұл зерттеуде біз сульфидті метаболизмнің митохондриялы аурулардың патомеханизмдеріне жататынын, алайда оның арнайы модуляциясы молекулярлы ақауларға байланысты әртүрлі болуы мүмкін екендігін көрсетілді. Яғни, митохондрия метаболизмі өзгерісіндегі тотығу стресінің жоғарылауы нәтижесінде әртүрлі митохондриялық дисфункциялар, соның ішінде CoQ және кешен I жетіспеушілігі бірқатар ауруларды тудыратындығы анықталды.

ҚОРЫТЫНДЫ

Алынған нәтижелер негізінде келесідей қорытындылар жасалынды:

1. CoQ жетіспеушілігі бар тышқан топтарының рациондарына күкіртті амин қышқылдардың мөлшеріне диеталық шектеулер қойылды және N-ацетил-L-цистеинді қолданып өңдеу оң нәтиже беріп, өмір сүрудің пайыздық көрсеткіштерін арттырды.

2. SAAR мен өңделген *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқан ми ұлпаларында, NAC пен өңдеу кезінде бүйрек ұлпаларында, SAAR мен NAC өңдеулерінде бұлшықет ұлпаларында SQOR деңгейі жоғарылауы анықталды.

3. SAAR мен NAC өңдеулерінен кейін цистатионин γ -лиаза (CSE) деңгейі бұлшықет ұлпаларында оң нәтиже көрсетті. Ал SAAR мен NAC өңдеулерінде цистатионин γ -лиаза (CSE) және цистатионин- β -синтаза (CBS) деңгейіне ми және бүйрек ұлпаларында нәтиже өзгеріссіз қалды.

4. *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқандарда NAC немесе SAAR өңделгеннен кейін GSH жүйесі ми және бұлшықет ұлпаларында көбейген, яғни біз күткендей нәтиже көрсетілді. Ал бүйрек ұлпаларында нәтиже өңдеуден кейінде өзгеріссіз қалды. GPx және GRd глутатион ферменттерінің деңгейі, *Coq9^{R239X}*, *Coq9^{R239X}+NAC* және *Coq9^{R239X}+SAAR* тәжірибелі тышқан топтарында *Coq9^{+/+}* бақылау тобымен салыстырғанда аздап төмендеді, дегенмен статистикалық тұрғыдан төмендеу тек *Coq9^{R239X}* тәжірибелі тышқандарда GPx жағдайында ғана ықтималдылықты көрсетті.

5. Ми, бүйрек және бұлшықет ұлпаларындағы SAAR және NAC-пен өңдеуден кейінгі CoQ9, CoQ10, DMQ9 деңгейлеріндегі және DMQ9/CoQ9 қатынасындағы айырмашылықтарды анықтауда айтарлықтай айырмашылық болмады. Митохондрия тыныс алу тізбегі кешендерінің қалыптасуы мен тұрақтылығын SAAR және NAC-пен өңдеуден кейін бүйрек митохондрия фракцияларында кешен I, II, III, IV, суперкешеннің (SC) қалыптасу көрсеткіштерінің оң нәтижесі анықталды.

6. *Ndufs4^{-/-}* тәжірибелі тышқан топтарының ми ұлпаларында *Ndufs4^{+/+}* бақылау тышқан топтарына қарағанда SQOR деңгейі арта түсті, CBS деңгейінің төмендеуі, жалпы глутатион деңгейінің және GSSG/GSH қатынасының жоғарылауы анықталды.

Қойылған міндеттердің толығымен орындалуын бағалау

Диссертациялық жұмыста қойылған мақсаттарға сәйкес міндеттер толығымен орындалды. Митохондрия метаболизмі кезіндегі тотығу стресінің артуы немесе кемуі нәтижесінде пайда болған митохондриялық дисфункция түрлері CoQ жетіспеушілігі және Кешен I жетіспеушілігі бар тышқан топтарында *in vivo* жағдайында тәжірибе жасалды. Жұмыс барысында терапиялық мақсатта қолданылған өңдеулер: құрамында күкіртті амин қышқылдары шектелген тағам және N-ацетил-L-цистеинді қолдану арқылы оң әсер байқалғандығын анықтадық.

Бастапқы көрсеткіштер мен нәтижелерді қолдану нұсқаулары

Жасалған тәжірибелерді емдеу алды мақсаттарда қолдануға болады. Диссертацияда келтірілген мағлұматтар әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-да «Тотығу

стресінің механизмдері» пәні бойынша дәрістік сабақтарға енгізілді. Біздің зерттеу жұмысымыздан алынған мәліметтерді биохимия, молекулалық биология, физиология салалары бойынша дәріс беруде қолдануға болады.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Fernandez-Vizarra E, Lopez-Perez MJ, Enriquez JA. Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods*. 2002;26(4):292-7.
2. Barriocanal-Casado E, Cueto-Urena C, Benabdellah K, Gutierrez-Guerrero A, Cobo M, Hidalgo-Gutierrez A, et al. Gene Therapy Corrects Mitochondrial Dysfunction in Hematopoietic Progenitor Cells and Fibroblasts from Coq9R239X Mice. *PLoS One*. 2016;11(6):e0158344.
3. Luna-Sanchez M, Hidalgo-Gutierrez A, Hildebrandt TM, Chaves-Serrano J, Barriocanal-Casado E, Santos-Fandila A, et al. CoQ deficiency causes disruption of mitochondrial sulfide oxidation, a new pathomechanism associated with this syndrome. *EMBO Mol Med*. 2017;9(1):78-95.
4. Garcia-Corzo L, Luna-Sanchez M, Doerrier C, Garcia JA, Guaras A, Acin-Perez R, et al. Dysfunctional Coq9 protein causes predominant encephalomyopathy associated with CoQ deficiency. *Hum Mol Genet*. 2013;22(6):1233-48.
5. Hine C, Mitchell JR. Calorie restriction and methionine restriction in control of endogenous hydrogen sulfide production by the transsulfuration pathway. *Exp Gerontol*. 2015;68:26-32.
6. Ruckenstuhl C, Netzberger C, Entfellner I, Carmona-Gutierrez D, Kickenweiz T, Stekovic S, et al. Lifespan extension by methionine restriction requires autophagy-dependent vacuolar acidification. *PLoS Genet*. 2014;10(5):e1004347.
7. Grandison RC, Piper MD, Partridge L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in *Drosophila*. *Nature*. 2009;462(7276):1061-4.
8. Lees EK, Krol E, Grant L, Shearer K, Wyse C, Moncur E, et al. Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell*. 2014;13(5):817-27.
9. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell*. 2005;4(3):119-25.
10. Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr*. 1993;123(2):269-74.
11. Nunnari, J. and Suomalainen, A. (2012) Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148, 1145-1159.
12. Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K. et al. (2008) A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*, 134, 112-123.
13. Nikkanen, J., Forsstrom, S., Euro, L., Paetau, I., Kohnz, R.A., Wang, L., Chilov, D., Viinamaki, J., Roivainen, A., Marjamaki, P. et al. (2016) Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism. *Cell Metab.*, 23, 635-648.

14. Bao, X.R., Ong, S.E., Goldberger, O., Peng, J., Sharma, R., Thompson, D.A., Vafai, S.B., Cox, A.G., Marutani, E., Ichinose, F. et al. (2016) Mitochondrial dysfunction remodels one-carbon metabolism in human cells. *Elife*, 5.
15. Forsstrom, S., Jackson, C.B., Carroll, C.J., Kuronen, M., Pirinen, E., Pradhan, S., Marmyleva, A., Auranen, M., Kleine, I.M., Khan, N.A. et al. (2019) Fibroblast Growth Factor 21 Drives Dynamics of Local and Systemic Stress Responses in Mitochondrial Myopathy with mtDNA Deletions. *Cell Metab*, 30, 1040-1054 e1047.
16. Krug, A.K., Gutbier, S., Zhao, L., Poltl, D., Kullmann, C., Ivanova, V., Forster, S., Jagtap, S., Meiser, J., Leparc, G. et al. (2014) Transcriptional and metabolic adaptation of human neurons to the mitochondrial toxicant MPP(+). *Cell Death Dis*, 5, e1222.
17. Lohman DC, Forouhar F, Beebe ET, Stefely MS, Minogue CE, Ulbrich A, et al. Mitochondrial COQ9 is a lipid-binding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(44):E4697-705.
18. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1660(1-2):171-99.
19. Dilley RA. Frederick Loring Crane (1925-2016): Discoverer of coenzyme Q10 and rediscoverer of plastoquinone. *Photosynth Res*. 2017;131(3):237-9.
20. Littarru GP, Nakamura R, Ho L, Folkers K, Kuzell WC. Deficiency of Coenzyme-Q10 in Gingival Tissue from Patients with Periodontal Disease. *P Natl Acad Sci USA*. 1971;68(10):2332-&.
21. Mellors A, Tappel AL. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J Biol Chem*. 1966;241(19):4353-6.
22. Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(7):2379-82.
23. Lopez L.C., Schuelke M, Quinzii CM, Kanki T, Rodenburg RJ, Naini A, et al. Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet*. 2006;79(6):1125-9.
24. Quinzii C, Naini A, Salviati L, Trevisson E, Navas P, Dimauro S, et al. A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet*. 2006;78(2):345-9.
25. Mellors A, Tappel AL. Quinones and Quinols as Inhibitors of Lipid Peroxidation. *Lipids*. 1966;1(4):282-&.
26. Berezov TT, Kozirev KM. Serum creatine kinase BB-isozyme in Alzheimer's disease diagnosis. *Int J Psychophysiol*. 1998;30(1-2):181-.
27. Cammer W. Protection of cultured oligodendrocytes against tumor necrosis factor-alpha by the antioxidants coenzyme Q(10) and N-acetyl cysteine. *Brain Res Bull*. 2002;58(6):587-92.
28. Bentinger M, Tekle M, Dallner G. Coenzyme Q - Biosynthesis and functions. *Biochem Bioph Res Co*. 2010;396(1):74-9.
29. Espinos C, Felipo V, Palau F. Inherited neuromuscular diseases. Translation from pathomechanisms to therapies. *Adv Exp Med Biol*. 2009;652:v-vi.

30. Jackson MR, Melideo SL, Jorns MS. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry*. 2012;51(34):6804-15.
31. [Coenzyme Q10 Deficiency Linked To Rare Mitochondrial Disease Found Mainly In Children \(huntingtonsdiseasenews.com\)](http://huntingtonsdiseasenews.com)
32. Jones ME. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:253-79.
33. Garcia-Corzo L, Luna-Sanchez M, Doerrier C, Ortiz F, Escames G, Acuna-Castroviejo D, et al. Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(7):893-901.
34. Kawamukai M. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q(10) by yeasts and other organisms. *Biotechnol Appl Bioc*. 2009;53:217-26.
35. Ashby MN, Edwards PA. Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. *J Biol Chem*. 1990;265(22):13157-64.
36. Okada K, Suzuki K, Kamiya Y, Zhu X, Fujisaki S, Nishimura Y, et al. Polyprenyl diphosphate synthase essentially defines the length of the side chain of ubiquinone. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1302(3):217-23.
37. Saiki R, Nagata A, Kainou T, Matsuda H, Kawamukai M. Characterization of solanesyl and decaprenyl diphosphate synthases in mice and humans. *Febs J*. 2005;272(21):5606-22.
38. Saiki R, Nagata A, Uchida N, Kainou T, Matsuda H, Kawamukai M. Fission yeast decaprenyl diphosphate synthase consists of Dps1 and the newly characterized Dlp1 protein in a novel heterotetrameric structure (vol 270, pg 4113, 2003). *Eur J Biochem*. 2003;270(21):4400-.
39. Gin P, Clarke CF. Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase. *J Biol Chem*. 2005;280(4):2676-81.
40. Kawamukai M. Biosynthesis and bioproduction of coenzyme Q10 by yeasts and other organisms. *Biotechnol Appl Biochem*. 2009;53(Pt 4):217-26.
41. Suzuki K, Ueda M, Yuasa M, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H. Evidence That Escherichia-Coli Ubia Product Is a Functional Homolog of Yeast Coq2, and the Regulation of Ubia Gene-Expression. *Biosci Biotech Bioch*. 1994;58(10):1814-9.
42. Miki R, Saiki R, Ozoe Y, Kawamukai M. Comparison of a coq7 deletion mutant with other respiration-defective mutants in fission yeast. *Febs J*. 2008;275(21):5309-24.
43. Poon WW, Barkovich RJ, Hsu AY, Frankel A, Lee PT, Shepherd JN, et al. Yeast and rat Coq3 and Escherichia coli UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(31):21665-72.
44. Belogradov GI, Lee PT, Jonassen T, Hsu AY, Gin P, Clarke CF. Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2001;392(1):48-58.

45. Nguyen TP, Casarin A, Desbats MA, Doimo M, Trevisson E, Santos-Ocana C, et al. Molecular characterization of the human COQ5 C-methyltransferase in coenzyme Q10 biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(11):1628-38.
46. Gin P, Hsu AY, Rothman SC, Jonassen T, Lee PT, Tzagoloff A, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25308-16.
47. Stenmark P, Grunler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P, Berthold DA. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem*. 2001;276(36):33297-300.
48. Reidenbach AG, Kemmerer ZA, Aydin D, Jochem A, McDevitt MT, Hutchins PD, et al. Conserved Lipid and Small-Molecule Modulation of COQ8 Reveals Regulation of the Ancient Kinase-like UbiB Family. *Cell Chem Biol*. 2018;25(2):154-65 e11.
49. Sippel CJ, Goewert RR, Slachman FN, Olson RE. The regulation of ubiquinone-6 biosynthesis by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1983;258(2):1057-61.
50. Korkmaz E, Lipska-Zietkiewicz BS, Boyer O, Gribouval O, Fourrage C, Tabatabaei M, et al. ADCK4-Associated Glomerulopathy Causes Adolescence-Onset FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):63-8.
51. Ashraf S, Gee HY, Woerner S, Xie LX, Vega-Warner V, Lovric S, et al. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5179-89.
52. Yang HL, Lin MW, Korivi M, Wu JJ, Liao CH, Chang CT, et al. Coenzyme Q0 regulates NFkappaB/AP-1 activation and enhances Nrf2 stabilization in attenuation of LPS-induced inflammation and redox imbalance: Evidence from in vitro and in vivo studies. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(2):246-61.
53. Frerman FE. Acyl-CoA dehydrogenases, electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein dehydrogenase. *Biochem Soc Trans*. 1988;16(3):416-8.
54. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*. 1998;273(40):25734-40.
55. Do TQ, Schultz JR, Clarke CF. Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7534-9.
56. Sevin DC, Sauer U. Ubiquinone accumulation improves osmotic-stress tolerance in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol*. 2014;10(4):266-72.
57. Petrillo E, Godoy Herz MA, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, Yanovsky MJ, et al. A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science*. 2014;344(6182):427-30.
58. Stefely JA, Pagliarini DJ. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(10):824-43.
59. Mollet J., Giurgea I., Schlemmer D. et al. Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone 83

deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest* 2007; 117: 3: 765—772.

60. López L.C., Schuelke M., Quinzii C.M. et al. Leigh Syndrome with Nephropathy and CoQ10 Deficiency Due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) Mutations. *Am J Hum Genet* 2006; 79: 6: 1125—1129.

61. Diomedi-Camassei F., Di Giandomenico S., Santorelli F.M. et al. COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 10: 2773—2780.

62. Quinzii C.V., DiMauro S., Hirano M. Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem Res* 2007; 32: 723—727.

63. Salviati L., Sacconi S., Murer L. et al. Infantile encephalomyopathy and nephropathy with CoQ10 deficiency: a CoQ10-responsive condition. *Neurology* 2005; 65: 606—608.

64. Quinzii C., Naini A., Salviati L. et al. A Mutation in ParaHydroxybenzoate-Polyprenyl Transferase (COQ2) Causes Primary Coenzyme Q10 Deficiency. *Am J Hum Genet* 2006; 78: 345—349.

65. Rahman S., Hargreaves I., Clayton P., Heales S. Neonatal presentation of coenzyme Q10 deficiency. *J Pediat* 2001; 139: 456—458.

66. Duncan A.J., Bitner-Glindzicz M., Meunier B. et al. A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 558—566.

67. Леонтьева И.В. Лекции по кардиологии детского возраста. М: Медпрактика 2005; 138—201.

68. Кравцова Л.А., Школьников М.А. Биологические и клинические аспекты применения коэнзима Q10 в кардиологической практике. *Рос вестн перинатол и педиат* 2008; 1: 51—57.

69. Quinzii C.M., López L.C., Naini A. et al. Human CoQ10 deficiencies. *Biofactors* 2008; 32: 1—4: 113—118.

70. Lalani S.R., Vladutiu G.D., Plunkett K. et al. Isolated Mitochondrial Myopathy Associated With Muscle Coenzyme Q10 Deficiency. *Arch Neurol* 2005; 62: 317—320.

71. Sacconi S., Trevisson E., Salviati L. et al. Coenzyme Q10 is frequently reduced in muscle of patients with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul Dis* 2010; 20: 1: 44—48.

72. Николаева Е.А., Яблонская М.И., Харабадзе М.Н. и др. Эффективность комплексной терапии при разных формах митохондриальных заболеваний у детей. *Рос вестн перинатол и педиат* 2009; 6: 26—30.

73. Di Giovanni S., Mirabella M., Spinazzola A. et al. Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology* 2001; 57: 515—518.

74. Николаева Е.А., Мамедов И.С. Дефицит коэнзима Q10 у детей: клинико-генетические варианты, пути диагностики и терапии. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2012; 2: 77-83.

75. Sherratt HS. Mitochondria: structure and function. *Rev Neurol (Paris)*. 1991;147(6-7):417-30.

76. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013;87(7):1157-80.
77. Beckman KB, Ames BN. Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat Res.* 1999;424(1-2):51-8.
78. Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol.* 2011;193(5):809-18.
- Bogenhagen D, Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell.* 1977;11(4):719-27.
79. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.* 2016;7(29):44879-905.
80. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull.* 2013;106:135-59.
81. Muller-Hocker J, Horvath R, Schafer S, Hessel H, Muller-Felber W, Kuhr J, et al. Mitochondrial DNA depletion and fatal infantile hepatic failure due to mutations in the mitochondrial polymerase gamma (POLG) gene: a combined morphological/enzyme histochemical and immunocytochemical/biochemical and molecular genetic study. *J Cell Mol Med.* 2011;15(2):445-56.
82. Zhang H, Meng LH, Pommier Y. Mitochondrial topoisomerases and alternative splicing of the human TOP1mt gene. *Biochimie.* 2007;89(4):474-81.
83. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012;337(6098):1062-5.
84. Arakaki N, Nishihama T, Kohda A, Owaki H, Kuramoto Y, Abe R, et al. Regulation of mitochondrial morphology and cell survival by Mitogenin I and mitochondrial single-stranded DNA binding protein. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(9):1364-72.
85. Suenaga M. [Study on the novel factors regulating mitochondrial dynamics]. *Yakugaku Zasshi.* 2010;130(11):1543-7.
86. Huang CY, Chiang SF, Lin TY, Chiou SH, Chow KC. HIV-1 Vpr triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction. *PLoS One.* 2012;7(3):e33657.
87. Chen XJ, Butow RA. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet.* 2005;6(11):815-25.
88. Hildebrandt TM, Grieshaber MK. Redox regulation of mitochondrial sulfide oxidation in the lugworm, *Arenicola marina*. *Journal of Experimental Biology.* 2008;211(16):2617-23.
89. Kabil O, Banerjee R. Redox Biochemistry of Hydrogen Sulfide. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(29):21903-7.
90. Quinzii CM, Luna-Sanchez M, Ziosi M, Hidalgo-Gutierrez A, Kleiner G, Lopez LC. The Role of Sulfide Oxidation Impairment in the Pathogenesis of Primary CoQ Deficiency. *Front Physiol.* 2017;8:525.
91. Fu M, Zhang W, Wu L, Yang G, Li H, Wang R. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):2943-8.

92. Студеникин В. М., Горюнова А. В., Грибакин С. Г., Журкова Н. В., Звонкова Н. Г., Ладодо К. С., Пак Л. А., Рославцева Е. А., Степакина Е. И., Студеникина Н. И., Турсунхужаева С. Ш., Шелковский В. И. Митохондриальные энцефалопатии. Глава 37. В кн.: Нейродиетология детского возраста (коллективная монография)/Под ред. Студеникина В. М. М.: Династия, 2012. С. 415–424.

93. DiMauro S. Mitochondrial diseases // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. 1658 (1–2): 80–88.

94. Chinnery P. F., DiMauro S., Shanske S., Schon E. A., Zeviani M., Mariotti C., Carrara F., Lombes A., Laforet P., Ogier H., Jaksch M., Lochmuller H., Horvath R., Deschauer M., Thorburn D. R., Bindoff L. A., Poulton J., Taylor R. W., Matthews J. N., Turnbull D. M. Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder // *Lancet*. 2004. 364 (9434): 592–596.

95. Miles M. V., Miles L., Tang P. H., Horn P. S., Steele P. E., DeGrauw A. J., Wong B. L., Bove K. E. Systematic evaluation of muscle coenzyme Q10 content in children with mitochondrial respiratory chain enzyme deficiencies // *Mitochondrion*. 2008. Vol. 8 (2): 170–180.

96. Martikainen M. H., Chinnery P. F. Mitochondrial disease: mimics and chameleons // *Pract. Neurol*. 2015. Vol. 15 (6): 424–435.

97. Koga Y., Ishibashi M., Ueki I., Yatsuga S., Fukiyama R., Akita Y., Matsuishi T. Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS // *Neurology*. 2002. Vol. 58 (5): 827–828.

98. Siciliano G., Volpi L., Piazza S., Ricci G., Mancuso M., Murri L. Functional diagnostics in mitochondrial diseases // *Biosci. Rep*. 2007. Vol. 27 (1–3): 53–67.

99. Sarnat H. B., Menkes J. H. Mitochondrial encephalomyopathies. Ch. 2. In: *Child Neurology* (Menkes J. H., Sarnat H. B., Maria B. L., eds). 7 th ed. Philadelphia-Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 143–161.

100. Сухоруков В. С. Очерки митохондриальной патологии. М.: Медпрактика-М, 2011. 288 с.

101. Koga Y., Akita Y., Nishioka J., Yatsuga S., Povalko N., Tanabe Y., Fujimoto S., Matsuishi T. L-arginine improves the symptoms of strokelike episodes in MELAS // *Neurology*. 2005. Vol. 64 (4): 710–712.

102. Finsterer J., Bindu P. S. Therapeutic strategies for mitochondrial disorders // *Pediatr. Neurol*. 2015. Vol. 52 (3): 302–313.

103. Rai P. K., Russell O. M., Lightowers R. N., Turnbull D. M. Potential compounds for the treatment of mitochondrial disease // *Br. Med. Bull*. 2015. Nov 20. pii: ldv046. [Epub ahead of print].

104. Chi C. S. Diagnostic approach in infants and children with mitochondrial diseases // *Pediatr. Neonatol*. 2015. Vol. 56 (1): 7–18.

105. Kaufmann P., Engelstad K., Wei Y., Jhung S., Sano M. C., Shungu D. C., Millar W. S., Hong X., Gooch C. L., Mao X., Pascual J. M., Hirano M., Stacpoole P. W., DiMauro S., De Vivo D. C. Dichloroacetate causes toxic neuropathy in MELAS: a randomized, controlled clinical trial // *Neurology*. 2006. Vol. 66 (3): 324–330.

106. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(8):1240-7.
107. Castellani R, Hirai K, Aliev G, Drew KL, Nunomura A, Takeda A, et al. Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2002;70(3):357-60.
108. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(5):1066-77.
109. Guo, Runyu, Shuai Zong, Meng Wu, Jinke Gu, and Maojun Yang. "Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I₂III₂IV₂." *Cell* 170, no. 6 (September 7, 2017): 1247-1257.
110. Schagger H., Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes // *The Journal of biological chemistry*. — 2001. — Vol. 276, no. 41. — P. 37861—37867.
111. Dimroth P., Kaim G., Matthey U. Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F₀ ATP synthase // *The Journal of experimental biology*. — 2000. — Vol. 203, no. Pt 1. — P. 51—59.
112. Schagger H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria // *Biochimica et biophysica acta*. — 2002. — Vol. 1555, no. 1-3. — P. 154—159.
113. Schultz B. E., Chan S. I. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes // *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. — 2001. — Vol. 30. — P. 23—65.
114. Rich P. R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. // *Biochemical Society transactions*. — 2003. — Vol. 31, no. Pt 6. — P. 1095—1105.
115. Crane F. L. Biochemical functions of coenzyme. // *Journal of the American College of Nutrition*. — 2001. — Vol. 20, no. 6. — P. 591—598.
116. Cecchini G., Schröder I., Gunsalus R. P., Maklashina E. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. // *Biochimica et biophysica acta*. — 2002. — Vol. 1553, no. 1-2. — P. 140—157.
117. Vander Heiden M. G., Cantley L. C., Thompson C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. // *Science (New York, N.Y.)*. — 2009. — Vol. 324, no. 5930. — P. 1029—1033.
118. Lenaz G., Fato R., Genova M. L., Bergamini C., Bianchi C., Biondi A. Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. // *Biochimica et biophysica acta*. — 2006. — Vol. 1757, no. 9-10. — P. 1406—1420.
119. Noji H., Yoshida M. The rotary machine in the cell, ATP synthase. // *The Journal of biological chemistry*. — 2001. — Vol. 276, no. 3. — P. 1665—1668.
120. Horsefield R., Iwata S., Byrne B. Complex II from a structural perspective. // *Current protein & peptide science*. — 2004. — Vol. 5, no. 2. — P. 107—118.
121. Zhang J., Frerman F. E., Kim J.J. Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2006. — Vol. 103, no. 44. — P. 16212—16217.

122. Berry E. A., Guergova-Kuras M., Huang L. S., Crofts A. R. Structure and function of cytochrome bc complexes. // *Annual review of biochemistry*. — 2000. — Vol. 69. — P. 1005—1075.

123. Lambert A. J., Brand M. D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) // *The Journal of biological chemistry*. — 2004. — Vol. 279, no. 38. — P. 39414—39420.

124. Heinemeyer J., Braun H. P., Boekema E. J., Kouril R. A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. // *The Journal of biological chemistry*. — 2007. — Vol. 282, no. 16. — P. 12240—12248.

125. Ussipbek B.A. Modification on sulfur aminoacids availability in the diet do not induce changes in sulfide metabolism under CoQ deficiency // VI Халықаралық Фараби оқулары, Алматы, Қазақстан 2-12 сәуір 2019. — 2019. — Б. 167-168.

126. Ussipbek B.A. Role of oxidative stress in encephalopathy // «Фараби әлемі» атты студенттермен жас ғалымдардың халықаралық конф. 6-9 сәуір 2020. — 2020. — Б. 196-197.

127. Үсіпбек Б.А., Роль сульфидного метаболизма при дефиците COQ // «Фараби әлемі» атты студенттермен жас ғалымдардың халықаралық конф. 6-9 сәуір 2020. — 2020. — Б. 212-213.

128. Ussipbek B., Barriocanal-Casado E, González-García P., Hidalgo-Gutiérrez, A., Murzakhmetova M., López L.C. Perturbation of sulfide metabolism under COQ deficiency is maintained after modification of sulfur aminoacids availability in the diet // I Congreso de Investigadores del PTS, 13-15 de febrero de 2019, Spain. — 2019. — P. 447-448.

129. Давыдов В.В., Клещев Н.Ф. Основы общей биохимии: учеб. пособие. — Харьков: НТУ «ХПИ», 2007. — 380 с.

130. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология. — М.: МИР, 2006.

131. Уиллет Э. Генетика без тайн. — М.: ЭКСМО, 2008.

132. Дерябин Д.Г. Функциональная морфология клетки. — М.: КДУ, 2005.

133. Iverson T.M. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2012. — Т. 1827, вып. 5. — С. 648—657.

134. Biswas S. K., Rahman I. Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol. Aspects Med.* 2009. Vol. 30 (1–2). P. 60–76.

135. Dickinson D. A., Forman H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 2002. Vol. 64. P. 1019–1026.

136. Forman H. J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 2009. Vol. 30 (1–2). P. 1–12.

137. Garcia-Ruiz C., Fernández-Checa J. C. Mitochondrial glutathione: hepatocellular survival-death switch. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2006. Vol. 21. P. 3–6.

138. Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa J. C. Redox regulation of hepatocyte apoptosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2007. Vol. 22. P. 38–42.

139. Ghezzi P. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 2005. Vol. 33. P. 1378–1381.

140. Sahebkhari, N., Fernandez-Guerra, P., Nochi, Z., Carlsen, J., Bross, P. and Palmfeldt, J. (2019) Deficiency of the mitochondrial sulfide regulator ETHE1 disturbs cell growth, glutathione level and causes proteome alterations outside mitochondria. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1865, 126-135.
141. Young S and Woodside J.V. Antioxidants in health and disease // *J. Clin. Pathol.* – 2001. – Vol. 54. – N 3. – P.176-186.
142. Young S. and Woodside J.V. Antioxidants in health and disease // *J. Clin. Pathol.* – 2001. – Vol.54, № 3. – P.176-186.
143. Limon-Pacheco J. and Gonshebbat M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* – 2009. – Vol. 674, № 1-2. – P.137-147.
144. Franco, R., and Cidlowski, J.A. (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant, *Cell Death and Differentiation*, 16, 1303–1314.
145. Hernández-García D., Wood C. D., Castro-Obregón S. and Covarrubias L. Reactive oxygen species: A radical role in development? // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2010. – Vol. 49, № 2. – P.130-143.
146. Shao H.B., Chu L.Y., Lu Z.H., Kang C.M. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signalling pathways in higher plant cells // *Int. J. Biol. Sci.* – 2008. – Vol.4, № 1. – P.8-14.
147. Усипбек Б.А., Лопез Л.К., Аблайханова Н.Т., Мурзахметова М.К. Оксидативный стресс и митохондриальная дисфункция // «Известия НАН РК. Серия биологических и медицинских наук». -2020. - №2 (338). – С.31-40. <https://doi.org/10.32014/2020.2519-1629.10>
148. Ussipbek B.A., López L.C., Murzakhmetova M.K. Prospects of the application of coenzyme Q10 for correction of mitochondrial dysfunction // *Вестник КазНМУ.* – 2019. – №1.– С.404-408.
149. Мурзахметова М.К. Механизмы структурно-функциональных изменений и повышение резистентности биологических мембран при экстремальных воздействиях: дисс. докт. биол. наук: 03.00.13 и 03.00.04. Алматы, 2001. – 232 с.
150. Мурзахметова М.К., Михалкина Н.И. Структурно-функциональные перестройки клеточных мембран в норме и при стрессовых состояниях // *Вестник КазНУ, сер.экологическая.* – 2002. – Т.11, № 2.– С.40-45.
151. Мурзахметова М.К. Роль антиоксидантов в защите организма от свободнорадикального окисления // *Здоровье и болезнь.* – 2007. – № 4. – С.144-145.
152. Forman H. J., Dickinson D. A. Oxidative signaling and glutathione synthesis. *Biofactors.* 2003. Vol. 17. P. 1–12
153. Liu H., Wang H., Shenvi S., Hagen T. M., Liu R. M. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004. Vol. 1019. P. 346–349.
154. Kanzok S. M., Fechner A., Bauer H., Ulschmid J. K., Muller H. M., Botella - Munoz J., Schneuwly S., Schirmer R., Becker K. Substitution of the thioredoxin system

for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2001. Vol. 291. P. 643–646.

155. Franklin C. C., Rosenfeld -Franklin M. E., White C., Kavanagh T. J., Fausto N. TGF β 1-induced suppression of glutathione antioxidant defenses in hepatocytes: caspase-dependent posttranslational and caspase-independent transcriptional regulatory mechanisms. *FASEB J*. 2003. Vol. 10. P. 1096.

156. Jones D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. *Methods Enzymol*. 2002. Vol. 348. P. 93–112.

157. Hogg N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2002. Vol. 42. P. 585–600.

158. Humphries K. M., Szweda P. A., Szweda L. I. Aging: a shift from redox regulation to oxidative damage. *Free Radic. Res*. 2006. Vol. 40. P. 1239–1243.

159. Wang H., Liu H., Liu R. M. Gender differences in glutathione metabolism during aging in mice. *Exp. Gerontology*. 2003. Vol. 38. P. 507–517.

160. Oja S. S., Janaky R., Varga V., Saranasaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem. Int*. 2000. Vol. 37. P. 299–306.

161. González-García P., Hidalgo-Gutiérrez A., Mascaraque C., Barriocanal-Casado E., Bakkali M., Ziosi M., Ussipbek B. A., Sánchez-Hernández S., Escames G., Prokisch H., Martín F., Quinzii C.M., López L.C. Coenzyme Q10 modulates sulfide metabolism and links the mitochondrial respiratory chain to pathways associated to one carbon metabolism // *Hum. Mol. Genet*. 2020. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa214>.

162. Lopez LC, Quinzii CM, Area E, Naini A, Rahman S, Schuelke M, et al. Treatment of CoQ(10) deficient fibroblasts with ubiquinone, CoQ analogs, and vitamin C: time- and compound-dependent effects. *PLoS One*. 2010;5(7):e11897.

163. Шульгин К.К. Получение и свойства глутатионпероксидазы / Т.П. Рахманова, Т.Н. Попова // *Прикладная биохимия и микробиология*. -2008. - Т.44, №3. - С. 276-280.

164. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н., Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем // *Успехи современного естествознания*. - 2006. - №7. - С.37-41.

165. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Реутов В.П. // *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*. // М.: МАИК. -2006.-С. 556.

166. Шабалов В. И., Сарбаева Н. Н., Милякова М. И. и др., Свободнорадикальное окисление и активность ферментов биотрансформации ксенобиотиков в печени крыс с экспериментальным острым панкреатитом // *Бюлл. экспер. биол. и мед.* - 2001. - 132, № 8. -С. 164-167.

167. Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases // *Biol. Chem.* - 2009. - № 3. - P. 191-214.

168. Arrigo A.P., Virot S., Chaufour S. et al. Hsp27 Consolidates Intracellular Redox Homeostasis by Upholding Glutathione in Its Reduced Form and by Decreasing Iron Intracellular Levels // *Antioxidant & Redox Signaling*. -2005. - Vol. 7, Iss. 3-4. - P. 414-422.

169. Board P.G., Anders M.W. Reactive oxygen species and adhesion formation // *Human Reproduction*. - 2005. - Vol. 18 Iss. 12. - P. 2503-2507.
170. Board P.G., Coggan M., Chelvanayagam G. et al. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases // *J. Biol. Chem*. - 2000. - Vol. 275. - P. 24798-24806.
171. Hayes J. D., Flangan J. U., Jowsey I. R. Glutathione transferases // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. - 2005. - № 45. - P. 51-88.
172. Jacob C., Jamier V., Ba L.A. Redox active secondary metabolites // *Current Opinion in Chemical Biology*. - 2011. - Vol. 15, Iss. 1. - P. 149-155.
173. Januel C., El Hentati F.Z., Carreras M. Phospholipid-hydroperoxide glutathione (GPx-4) localization in resting platelets, and compartmental change during platelet activation // *Biochim Biophys Acta*. - 2006. - Vol. 1761.-P. 1228-1234.
174. Imai H., Nakagava Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells // *Free Rad. Biol. Med*. - 2003. - Vol. 34. - P. 145-169.
175. Micke P., Beeh K.M., Schlaak J.F. Oral supplementation with whey proteins increases plasma glutathione levels of HIV-infected patients // *European Journal of Clinical Investigation*. - 2001. - Vol. 31, Iss. 2. - P. 171-178.
176. Diaz-Sandoval LJ, Kosowsky BD, Losordo DW. Acetylcysteine to prevent angiography-related renal tissue injury (the apart trial). *Am J Cardiol*. 2002;89:356–358.
177. Carbonell N, Sanjuan R, Blasco M, Jorda A, Miguel A. N-acetylcysteine: short-term clinical benefits after coronary angiography in high-risk renal patients. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63:12–19.
178. Briguori C, Manganeli F, Scarpato P, Elia PP, Golia B, Riviezzo G, Lepore S, Librera M, Villari B, Colombo A, Ricciardelli B. Acetylcysteine and contrast agent-associated nephrotoxicity. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:298–303.
179. Sun Z, Fu Q, Cao L, Jin W, Cheng L, Li Z. Intravenous N-acetylcysteine for prevention of contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *PLoS ONE*. 2013;8:e55124.
180. Kang X, Hu DY, Li CB, Ai ZS, Peng A. N-acetylcysteine for the prevention of contrast-induced nephropathy in patients with pre-existing renal insufficiency or diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ren Fail*. 2015;37:297–303.
181. Albabtain MA, Almasood A, Alshurafah H, Alamri H, Tamim H. Efficacy of ascorbic acid, N-acetylcysteine, or combination of both on top of saline hydration versus saline hydration alone on prevention of contrast-induced nephropathy: a prospective randomized study. *J Interv Cardiol*. 2013;26:90–96.
182. Gurm HS, Smith DE, Berwanger O, Share D, Schreiber T, Moscucci M, Nallamothu BK; BMC2 . Contemporary use and effectiveness of N-acetylcysteine in preventing contrast-induced nephropathy among patients undergoing percutaneous coronary intervention. *JACC Cardiovasc Interv*. 2012;5:98–104.
183. Aslanger E, Uslu B, Akdeniz C, Polat N, Cizgici Y, Oflaz H. Intrarenal application of N-acetylcysteine for the prevention of contrast medium-induced nephropathy in primary angioplasty. *Coron Artery Dis*. 2012;23:265–270.

184. Durham JD, Caputo C, Dokko J, Zaharakis T, Pahlavan M, Keltz J, Dutka P, Marzo K, Maesaka JK, Fishbane S. A randomized controlled trial of *N*-acetylcysteine to prevent contrast nephropathy in cardiac angiography. *Kidney Int.* 2002;62:2202–2207.
185. Habib M, Hillis A, Hammad A. *N*-acetylcysteine and/or ascorbic acid versus placebo to prevent contrast-induced nephropathy in patients undergoing elective cardiac catheterization: the napcin trial; a single-center, prospective, randomized trial. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2016;27:55–61.
186. Zagler A, Azadpour M, Mercado C, Hennekens CH. *N*-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Am Heart J.* 2006;151:140–145.
187. Townsend, D.M., Tew, K.D., and Ta piero, H. (2003) The importance of glutathione in human disease, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 145–155.
188. Grek, C.L., Zhang, J., Manevich, Y., Danyelle, M. Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2013) Causes and Consequences of Cysteine S-Glutathionylation, *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 26497–26504.
189. Board, P.G., and Menon, D. (2013) Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3267–3288.
190. Allen, E.M., and Mieyal, J.J. (2012) Protein-Thiol Oxidation and Cell Death: Regulatory Role of Glutaredoxins, *Antioxidants & Redox Signaling*, 17, 1748–1763.
191. Lillig, C.H., and Berndt, C. (2013) Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange, *Antioxidants & Redox Signaling*, 18, 1654–65.
192. Green, R. M., Graham, M., O'Dono van, M. R., Chipman, J. K., and Hodges, N. J. (2006) Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity, *Mutagenesis*, 21, 383–390.
193. Massy Z.A., Nguyen-Knoa T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J Nephrol* 2002; 15: 336—341.
194. Zwolinska D. Oxidative stress in children on peritoneal dialysis. *Perit Dial* 2009; 29: 2: 171—177.
195. Manucha W., Valles P.G. Apoptosis modulated by oxidative stress and inflammation during obstructive nephropathy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012; 11: 4: 303—312.
196. Vaziri N.D., Dicus M., Ho N.D. et al. Oxidative stress and dys-regulation of superoxide dismutase a NADPH dismutase in renal insufficiency. *Kidney Int* 2003; 63: 179—185.
197. Luna-Sanchez, M., Hidalgo-Gutierrez, A., Hildebrandt, T.M., Chaves-Serrano, J., Barriocanal-Casado, E., Santos-Fandila, A., Romero, M., Sayed, R.K., Duarte, J., Prokisch, H. et al. (2017) CoQ deficiency causes disruption of mitochondrial sulfide oxidation, a new pathomechanism associated with this syndrome. *EMBO Mol Med*, 9, 78-95.
198. Bader B, Berger E, Rossmann S, Risler T, Erley C. Prevention of contrast media-induced acute renal failure in patients with severe impaired renal function—theophylline versus *N*-acetylcysteine. Abstract. Paper presented at the Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, PA; November 2, 2002.

199. Allaqaband S, Tumuluri R, Malik AM, Gupta A., Volkert P., Shalev Y., Bajwa T. K. Prospective randomized study of N-acetylcysteine, fenoldopam, and saline for prevention of radiocontrast-induced nephropathy. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2002;57:279–83.
200. Kasielski M, Nowak D. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2001;95:448–456.
201. Zagler A, Azadpour M, Mercado C, Hennekens CH. N-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Am Heart J.* 2006;151:140–145.
202. Stey C, Steurer J, Bachmann S, Medici TC, Tramer MR. The effect of oral N-acetylcysteine in chronic bronchitis: a quantitative systematic review [In Process Citation]. *Eur Respir J.* 2000;16:253–262.
203. Grandjean EM, Berthet P, Ruffmann R, Leuenberger P. Efficacy of oral long-term N-acetylcysteine in chronic bronchopulmonary disease: a meta-analysis of published double-blind, placebo-controlled clinical trials. *Clin Ther.* 2000;22:209–221.
204. Kay J, Chow WH, Chan TM, Lo SK, Kwok OH, Yip A, Fan K, Lee CH, Lam WF. Acetylcysteine for prevention of acute deterioration of renal function following elective coronary angiography and intervention a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;289:553–8.
205. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:6–20.
206. Liu R, Nair D, Ix J, Moore DH, Bent S. N-acetylcysteine for the prevention of contrast-induced nephropathy. A systematic review and meta-analysis. *J Gen Intern Med.* 2005;20:193–200.
207. Passos J.F., Von Zglinicki T. Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? // *Free Radic. Res.* – 2006. – Vol. 40, № 12. – P.1277-1283.
208. Lu T., Finkel T. Free radicals and senescence // *Exp. Cell Res.* – 2008. – Vol. 314, № 9. – P.1918-1922.
209. Nakai, D., Yuasa, S., Takahashi, M., Shimizu, T., Asaumi, S., Isono, K., Takao, T., Suzuki, Y., Kuroyanagi, H., Hirokawa, K., et al. (2001). Mouse homologue of *coq7/clk-1*, longevity gene in *Caenorhabditis elegans*, is essential for coenzyme Q synthesis, maintenance of mitochondrial integrity, and neurogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 289, 463-471.
210. Levavasseur, F., Miyadera, H., Sirois, J., Tremblay, M.L., Kita, K., Shoubridge, E., and Hekimi, S. (2001). Ubiquinone is necessary for mouse embryonic development but is not essential for mitochondrial respiration. *The Journal of biological chemistry* 276, 46160-46164.
211. Padilla, S., Jonassen, T., Jimenez-Hidalgo, M.A., Fernandez-Ayala, D.J., Lopez-Lluch, G., Marbois, B., Navas, P., Clarke, C.F., and Santos-Ocana, C. (2004). Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *J Biol Chem* 279, 25995-26004.

ҚОСЫМША А

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

КЕЛІСІЛДІ

Ғылыми - инновациялық қызмет жөніндегі проректор
 Рамазанов Т.С.
 «_____» _____ 2019 ж.

БЕКТЕМІН

Оқу ісі жөніндегі проректор,
 комиссия төрағасы
 Хикметов А.К.
 «_____» _____ 2019 ж.

Аяқталған ғылыми-зерттеу жұмысын (кезеңін) оқу процесіне енгізу туралы АКТ

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің комиссия құрамы: төрағасы: Хикметов Аскар Қусубекович - оқу ісі жөніндегі проректор, мүшелері: академиялық мәселелер жөніндегі департамент директоры Мухамеджанова Тапсулу Мирасбековна, ғылыми және инновациялық қызмет жөніндегі департамент директоры Мухамбетжанов Серик Қожасарович, әдістемелік жұмыс қызметінің басшысы Жакупова Гульванна Толгаевна, биология және биотехнология факультетінің деканы Зәдиян Болатхан Қазыханович, биология және биотехнология факультетінің әдістемелік бөлімшесінің төрайымы Құлбаева Маржан Суларовна, биофизика және биомедицина кафедрасының меңгерушісі Тулеуханов Султан Тулеуханович осы акт 2019/2020 оқу жылында биофизика, және биомедицина кафедрасында профессор, б.ғ.д. Мурзахметова М.К. сабағына 3-ші курс докторанты Үсіпбек Б.А. «Митохондрия метаболизмінің өзгерісіндегі тотығу стрессінің өзгерісі» тақырыбындағы ғылыми-зерттеу жұмыстарының нәтижелері енгізілді.

№ п/п	Енгізу түрі (жаңа курс, арнайы курс, дәріс бөлімінің атауы, зерттеу жұмыстары, енгізулер, оқу құралдары және т. б.); курс, мамадық	Енгізу көлемі (жұмыс, дәрістік сағат саны)	Енгізілген жұмыстың қысқаша мазмұны
1	«Митохондрия метаболизмін өзгерісіндегі тотығу стрессінің өзгерісі» ҒЗЖ нәтижелері 7M05105 "Биофизика" мамандығы бойынша 1-курс магистранттарының "Тотығу стрессінің механизмдері" курсына (5 кредит) енгізілді.	Дәрістер – 1 сағат. 1. Тотығу стрессінің механизмдері. 2. Тотығу стресс және оның ағзаға әсері. (2 сағат)	Тотығу стрессі нәтижесінде туындайтын митохондрия метаболизмінің дисфункциясы нәтижесінде көптеген митохондриялық аурулардың пайда болуы және оларға терапиялық опцеулерді қолдану бойынша жүргізілген зерттеу жұмысының нәтижелерін, преclinical жағдайда мүмкіндік беретінін түсіндіруге және қолданыс аясын көрсетуге пайдаланылады.
		Зертханалық сабақ – 1 сағат	Тотығу стресс механизмінің

		1.«Топығу стресс механизмінің ролі» (1 сағат)	көрсеткіштерінің нәтижелерін зертханалық сабақта пайдаланылады, зерттеу әдістемесін және статистикалық өңдеу жұмыстарын жүргізуге материалдары қолданылды.
--	--	---	--

Осы актінің материалдары биология және биотехнология факультетінің әдістемелік бюросының отырысында қаралды (Хаттама № 5 25.12 2019 ж.)

Комиссия мүшелері:

Академиялық мәселелер бойынша
департамент директоры



Т.М. Мухитдинова

Ғылым және инновациялық
қызмет департаментінің директоры



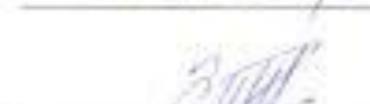
С.К. Мухамбетжанов

Әдістемелік жұмыс қызметінің
басшысы



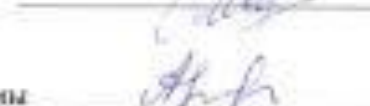
Г.Т. Жакупова

Биология және биотехнология
факультетінің деканы



Б.К. Заядан

Биология және биотехнология
факультетінің методбюро төрайымы



М.С. Кулбаева

Биофизика және биомедицина
кафедрасының меңгерушісі



С.Т. Тұлеуханов