



VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS

GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS

BIOCHEMIJOS IR BIOTECHNOLOGIJŲ KATEDRA

Silvija Bočkutė

**CITRATO SINTAZĖS AKTYVUMĄ SLOPINANČIOS MUTACIJOS
POVEIKIS PELIŲ RAUMENŲ IR KEPENŲ MITOCHONDRIJŲ
FUNKCIJOMS: PRIKLAUSOMYBĖ NUO LYTIES**

Magistro baigiamasis darbas

Biocheminės analizės studijų programa, valstybinis kodas 621C77001
Molekulinės biologijos, biofizikos ir biochemijos studijų kryptis

Vadovas (- ė): doc. dr. Rasa Žūkienė _____
(Parašas) (Data)

Apginta: prof. dr. A. Paulauskas _____
(Fakulteto/studijų instituto dekanas/direktorius) (Parašas) (Data)

Kaunas, 2014

Darbas atliktas: 2012 – 2014 m. Vytauto Didžiojo universitete, Biochemijos ir biotechnologijų katedroje

Recenzentas: doc. dr. Zita Naučienė

Darbas ginamas: viešame magistrų darbų gynimo komisijos posėdyje 2014 metų gegužės 28 d. Vytauto Didžiojo universitete, Biologijos katedroje, 220 auditorijoje 10 val. Adresas; Vileikos 8, LT-44404, Kaunas

Protokolo Nr.

Darbo vykdytojo pavardė ir parašas: Silvija Bočkutė _____

Mokslinio vadovo pavardė ir parašas: doc. dr. Rasa Žūkienė _____

Katedros, atsakingos už bakalauro darbo parengimą pavadinimas Biochemijos ir biotechnologijų
katedra

Jos vedėjo pavardė ir parašas prof. habil. dr. R. Daugelavičius

TURINYS

Santrauka	5
Summary.....	7
Sutartiniai žymėjimai ir santrumpos.....	9
ĮVADAS.....	11
I. LITERATŪROS APŽVALGA.....	13
1.1. Mitochondrijos ir jų vaidmuo.....	13
1.2. Citrato sintazės vaidmuo mitochondrijose.....	14
1.3. Citrato sintazės reikšmė nutukimo ir 2 tipo cukrinio diabeto gydymui.....	15
1.4. Mutacijos H55N įtaka citrato sintazės aktyvumui.....	17
1.5. Lyčių skirtumai.....	19
1.6. Substratų patekimas į mitochondriją ir jų panaudojimas.....	22
1.7. Riebalų rūgščių oksidacija mitochondrijose.....	23
1.7.1 Riebalų rūgščių pernaša per mitochondrijų membraną.....	23
1.7.2 Riebalų rūgščių β-oksidacija.....	25
1.7.3 Riebalų rūgščių oksidacijos reguliacija mitochondrijose.....	27
1.7.4 Riebalų rūgščių poveikis adenino nukleotidų nešikliui (ANT).....	28
1.8. Citrato sintazės aktyvumas 2 tipo cukrinio diabeto skeleto raumenyse.....	30
II. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	32
2.1. Medžiagos.....	32
2.2. Tiriamosios medžiagos apimtis bei tyrimų pobūdis.....	32
2.3. Kepenų mitochondrijų išskyrimas.....	32
2.4. Raumenų mitochondrijų išskyrimas.....	33
2.5. Mitochondrijų baltymų kiekio nustatymas biureto metodu.....	33
2.6. Mitochondrijų kvėpavimo greičio matavimas.....	36
2.7. Citrato sintazės aktyvumo nustatymas.....	37
2.8. Statistinė duomenų analizė.....	38
III. REZULTATAI.....	39
3.1. Kontrolinių ir kongeninių pelių citrato sintazės aktyvumo palyginimas.....	39
3.2. Skirtingų audinių (kepenų ir raumenų) kontrolinių ir kongeninių patinų ir patelių mitochondrijų kvėpavimo greičių II metabolinėje būsenoje (V_2) palyginimas.....	40
3.3. Kvėpavimo kontrolės indeksas.....	42
3.4. Kontrolinių ir kongeninių patinų kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičių III metabolinėje būsenoje (V_3) palyginimas.....	43
3.5. Kontrolinių ir kongeninių patelių kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičių (V_3) palyginimas.....	44
3.6. Lyties poveikis kontrolinių ir kongeninių pelių kepenų mitochondrijų funkcijoms.....	45
3.7. Kontrolinių ir kongeninių patinų raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičių III metabolinėje būsenoje (V_3) palyginimas.....	47

3.8. Kontrolinių ir kongeninių patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičių III metabolinėje būsenoje (V ₃) palyginimas.....	49
3.9. Lyties poveikis kontrolinių ir kongeninių pelių raumenų mitochondrijų funkcijoms.....	50
IV. IŠVADOS.....	53
V. LITERATŪRA	54
<i>Padėka</i>	64

Santrauka

Baigiamojo darbo autorius:	Silvija Bočkutė
Baigiamojo darbo pavadinimas:	Citrato sintazės aktyvumą slopinančios mutacijos poveikis pelių raumenų ir kepenų mitochondrijų funkcijoms: priklausomybė nuo lyties
Vadovas:	doc. dr. Rasa Žūkiene
Pristatyta:	Vytauto Didžiojo universiteto Gamtos mokslų fakultete, Kaunas, 2014 05 28
Puslapių skaičius:	62
Lentelių skaičius:	12
Paveikslų skaičius:	21
Priedų skaičius:	-
Literatūros nuorodų skaičius:	131

Tyrimai rodo, kad nutukimas ir cukrinis diabetas dažnai yra susiję su prasta mitochondrijų veikla. Citrato sintazė (CS) yra vienas iš pagrindinių mitochondrijų fermentų, reguliuojantis energijos gamybą medžiagų apykaitos metu. Citratas veikia kaip alosterinis acetil-KoA karboksilazės aktyviklis, kuris yra ypač svarbus riebalų metabolizmui kepenų ir raumenų ląstelėse. Taigi sulėtėjusi citrato sintezė gali skatinti riebalų rūgščių sunaudojimą ir oksidaciją mitochondrijose. Todėl iškėlėme hipotezę, kad CS slopinimas gali turėti teigiamą poveikį riebalų metabolizmui. Tyrimams buvo naudojamos izoliuotos mitochondrijos iš laukinio tipo (kontrolinių) B6 linijos pelių ir iš kongeninių pelių, turinčių A/J pelių linijai būdingą mutaciją - B6.A-(rs3676616-D10Utsw1)/KjnB6), kuri pasireiškia CS aktyvumo sumažėjimu.

Šiame darbe siekta įvertinti citrato sintazės slopinančios mutacijos poveikio izoliuotų pelių raumenų ir kepenų mitochondrijų funkcijoms priklausomybę nuo gyvūno lyties. Šiam tikslui pasiekti buvo vertinami kontrolinių ir kongeninių pelių raumenų ir kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai antroje ir trečioje metabolinėse būsenose (V_2 ir V_3), joms oksiduojant skirtingus substratus: piruvatą + malatą (5 mM + 5 mM), glutamatą + malatą (5 mM + 5 mM), palmitoilkarnitiną + malatą (0,05mM + 0,25 mM), sukcinatą + rotenoną(5 mM + 1 μ M) taip pat vertintas poveikis adenino nukleotidų nešikliui – substratai – glutamatas + malatas + palmitoilkarnitinas (5 mM + 5 mM + 0,05 mM), piruvatas + malatas + palmitoilkarnitinas (5 mM + 5 mM + 0,05mM), termostatu palaikant 37 °C matavimo terpės temperatūrą. Kongeninių pelių citrato sintazės (CS) aktyvumas buvo 35% mažesnis patinų ir 25% patelių mitochondrijose lyginant su kontrole. Kontrolinių patinų raumenų mitochondrijų V_3 yra didesni nei patelių, II komplekso

aktyvumas bei β -oksidacija yra apie 50 % didesni nei patelių, o kongeninių patelių raumenų mitochondrijų V_3 yra didesni nei kontrolinių, kas, manoma, gali lemti mažesnę patelių ir kongeninių patelių polinkį į nutukimą. Kongeninių patelių raumenų mitochondrijų funkcijų lyčių skirtumai yra mažesni, nei kontrolinių. Kepenų mitochondrijų funkcijų lyčių skirtumai pasireiškė didesniu kontrolinių patelių kepenų II komplekso aktyvumu ir kongeninių patelių piruvato oksidacija ir β -oksidacija. Mutacija sukėlė II komplekso aktyvumo sumažėjimą patelių ir padidėjimą patelių mitochondrijose (V_3 tapo vienodi) bei β -oksidacijos padidėjimą patelių mitochondrijose. **Kepenų** mitochondrijose nebuvo pastebėtas žymus palmitoilkarnitino slopinantis poveikis ANT, o mitochondrijoms oksiduojant piruvatą, palmitoilkarnitinas netgi padidino V_3 . Palmitoilkarnitino slopinantis poveikis ANT buvo žymesnis **raumenų** mitochondrijose, visose tyrimo grupėse, slopinantis poveikis ANT buvo tiek kongeninėse patelėse tiek kongeniniuose patiniuose.

Summary

Author of master thesis:	Silvija Bočkutė
Full title of master thesis:	The effect of citrate synthase-inhibiting mutation on murine liver and muscle mitochondria functions: the gender dependence
Master thesis supervisor:	doc. dr. Rasa Žūkienė
Presented in:	Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, Kaunas, 2014, May 28 d.
Number of pages:	62
Number of tables:	12
Number of pictures:	21
Number of appendices:	-
Number of references:	131

The results of numerous investigations show that obesity and diabetes are often associated with poor mitochondrial performance. Citrate synthase (CS) is one of the key mitochondrial enzyme that regulates the production of energy metabolism. Citrate acts as an allosteric acetyl - CoA carboxylase activator, which is particularly important in the metabolism of fatty liver and muscle cells. Reduction in citrate synthesis may promote fatty acid oxidation in mitochondria. Therefore, we have hypothesized that inhibition of CS may have a positive effect on the metabolism of fat and should be checked for the possibility of the fight against obesity and type 2 diabetes. The experiments were conducted on isolated mitochondria from wild-type (control) mice and B6 lines of congenic mice with A / J -specific mutation - B6.a -(rs3676616 - D10Utsw1) / KjnB6 .

This study aimed to evaluate the effects of citrate synthase inhibition by mutation on isolated mouse skeletal muscle and liver mitochondrial functions and its gender dependence. To achieve this task, respiratory rates in metabolic state 2 and 3 (V_2 and V_3) were evaluated in control and congenic mouse muscle and liver mitochondria oxidizing different substrates: pyruvate + malate (5 mM + 5 mM), glutamate + malate (5 mM + 5 mM), palmitoylcarnitine + malate (0.05 mM + 0.25 mM), succinate + rotenone (5 mM + 1 μ M). The inhibitory effect of fatty acids on adenine nucleotide transporter was measured with glutamate + malate + palmitoylcarnitine (5 mM + 5 mM + 0.05 mM), pyruvate + malate + palmitoylcarnitine (5 mM + 5 mM + 0.05 mM) at 37°C. Congenic mice citrate synthase (CS) activity was 35 % lower in males and 25 % females in the mitochondria compared with controls. Control of male muscle mitochondrial V_3 are larger than females, complex II activity and β -oxidation is about 50 % larger than females, and females

kongenetic muscle mitochondrial V_3 is higher than the control, which is expected to lead to a reduced male and congenic mice predisposed to obesity. Congenic mice muscle mitochondrial function gender differences are smaller than the control group. Hepatic mitochondrial function gender differences were greater in male control liver complex II activity and pyruvate oxidation congenic females and β -oxidation. The mutation caused a decrease in activity of complex II in males and in females in the mitochondria (V_3 become identical), and β -oxidation in the mitochondria in females. Liver mitochondria not observed significant inhibitory effects on the palmitoylcarnitine and mitochondrial oxidation of pyruvate, palmitoylcarnitine even increased V_3 . Palmitoylcarnitine inhibitory effects on the muscle mitochondria was more significant in all study groups, inhibitory effects on the both the congenic females and congenic males.

Sutartiniai žymėjimai ir santrumpos

- $\Delta\psi$ – membranos potencialas
- ACC – acetil-KoA karboksilazė
- ACL – ATP citrato liazė
- ADP – adenozino difosfatas
- AMPK – 5' adenosino monofosfato aktyvuota baltymų kinazė
- ANT – adenino nukleotidų nešiklis (angl. *adenine nucleotide translocator*)
- ATP – adenozino trifosfatas
- BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*)
- CPT I – karnitino palmitoiltransferazė I
- CPT II – karnitino palmitoiltransferazė II
- CS – citrato sintazė
- DOX – natrio deoksicholatas
- DTNB – 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoinė rūgštis
- EDTA – etilendiamino tetraacto rūgštis
- EGTA – etilenglikolio tetraacto rūgštis
- FAD – flavinadenindinukleotidas (oksiduotas)
- FADH₂ – flavinadenindinukleotidas (redukuotas)
- FAS – riebalų rūgščių sintezė
- FFA – laisvos riebalų rūgštys (angl. *Free fatty acids*)
- G/M – glutamatas + malatas
- GM/PC – glutamatas + malatas + palmitoilkarnitinas
- GTP – guanozin-5'-trifosfatas
- HFD – daug riebalų turinti dieta (angl. *high fat diet*)
- HK – heksokinazės
- HT – kepenų, raumenų mitochondrijų homogenizavimo terpė
- IT – kepenų ir raumenų mitochondrijų inkubavimo terpė
- KoA – kofermentas A (angl. *CoA*)
- M/PC – malatas + palmitoilkarnitinas
- NAD⁺ – nikotinamido adenino dinukleotidas (oksiduota forma)
- NADH – nikotinamido adenino dinukleotidas (redukuota forma)
- NAD(P)H – bendras redukuotų piridino nukleotidų NADH ir NADPH formų žymėjimas
- PDH – piruvato dehidrogenazė
- PMF – protonovaros jėga (angl. *proton motive force*)

P/M – piruvatas + malatas

PM/PC – piruvatas + malatas + palmitoilkarnitinas

RCR – kvėpavimo kontrolės rodiklis (angl. *respiratory control ratio*)

Ro – rotenonas

ROS – reaktyviosios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*)

ST – kepenų mitochondrijų suspendavimo terpė

Succ+Ro – sukcinatas + rotenonas

T2D – 2 tipo cukrinis diabetas

TAG – trigliceridai (angl. *Triacylglyceride*)

Tris – tri-(hidroksimetil) amino metanas

V₂ – mitochondrijų kvėpavimo greitis antroje metabolinėje būsenoje

V₃ – mitochondrijų kvėpavimo greitis trečioje metabolinėje būsenoje

VLDL – labai mažo tankio lipoproteinai (angl. *very-low-density lipoprotein*)

IVADAS

Citrato sintazė (CS) yra vienas iš pagrindinių fermentų, reguliuojančių energijos gamybą (ATP sintezę) medžiagų apykaitos metu. Anksčiau citrato sintazės aktyvumas arba jo kiekis buvo laikomas stabilium parametru, todėl fermentas buvo dažnai naudojamas kaip mitochondrijų kiekio žymuo. Tačiau, vystymosi ar senėjimo procesų tyrimai parodė, kad citrato sintazė ne visada gali būti vertinama kaip stabilus žymuo (Marin-Garcia ir kt., 1998; Drahotová ir kt., 2004).

Šiame darbe tirtos kongeninės pelės (K_jn/B6) pasižymi A/J linijos pelėms būdingu požymiu, kuris gali būti priskiriamas „missense“ (antiprasminėms) mutacijoms: CS 3 egzone yra H55N pakeitimas (C nukleotido pakeitimas į A, rs29358506), kuris pasireiškia CS aktyvumo sumažėjimu. Iš tiesų, yra įrodymų, leidžiančių manyti, kad mažas CS aktyvumas gali būti susijęs su mažesne nutukimo tikimybe: A/J linijos pelės pasižymi mažesniu svorio padidėjimu, kai yra šeriamos pašaru, turinčiu daug riebalų (HFD, angl. *high fat diet*), priešingai nei B6 veislės pelės, kurios linkusios į nutukimą (Leibowitz ir kt. 2005 Kus et al. 2008). Iškelta hipotezė, kad mitochondrijų citrato sintazės (CS) slopinimas skatina riebalų rūgščių oksidaciją raumenų ląstelėse (Skurvydas ir kt., 2011) bei CS slopinimas galėtų būti naudojamas kaip viena iš strategijų kovojant su nutukimu ir 2 tipo cukriniu diabetu (Venckunas, 2012).

Esant per daug aktyviai citrato sintazės veiklai yra pagaminamas citrato perteklius, kuris yra išnešamas iš mitochondrijų į ląstelės citozolį. Ląstelės citozolyje susikaupus per daug citrato ir riebalų acil-KoA veikiant acetil-CoA karboksilazei (ACC) yra pagaminama malonil-KoA. Šis kofermentas yra pagrindinis karnitino palmitoiltransferazės I (CPT I) ir β-oksidacijos reguliatorius. Per didelę malonil-KoA koncentraciją slopina CPT I veiklą. Nuslopinus šį fermentą, riebalų rūgštys nebegali patekti į mitochondrijų vidų ir ten būti panaudojamos β-oksidacijos metu. Riebalų rūgščių β-oksidacija yra procesas, kurio metu yra skaidomos ilgos acil-KoA grandinės molekulės į acetil-KoA molekules. β-oksidacijos metu susidariusios acetil-KoA molekulės toliau dalyvauja trikarboksirūgščių ciklo reakcijose. Nepanaudotos riebalų rūgštys yra kaupiamos trigliceridų pavidalu adipocituose. Yra manoma, kad ilgos grandinės riebalų acil-KoA esteriai yra potencialūs adenino nukleotidų nešiklio (ANT, angl. *adenine nucleotide transporter*) slopikliai. Adenino nukleotidų nešiklis yra vidinės mitochondrijų membranos baltymas, kuris padeda vykdyti mitochondrijose pagaminto ATP ir citozolinio ADP mainus.

Tyrimai rodo, kad nutukimas ir cukrinis diabetas dažnai yra susiję su prasta mitochondrijų veikla (Houmard, 2008). Pusiausvyra tarp riebalų rūgščių β-oksidacijos ir substratų kaitos Krebso cikle yra ypač svarbi optimaliai mitochondrijų veiklai, esant nutukimui ir cukriniam diabetui. Yra įrodymų, kad citratas, mitochondrijų Krebso ciklo tarpinis junginys, vaidina svarbų vaidmenį kontroliuojant šią pusiausvyrą. Remiantis Randle gliukozės ir riebalų rūgščių ciklo hipoteze, citratas

dalyvauja glikolizės reguliavime. Citrato kaupimasis slopina fosfofruktokinazę ir padidina viduląstelinę gliukozės-6-fosfato koncentraciją, dėl to glikogeno sintezės aktyvacija slopina heksokinazę II, ląstelėje padidėjęs gliukozės kiekis mažina gliukozės įsisavinimą. Randle sukurtas modelis yra paremtas atvirkštiniais ryšiais tarp riebalų rūgščių ir gliukozės katabolizmo. Padidėjęs laisvųjų riebalų rūgščių panaudojimas slopina gliukozės naudojimą per pagrindinių fermentų, dalyvaujančių gliukozės metabolizme, slopinimą (Gonzalez-Franquesa ir kt., 2012).

Darbo naujumas ir reikšmingumas.

Žinoma, kad citrato sintazė (CS) yra vienas iš pagrindinių fermentų, reguliuojančių ATP sintezę. Manoma, kad mitochondrijų citrato sintazės (CS) slopinimas skatina riebalų rūgščių oksidaciją raumenų ląstelėse (Skurvydas ir kt., 2011). Aktyvesnės riebalų rūgščių oksidacijos dėka mažėja riebalų rūgščių kaupimasis organizme ir mažina nutukimo tikimybę. Tokio tipo tyrimai su pelėse atlikta H55N mutacija yra pirmieji, todėl norima išsiaiškinti CS slopinimo įtaką mitochondrijų funkcijoms ir kaip pakitusios mitochondrijų funkcijos veikia visą organizmą.

Tikslas:

Įvertinti pelių skeleto raumenų ir kepenų izoliuotų mitochondrijų funkcijų priklausomybę nuo lyties, esant citrato sintazės (CS) aktyvumą slopinančiai mutacijai.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti CS aktyvumo sumažėjimą kongeninių pelių patinų ir patelių mitochondrijose;
2. Įvertinti izoliuotų pelių mitochondrijų kvėpavimo greičių, mitochondrijoms oksiduojant skirtingus substratus, priklausomybę nuo:
 - a) lyties,
 - b) mitochondrijų kilmės audinio (kepenų ir raumenų),
 - c) citrato sintazės aktyvumą slopinančios mutacijos.
3. Įvertinti palmitoilkarnitino poveikio adenino nukleotidų nešikliui (ANT) kontrolinių ir kongeninių pelių kepenų ir raumenų mitochondrijose priklausomybę nuo lyties.

I. LITERATŪROS APŽVALGA

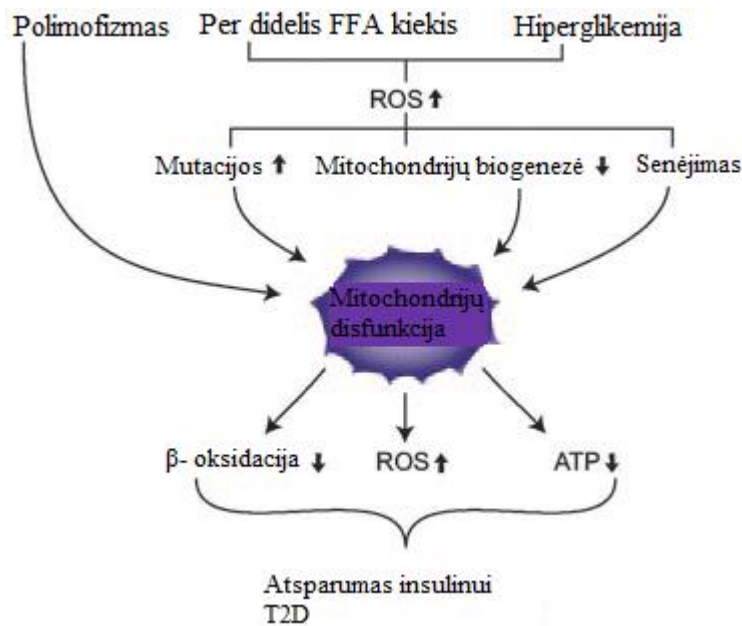
1.1. Mitochondrijos ir jų vaidmuo

Mitochondrija yra dvigubą membraną turinti organelė, kuri svarbi daugelyje ląstelės procesų: energijos metabolizme, pradiniuose amino rūgščių sintezės etapuose, ląstelės jonų (tarp jų ir Ca^{2+}) homeostazėje, ROS gamyboje ir apoptozėje (Goldenthal ir Marín-García, 2004). Energijos, atsipalaiduojančios įvairių substratų oksidacinio fosforilinimo proceso metu transformacija į ATP yra viena iš pagrindinių šių organelių funkcijų (Žūkienė, 2008). Mitochondrija yra vienintelė žinduolių organelė, be branduolio, turinti savo DNR (mtDNR), kuri koduoja 37 genus, įskaitant 13 elektronų transporto grandinės subvienetų (Gonzalez-Franquesa ir kt., 2012).

Eukariotinių ląstelių energijos gamyba, daugiausia ATP pavidalu, valdoma mitochondrijų, kuriose stebimas ryšys tarp oksidacinio fosforilinimo ir maistinių medžiagų metabolizmo. ATP gamyba reikalauja dviejų pagrindinių vyksmų - NADH (arba FADH_2) oksidacijos ir ADP fosforilinimo (sutrumpintai OXPHOS). Mitochondrijose šios reakcijos yra viena su kita susijusios. Oksidacinis fosforilinimas yra efektyvus ir energiją tausojantis būdas gaminti energiją aerobiniuose organizmuose. NADH arba FADH_2 susidaro gliukozės metabolizmo metu per glikolizės ir trikarboksirūgščių ciklą arba riebalų rūgščių β -oksidaciją (Kim ir kt., 2008).

Kelley ir kt. nustatė, kad sergant cukriniu diabetu sutrinka skeleto raumenų mitochondrijų funkcijos (Kelley ir kt., 2002). Yra įrodymų, kad nutukimas ir 2 tipo cukrinis diabetas yra susiję su mitochondrijų sutrikimais (Stump ir kt., 2003; Petersen ir kt., 2003). Per didelis maistinių medžiagų suvartojamas, įskaitant ir per didelį FFA kiekį ar hiperglikemiją didina ROS gamybą ir mažina mitochondrijų biogenezę, visa tai sukelia mitochondrijų funkcijų sutrikimą - sumažėjusią β -oksidaciją, ATP gamybą bei padidėjusią ROS gamybą (Kim ir kt., 2008) (1pav.).

Antioksidantai apsaugo nuo mitochondrijų funkcijos sutrikimo ir atsparumo insulinui, neutralizuoja laisvuosius radikalus. Tačiau lipidų kaupimasis organizme ir ROS perteklius toliau skatina serino/treonino kinazes ir uždegiminius signalinius kelius, kurie slopina insulino poveikį. Nors buvo nustatytos kelios serino/treonino kinazės, kurios yra atsakingos už atsparumą insulinui, tačiau tikslūs molekuliniai kinazių aktyvinimo mechanizmai, veikiant ROS nėra išaiškinti (Kim ir kt., 2008).



1 pav. Mitochondrijų funkcijos sutrikimo mechanizmas (Kim ir kt., 2008).

Sumažėjęs mitochondrijų kiekis gali būti atsparumo insulinui išsivystymo priežastimi. Pacientams, sergantiems 2 tipo cukriniu diabetu, buvo sumažėjęs mitochondrijų elektronų transporto grandinės aktyvumas, vertintas pagal NADH:O₂ oksidoreduktazės veiklą, ir sumažėjęs citrato sintazės aktyvumas (Schrauwen ir Hesselink, 2004). Mitochondrijų biogenezės ir oksidacinio fosforilavimo raiškos reguliavimo mechanizmų genetinis susietumas su energijos būsena nėra visiškai apibrėžtas ir reikalauja detalesnių tyrimų.

1.2. Citrato sintazės vaidmuo mitochondrijose

Citrato sintazė (CS) yra pagrindinis fermentas trikarboksirūgščių cikle, reguliuojantis energijos gamybą medžiagų apykaitos metu ir dažnai naudojamas kaip mitochondrijų turinio markeris (Rabøl ir kt., 2006; Dalziel ir kt., 2005; Holloszy ir Booth, 1976).

CS trikarboksirūgščių cikle katalizuoja reakciją, kurios metu iš oksaloacetato ir acetil-Ko-A susidaro citratas (Christe ir kt., 2013) (9 pav.). Citrato sintazė buvo plačiai naudojama kaip medžiagų apykaitos žymuo norint įvertinti oksidacinius ir kvėpavimo pajėgumus (Spina ir kt., 1996). Anksčiau citrato sintazės aktyvumas ar kiekis buvo laikomas stabiliu mitochondrijų požymiu, todėl fermentas buvo dažnai naudojamas kaip mitochondrijų žymuo. Tačiau, vystymosi ir senėjimo tyrimai parodė, kad citrato sintazė ne visada gali būti vertinama kaip stabilus žymuo (Marin-Garcia ir kt., 1998; Drahotová ir kt., 2004). Be to, buvo nustatyta, kad citrato sintazės aktyvumas gali būti dinamiškas, gali būti koreguojamas, pavyzdžiui, fizinio krūvio metu (Vieira ir

Valentine, 2009). Jau daugiau nei prieš 30 metų, Holloszy ir jo kolegos (Holloszy ir kt., 1970) nustatė, kad ištvermės treniruotės padidina oksidacinę fermentų veiklą skeleto raumenyse.

Buvo nustatyta citrato sintazės aktyvumo priklausomybė nuo amžiaus, lyties, taip pat pastebėta stipri koreliacija tarp sumažėjusio fermento aktyvumo ir nutukimo. Senstant nustatytas CS aktyvumo sumažėjimas, tačiau tarp lyčių didelio skirtumo nepastebėta. Aktyvumai buvo matuojami izoliuotuose limfocituose (Čapková ir kt., 2002).

Citrato sintazės reguliavimas ląstelės arba subląstelinėse sistemose, manoma, turi fiziologinę reikšmę dėl įvairių priežasčių. Šio fermento reguliavimas galėtų kontroliuoti ląstelinio citrato lygį, medžiagų apykaitos tarpinius junginius, tokius kaip reguliavimo modifikatorius, mažiausiai du citozolio fermentus (Olson ir Williamson, 1971). Acetil-KoA karboksilazė pirmiausia riebalų rūgščių biosintezėje, aktyvuoja citratą (Martin ir Vagelos, 1962), o fosfofruktokinazę, svarbų glikolizės kontrolės fermentą, stipriai slopina (Parmeggiani ir Bowman, 1963; Passonnea ir Lowry, 1963). Citratas taip pat yra laikomas kaip abiejų acetilo grupių šaltiniu ir sumažina ekvivalentų kiekį riebalų rūgščių sintezei citozolyje (Srere, 1965; Watson ir Lowenstein, 1970).

Sumažėjęs CS aktyvumas neturi labai reikšmingo poveikio mitochondrijų ATP gamybai, tačiau gali turėti įtakos ląstelių medžiagų apykaitos reguliavime. Per mitochondrijų membraną citratas gali būti pernešamas priešnaša su malatu ir slopinti ląstelės citoplazmos fosfofruktokinazę-1, taip prisidėdamas prie atsparumo insulinui (Han ir kt., 2009; Ruderman ir kt., 1999). Citozolio citratas taip pat dalyvauja reguliuojant riebalų rūgščių oksidaciją, nes jis gali būti konvertuojamas į acetil-CoA, kuris yra acetil-CoA karboksilazės (ACC) substratas malonil-KoA sintezei (Ruderman ir kt., 1999). Malonil-KoA stipriai slopina karnitino palmitoiltransferazę-1, kuri yra atsakinga už ilgos grandinės riebalų rūgščių transportą į mitochondrijas. Citratas veikia kaip alosterinis ACC aktyviklis, kuris yra ypač svarbus riebalų metabolizmui kepenų ir raumenų ląstelėse (Wakil ir Abu-Elheiga, 2009). Taigi sumažėjusi citrato sintezė gali skatinti riebalų rūgščių sunaudojimą ir oksidaciją mitochondrijose.

1.3. Citrato sintazės reikšmė nutukimo ir 2 tipo cukrinio diabeto gydymui

Genetinė įvairovė yra atsakinga už įvairių medžiagų apykaitos sutrikimus, įskaitant nutukimą ir polinkį susirgti 2 tipo cukriniu diabetu (Muio ir kt., 2007). Tyrimai rodo, kad nutukimas ir cukrinis diabetas dažnai yra susiję su prasta mitochondrijų veikla (Houmard, 2008). Nuolatinė fizinė veikla ir fizinių pratimų darymas gali padidinti raumenų oksidacinį pajėgumą.

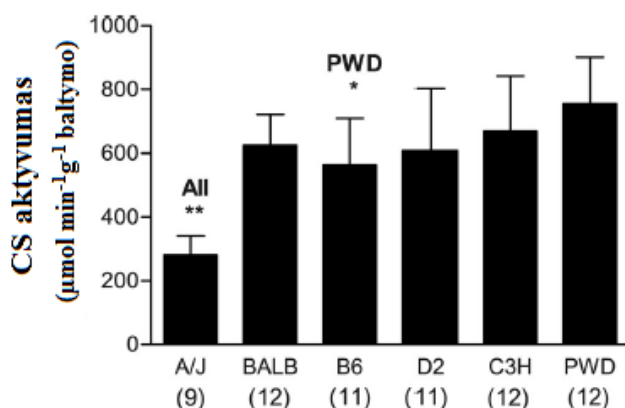
Taip pat yra įrodymų, kad citratas, susidaręs veikiant citrato sintazei vaidina svarbų vaidmenį substrato oksidacijos reguliavime (Ruderman ir kt., 1999). Raumenų mitochondrijų neefektyvumas yra vienas iš rizikos veiksnių išsivystyti nutukimui ir 2 tipo cukriniam diabetui

(Simoneau ir Kelley 1997; Wakil ir Abu-Elheiga 2009). Manoma, kad mažas riebalų rūgščių oksidacijos lygis padidina riebalų kaupimąsi raumenyse, aktyvindamas kelius, trukdančius insulino signalo perdavimui (Kiens, 2006). Ir atvirkščiai, didelis raumenų oksidacinis pajėgumas gali skatinti veiksmingą lipidų oksidaciją ir tokiu būdu galima išvengti atsparumo insulinui (Muoio ir Koves 2007). Skeleto raumenyse žemas riebalų rūgščių oksidacijos (angl. FAO) mitochondrijose rodiklis gali sukelti lipidų koncentracijos padidėjimą ir insulino poveikio mažėjimą (Kiens ir kt., 2006). Tačiau daug riebalų turinti dieta (angl. HFD) pripildo mitochondrijas nepilnai oksiduotomis riebalų rūgštimis (Koves ir kt., 2008, Noland ir kt., 2009). Yra įrodymų, kad citratas, mitochondrijų trikarboksirūgščių ciklo tarpinis junginys, vaidina svarbų vaidmenį kontroliuojant šią pusiausvyrą (Ruderman ir kt., 1999). Citrato sintazė (CS) yra pagrindinis fermentas mitochondrijų trikarboksirūgščių cikle. Tyrimai rodo CS gebėjimą gaminti citratą, viršijančio Krebso ciklo pajėgumus net esant įtemptam raumenų darbui (Blomstrand ir kt., 1997). Citozolinio citrato koncentracija didėja, kai raumenys yra veikiami didelio gliukozės ir insulino kiekio ilgą laiką (Saha ir kt., 1999). Pagal Randle gliukozės ir riebalų rūgščių ciklo hipotezę, citratas dalyvauja glikolizės reguliavime, priešnaša pereidamas su malatu mitochondrijų membraną ir slopindamas citozolio fosfofruktokinazę (Jeukendrup, 2002; Randle ir kt., 1963). Abejonių yra kilę dėl šio ciklo svarbos skeleto raumenyse, tačiau atliktas Han ir jo kolegų (Han ir kt., 2009) tyrimas pateikė gana įtikinamų įrodymų dėl jo vaidmens atsparumo insulinui atsiradimui po riebaus maisto vartojimo. Taip pat svarbu pažymėti, kad yra didelis kiekis duomenų, rodančių, kad citratas taip pat vaidina tam tikrą vaidmenį reguliuojant mitochondrijų riebalų rūgščių įsisavinimą ir oksidaciją (Ruderman ir kt., 1999).

Citratas verčiamas ATP citrato liazės (ACL) į acetil-KoA, substratą acetil-KoA karboksilazei (ACC) malonil-KoA sintezei. Malonil-KoA yra tarpinis junginys riebalų rūgščių sintezėje (FAS) kepenyse (Wang ir kt., 2009), taip pat stiprus ilgos grandinės riebalų rūgščių transporto ir oksidacijos slopiklis skeleto raumenų mitochondrijose (Ruderman ir kt., 1999). Citratas veikia kaip ACC alosterinis aktyviklis, kol nuo AMP priklausomos kinazės (AMPK) fosforilina ir slopina ACC (Richter ir Ruderman, 2009). Padidėjęs malonil-KoA kiekis yra susijęs su atsparumu insulinui raumenų ląstelėse *in vitro* ir skeleto raumenyse *in vivo* (Frøsig ir kt., 2009; Kraegen ir kt., 2006; Patil ir kt., 2007). Todėl iškėlėme hipotezę, kad CS slopinimas gali turėti teigiamą efektą riebalų metabolizmui ir turėtų būti patikrinta taikymo galimybė, kovojant su nutukimu ir 2 tipo diabetu. CS slopinimo modeliu tyrimams buvo naudojamos izoliuotos mitochondrijos iš laukinio tipo (kontrolinių) B6 linijos pelių, ir iš kongeninių pelių, turinčių A/J būdingą mutaciją - B6.A-(rs3676616-D10Utsw1)/KjnB6.

1.4. Mutacijos H55N įtaka citrato sintazės aktyvumui

Ratkevičiaus ir kolegų (2010) tyrimų rezultatai parodė A/J linijos pelių CS aktyvumo sumažėjimą 50–65%, lyginant su kitų linijų pelėmis (2 pav.) ir tai nebuvo susiję su skirtingu linijų pelių judrumu. Šią išvadą dar labiau patvirtina tai, kad CS ir citochromo c baltymų kiekis nebuvo sumažėjęs A/J pelėse, lyginant su kitų pelių linijų (Ratkevičius ir kt., 2010). Šio tyrimo rezultatai rodo, kad H55N polimorfizmas, būdingas A/J linijai, gali būti pagrindė šio reiškinio priežastis.



2 pav. Citrato sintazės (CS) aktyvumo matavimo rezultatai. Mėginiai imti iš keturgalvio raumens, atitinkamai iš A/J, BALB, B6, D2, C3H ir PWD linijų pelių. Vertės nurodytos su SN. *P < 0.05 lyginant B6 su PWD ir D2 lyginant su C3H pelių linijomis, **P < 0.01 lyginant A/J pelių liniją su visomis kitomis pelių linijomis. CS aktyvumas buvo matuojamas spektrofotometriškai (Ratkevičius ir kt., 2010).

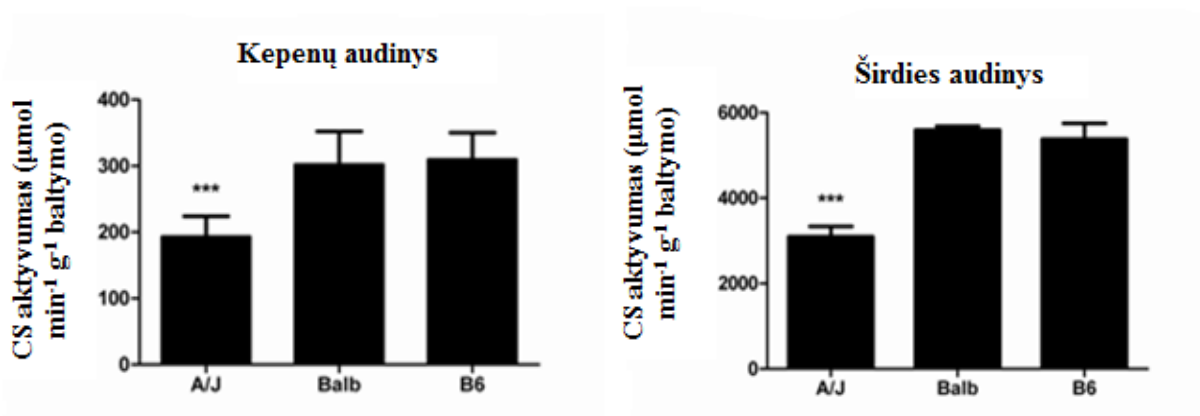
Ryšys tarp mitochondrijų baltymų kiekio ir CS aktyvumo buvo iškreiptas A/J pelėse lyginant su kitų linijų pelėmis. Šis reiškinys paskatino tirti katalazines CS fermento savybes pelėse. Buvo iširta CS kinetika, įvertinant V_0 , esant skirtingoms substrato koncentracijoms. Šie matavimai parodė didesnę A/J CS giminingumą tiek acetyl-KoA tiek ir oksalo acetatui, palyginus su kitomis linijomis, tarp kurių buvo panaši fermentų kinetika. CS gali būti slopinama ATP, KoA, sukcinil-KoA, propionil-KoA ir citratu (Smith ir Williamson, 1971). Fermento aktyvumas buvo matuojamas raumenų homogenatuose ir kai kurių metabolitų koncentracija galėjo šiek tiek skirtis tarp raumenų mėginių, tačiau, kad toks didelis skirtumas CS kinetikoje tarp A/J ir kitų linijų pelių negalėjo kilti iš metabolito koncentracijos variacijos raumenų homogenatuose.

Neseniai nustatyta, kad A/J pelių keturgalvio raumens mažesnis CS aktyvumas nėra susiję nei su sumažėjusio mitochondrijų ar CS baltymo kiekiu (Ratkevičius ir kt., 2010). A/J pelių linijos CS fermentas pasižymėjo mažesniu K_m , lyginant su kitomis pelėmis, tarp kurių yra pastebėti kokybiniai fermentų kinetikos skirtumai. Šis A/J pelių fenomenas gali būti priskiriamas missense mutacijoms CS 3 egzone, t.y. H55N pakeitimas (C nukleotido pakeitimas į A, rs29358506).

1 lentelė. Vieno nukleotido polimorfizmas pelės *Cs* gene A/J, BALB, B6, D2, C3H ir PWD linijose. SNP - vieno nukleotido polimorfizmas (Ratkevičius ir kt., 2010).

Chromosomos vieta Mbp (Build 37)	A/J	Balb	B6	D2	C3H	PWD	dbSNP rs
10:127.787558	A	C	C	C	C	C	rs29358506
10:127.788302	G	G	G	G	G	A	rs36437163

Šis pakeitimas yra unikalus A/J pelėms ir prognozuojama, kad tai turi įtakos baltymų funkcijoms (Ratkevičius ir kt., 2010). Įdomu tai, kad vaistai nuo diabeto, mažinantys kraujyje plazmos lipidų koncentraciją, fenofibratas, fenforminas ir metforminas veikia kaip mitochondrijų metabolizmo slopinkliai, skatinantys riebalų rūgščių oksidaciją per AMPK aktyvinimą (Zheng ir kt., 2000; Cacicedo ir kt., 2011). Iš tiesų, yra įrodymų, leidžiančių manyti, kad mažas CS aktyvumas gali būti susijęs su nutukimu. Chromosomų mutacija, kuri atitinka A/J pelių 10 chromosomos atmainą B6 linijos pelėse taip pat sukelia atsparumą nutukimui (Singer ir kt., 2004). Iškelta hipotezė, kad mitochondrijų citrato sintazės (CS) slopinimas skatina riebalų rūgščių oksidaciją raumenų ląstelėse (Skurvydas ir kt., 2011) bei CS slopinimas galėtų būti naudojama kaip viena iš strategijų kovojant su nutukimu ir 2 tipo cukriniu diabetu (Venckūnas, 2012).

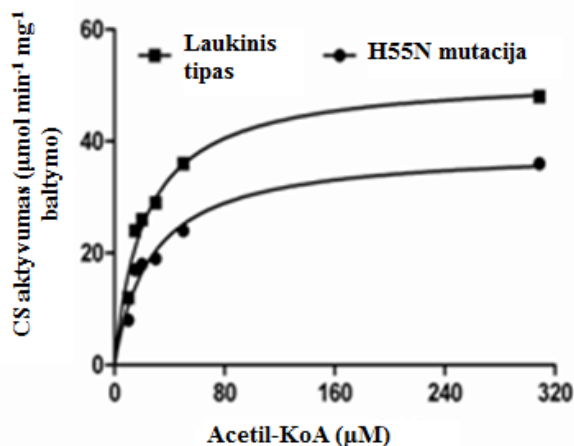


3 pav. Specifinis CS aktyvumas A/J, Balb ir B6 pelių širdies ir kepenų audiniuose (Venckūnas, 2012). Nepublikuoti projekto duomenys.

Gauta papildomų įrodymų, pagrindžiančių hipotezę apie H55N svarbą CS fermento aktyvumui. Pirma, H55N pakeitimo įvedimas B6 pelėse rodo *Cs* geno sąlygojančio konkrečios CS veiklos sumažėjimą. Antra, eksperimento duomenys naudojant keturgalvį raumenį sutapo su kitų audinių duomenimis (Ratkevičius ir kt., 2010), A/J pelių CS veikla buvo sumažėjusi kepenyse bei širdies raumenyje, lyginant su kitų linijų pelėmis (3 pav.). Šie duomenys aiškiai rodo, kad H55N mutacija yra svarbi CS veiklai, nepriklausomai nuo tiriamų audinių. Eksperimentai su raumenų

ląstelėmis gali būti ypač naudingi atskleidžiant išsamius medžiagų apykaitos pokyčius, susijusius su CS slopinimu.

Tyrimo rezultatai atlikti su kongeninėmis pelėmis (B6A/Kjn) parodė mažesnę CS aktyvumą, nei rezultatai su kontrolinėmis pelėmis (B6) (4 pav.) (nepublikuoti projekto duomenys). Kadangi kongeninėse pelėse yra įvesta mutacija, kuri turėtų skatinti riebalų rūgčių β -oksidaciją, o Krebso ciklą, kurio pagrindinis fermentas yra citrato sintazė, slopinti.



4 pav. Mutacijos įtaka citrato sintazės fermento aktyvumui (Venckūnas, 2012). Nepublikuoti projekto duomenys.

A/J pelių būdingas požymis yra atsparumas riebalų ir svorio padidėjimui, kai pelės yra šeriamos daug riebalų turinčia dieta (HFD, angl. *high fat diet*), kuris yra priešingas B6 linijai, kuri yra linkusi į nutukimą (Leibowitz ir kt. 2005; Kus ir kt., 2008 ; Shao ir kt., 2008). Pagrindiniai šių fenotipinių skirtumų mechanizmai yra nežinomi, tačiau keletas tyrimų parodė ryšį su 10 chromosomos sritimi, kur yra Cs genai (Burrage ir kt., 2010; Singer ir kt., 2004). Kongeninių pelių linijos turinčios A/J alelį Cs geno regione taip pat parodė atsparumą nutukimui (Ratkevičius ir kt., 2010).

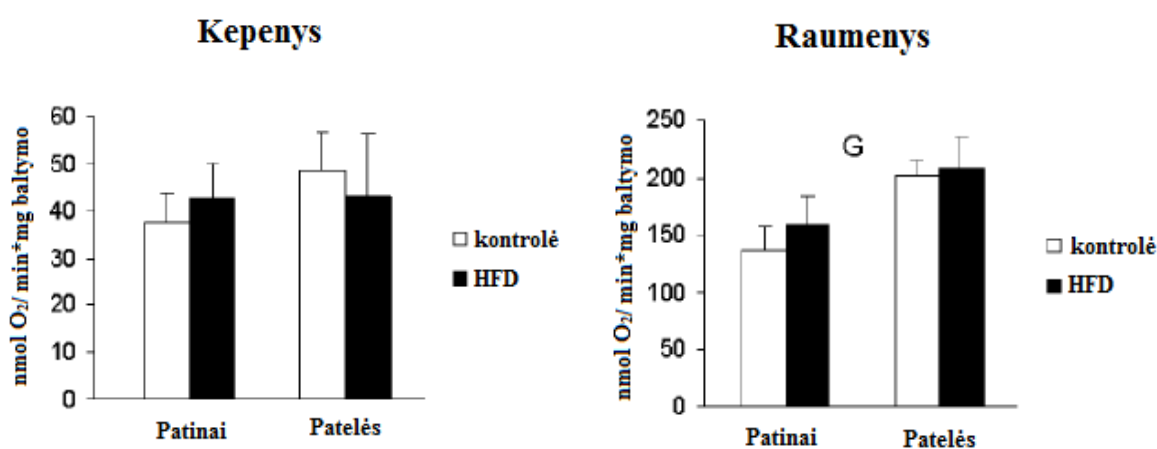
1.5. Lyčių skirtumai

Daugelių žinduolių rūšių moteriškos lyties individai gyvena ilgiau nei vyriškos lyties individai, įskaitant graužikus ir žmones (Wilmoth ir kt., 2000; Lunenfeld, 2002; Vina ir kt., 2005). Pagrindiniai mechanizmai atspindintys lyčių ilgaamžiškumo skirtumus lieka neaiškūs, tačiau ilgaamžiškumas buvo susietas su skirtinga širdies ir kraujagyslių sistemos apsauga, imunine sistema, oksidaciniu stresu senstant ir sergant įvairiomis ligomis (Vina ir kt., 2006; May, 2007).

Žiurkėms, kurioms buvo taikoma daug riebalų turinti dieta sukėlė padidėjusį nutukimą, atsparumą insulinui ir sutrikdė gliukozės metabolizmą (Terauchi ir kt., 2007; Pichon ir kt., 2006). Priešingai nei daug riebalų turinti dieta, daug baltymų turinti dieta angliavandenių sąskaita ne tik

sumažina kūno svorį, bet taip pat sumažina atsparumą insulinui bei pagerina riebalų apykaitą (Blouet ir kt., 2006; Luscombe-Marsh ir kt., 2005). Daug riebalų turinti dieta padidina substrato kiekį β -oksidacijai ir elektronų srautą per mitochondrijų kvėpavimo grandinę, didėjant laisvųjų radikalų gamybai (Català-Niell ir kt., 2008). Català-Niell ir kolegų tyrimai rodo, patelių mitochondrijų kvėpavimo greičiai tiek kontrolinių tiek ir taikant HFD žiurkių yra kur kas didesni nei patinų, taip pat raumens audinyje buvo pastebėti lyčių skirtumai (5 pav.). Tyrimai rodo, kad patelių mitochondrijos gamina žymiai mažiau vandenilio peroksido ir turi efektyvesnę antioksidantų mechanizmą nei patinai, remiantis ankstesniais tyrimų rezultatais alysiams su kepenų (Vina ir kt., 2003) ir širdies raumens audiniais (Colom ir kt., 2007). Buvo įrodyta, kad moterų lytiniai hormonai dalyvauja pradiniame antioksidantinių fermentų reguliavime ir laisvųjų radikalų lygio sumažėjime (Strehlow ir kt., 2003). Aktyvių deguonies formų (ROS) atsiradimo priežastis yra mitochondrijų komponentų oksidacinė žala lipidų peroksidacijos, baltymo modifikacijų ir DNR mutacijos forma (Pamplona ir Barja, 2007). Visa tai sukelia mitochondrijų funkcijų sutrikimą, kuris prisideda prie įvairių žmogaus patologijų tokių kaip neurodegeneracinių, širdies ir kraujagyslių ligų, diabeto (Català-Niell ir kt., 2008).

Taikant HFD trigliceridų kaupimasis žiurkių skeleto raumenyse gali būti atsakas į mitochondrijų oksidacinio mechanizmo sutrikimą, norint kompensuoti padidėjusį riebalų rūgščių srautą per šį audinį (Lionetti ir kt., 2007; Bakker ir kt., 2000). Buvo pasiūlyta, kad raumenų trigliceridų nusodinimas gali būti viena iš svarbiausių priežasčių, dėl ko gali kilti atsparumas insulinui (Stannard ir kt., 2004). Skeleto raumens yra pirminė insulino veikimo vieta ir tai yra siejama su viso kūno atsparumu insulinui (Stannard ir kt., 2004). Taikant HFD žiurkių patinams buvo pastebėta padidėjusi insulino koncentracija plazmoje (Thomas-Moya ir kt., 2007) ir dar daugiau padidėjęs raumenų trigliceridų kaupimasis, palyginti su kontroline grupe.



5 pav. HFD poveikis žiurkių patelių ir patinų kepenų ir raumenų O₂ sunaudojimui mitochondrijose. O₂ sunaudojimas buvo matuotas izoliuotose mitochondrijose naudojant sukcinato ir rotenono substratą. G – lyties (gender) poveikis (Català-Niell ir kt., 2008).

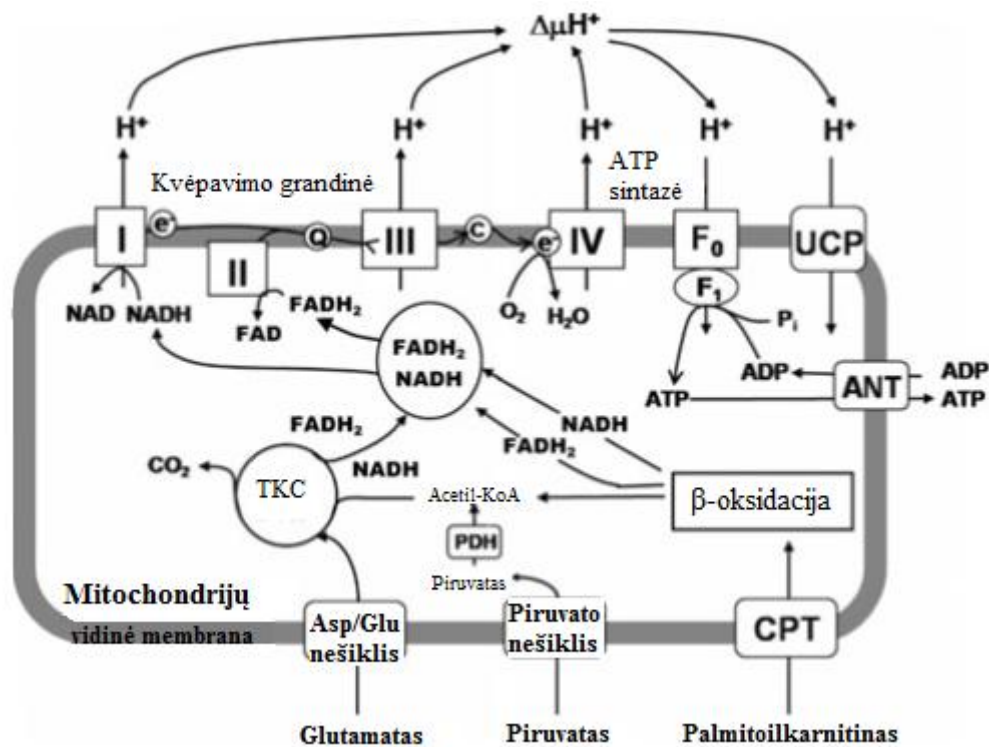
Català-Niell grupės atlikti tyrimai su žiurkėmis parodė, jog patinuose ir patelėse, esant padidėjusiam riebalų kiekiui raumenyse citrato sintazės aktyvumai yra padidėję. Patinų kepenų mitochondrijų fermentų aktyvumai taikant daug riebalų turinčią dietą yra padidėję, o patelių priešingai sumažėję lyginant su kontrole (Català-Niell ir kt., 2008).

2 lentelė. Daug riebalų turinčios dietos (HFD) poveikis žiurkių patinų ir patelių raumenų ir kepenų citochromo c oksidazės ir citrato sintazės aktyvumui. COX – citochromo c oksidazė, CS – citrato sintazė. Fermentų aktyvumai matuoti izoliuotose mitochondrijose (mIU/mg baltymo) (Català-Niell ir kt., 2008).

	Patinai		Patelės	
	Kontrolė	HFD	Kontrolė	HFD
Raumenys				
COX	602±62	676±38	714±88	669±83
CS	421±48	494±62	549±62	579±86
Kepenys				
COX	271±18	272±25	316±49	262±38
CS	25,2±3,3	29,2±6,8	33,4±5,2	30,1±3,2

Keletas tyrimų su žiurkėmis parodė lyčių skirtumus vystantis nutukimui, susijusiu su daug riebalų turinčia dieta. Patinai parodė didesnę atsparumą kūno svorio didėjimui nei patelės (Coatmellec-Taglioni ir kt., 2003; Llado ir kt., 2002). Tačiau patelės atrodo labiau apsaugotos nuo sutrikimų susijusių su nutukimu, pavyzdžiui, hipertenzija ir sacharozės sukeltu atsparumu insulinui (Horton ir kt., 1997), ši apsauga buvo susieta su lytiniu hormonu (Coatmellec-Taglioni ir kt., 2003). Lyčių skirtumai taip pat buvo pastebėti mitochondrijų funkcijų ir oksidacinio streso rodikliuose įvairiuose audiniuose, tokiuose kaip raumenyse (Colom ir kt., 2007; Colom ir kt., 2007), kepenyse (Borras ir kt., 2003; Justo ir kt., 2005; Valle ir kt., 2007) ir rudajame riebaliniame audinyje. Lyties skirtumai oksidaciniame pajėgume, antioksidacinių fermentų veikloje ir vandenilio peroksido gamyboje rodo didesnę apsaugą nuo mitochondrijų oksidacinės žalos žiurkių patelėms (Gómez-Pérez ir kt., 2008).

1.6. Substratų patekimas į mitochondriją ir jų panaudojimas



6 pav. Mitochondrijos metabolizmas. TKA – trikarboksirūgščių ciklas; I,II, III, IV – kvėpavimo grandinės kompleksai; V – ATP sintazė (F₀ – ATP sintazės subvienetas, įsiterpęs į membraną; F₁ - ATP sintazės subvienetas, esantis mitochondrijų viduje); Q – kofermentas Q; c – citochromas c; ANT – adenino nukleotidų nešiklis; CPT – karnitino palmitoiltrasferazė; PDH – piruvato dehidrogenazė; UCP (angl. *uncoupling protein*) – baltymai - skyrikliai (Cole ir kt., 2011).

Glutamas patenka į mitochondrijas aspartato/glutamato nešiklio pagalba ir oksiduojamas į α -ketoglutaratą glutamato dehidrogenazės. Palmitoilkarnitinas yra įnešamas karnitino palmitoiltransferazės (CPT) nešiklio ir oksiduojamas β -oksidacijos, redukuoti FAD ir NAD⁺ oksiduojami į FADH₂ ir NADH, atitinkamai, pasigamina acetil-KoA. Piruvatas patenka per piruvato nešiklį ir oksiduojamas piruvato dehidrogenazės (PDH) redukavus NAD⁺, yra pagaminama acetil-KoA. Acetil-KoA patenka į trikarboksirūgšties (TKC) ciklą, kurio metu pagaminami NADH ir FADH₂, kurie oksiduojami elektronų transporto grandinės I ir II kompleksų, kurių sudaro keturi kompleksai. Elektronai yra perduodami per grandinę iki galutinio akceptoriaus, O₂. Pasigaminusi ATP yra priešprieša ADP išnešama iš mitochondrijos. Šiuos mainus vykdo adenino nukleotidų nešiklis (ANT) (6 pav.) (Cole ir kt., 2011).

1.7. Riebalų rūgščių oksidacija mitochondrijose

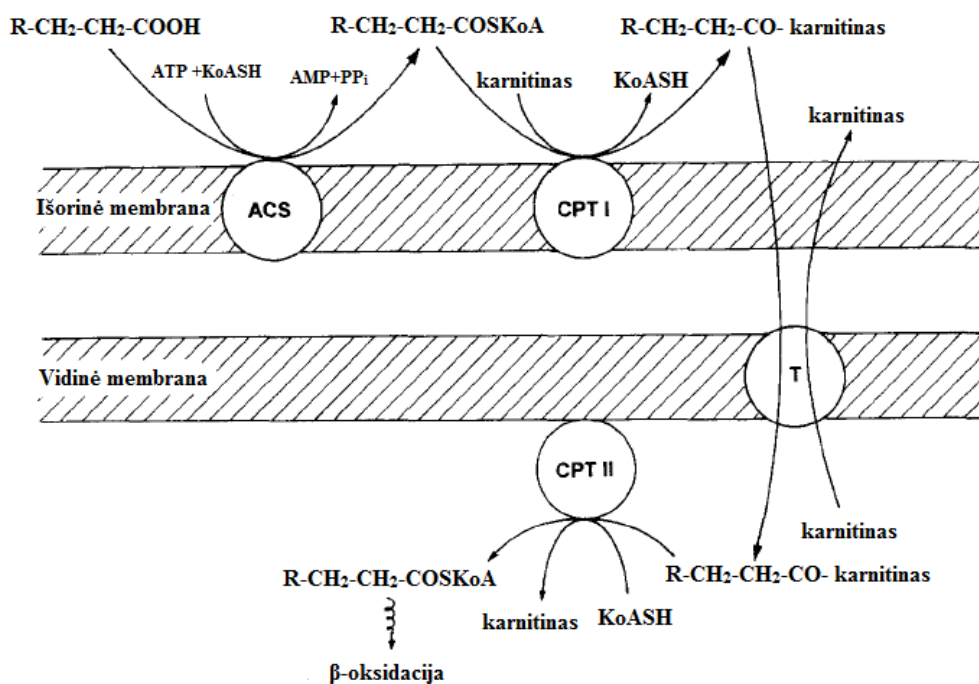
Ilgos grandinės riebalų rūgštys yra pagrindinis energijos šaltinis ir svarbūs ląstelių membranas, sudarančių lipidų komponentai (Wakil ir Abu-Elheiga, 2009). Paprastai, kai energijos patekimo į organizmą suma viršija energijos sąnaudas, energijos perteklius yra saugomas adipocituose trigliceridų (TAG angl. *triacylglyceride*) forma. Fiziologinėmis sąlygomis, laisvųjų riebalų rūgščių (FFA angl. *free fatty acids*) išsiskyrimas iš riebalinio audinio yra reguliuojamas taip, kad atitinkami kiekiai FFA išskiriami siekiant patenkinti audinių energijos poreikius, įskaitant širdį ar raumenis. Kai balansas tarp energijos tiekimo ir jos išsikvojimo yra sutrikęs dėl per didelio maisto kiekio, riebaliniame audinyje pradeda kauptis lipidų perteklius (Lopaschuk ir kt., 2010). Kuomet adipociai yra labai padidėję, tuomet padidėja ir cirkuliuojančių kraujyje laisvųjų riebalų rūgščių ir trigliceridų koncentracija. Padidėjęs FFA kiekis gali paspartinti labai mažo tankio lipoproteino (VLDL angl. *very-low-density lipoprotein*) trigliceridų (TAG) sintezę kepenyse, taip pat sukelti hiperlipidemiją (Lewis ir kt., 1995). Atlikti tyrimai tiek su žmonėmis, tiek su gyvūnais parodė, kad esant nutukimui padidėja cirkuliuojančių FFA ir TAG (Lopaschuk ir kt., 2010). Kartu su didėjančiu cirkuliuojančių lipidų kiekiu, didėja intramiokardinių TAG kiekis palaiapsniui su kūno masės indekso didėjimu (Szczepaniak ir kt., 2003).

1.7.1 Riebalų rūgščių pernaša per mitochondrijų membraną

Daugelį metų buvo manyta, kad riebalų rūgščių (angl. *FA*) transportas per skeleto raumenų ląstelių plazminę membraną vyksta pasyvios difuzijos būdu. Didėjantis literatūros skaičius apie riebalų rūgščių (angl. *FA*) transportą per ląstelių plazminę membraną tema leido suprasti, kad riebalų rūgštys į skeleto raumenų ląsteles patenka tarpininkaujant baltymams (Bonen ir kt., 2007). Tokie baltymai palengvina riebalų rūgščių patekimą į ląsteles. Išsiaiškinta, kad tai yra riebalų rūgščių translokazė, žmogaus CD36 homologas (FAT/CD36) (Abumrad ir kt., 1993); baltymų šeima, pernešanti riebalų rūgštis (FATP1-6) (Schaffer ir kt., 1994) ir plazminės membranos baltymai susiję su rišančiais riebalų rūgščių baltymais (FABPpm) (Stremmel ir kt., 1985).

Skeleto raumenyse ilgos grandinės riebalų rūgščių transportiniai baltymai yra keliose subląstelinėse srityse (Bonen ir kt., 2000). FAT/CD36 rastas tiek žiurkių, tiek žmogaus skeleto raumenų mitochondrijose. Jose esantis FAT/CD36 kartu su karnitino palmitoiltransferaze I (CPTI) padeda reguliuoti riebalų rūgščių transporto ir oksidacijos srautus mitochondrijose, esant raumenims ramybės būsenoje. Buvo išsiaiškinta, kad užblokavus mitochondrijų FAT/CD36, riebalų rūgščių oksidaciją šiose organelėse buvo beveik visiškai nuslopinta (Holloway ir kt., 2006; Bezaire ir kt., 2006; Campbell ir kt., 2006).

Riebalų acil-KoA tioesteriai formuojasi mitochondrijų membranų išorėje ir negali tiesiogiai patekti į mitochondrijų vidų, kur yra β -oksidacijos fermentai, nes vidinė mitochondrijų membrana yra nelaidi KoA ir jos dariniams. Todėl, karnitinas perneša acilo grupes, atskilusias nuo acil-KoA tioesterių per vidinę mitochondrijų membraną. Nuo karnitino priklausomas riebalų rūgščių pernešimas per vidinę mitochondrijų membraną schematiškai parodyta 7 pav. (McGarry, 2001). Karnitino palmitoiltransferazė I (CPT I), kuri yra išorinės mitochondrijų membranos fermentas, katalizuoja reakciją, kurios metu susidaro acilkarnitinas, kuris pernešamas acilkarnitino translokazės per vidinę mitochondrijų membraną į mitochondrijų vidų. Šis baltymų nešiklis katalizuoja greitą acilkarnitino keitimąsi su karnitinu (1 mol acilkarnitino su 1 mol karnitinu) ir acilkarnitino kaitą su acil-KoA (1 mol acilkarnitino su 1 mol acil-KoA) (Schulz, 2008). Alosterinis CPT I slopinimas malonil-KoA yra pagrindinis mechanizmas, kuriuo yra reguliuojama CPT I veikla ir β -oksidacija (Lopaschuk ir kt., 2010).



7 pav. Nuo karnitino priklausomas acilgrupių pernešimas per vidinę mitochondrijų membraną. ACS – acil-KoA sintetazė, CPT I ir CPT II – karnitino palmitoiltransferazės I ir II, T – karnitino: acilkarnitino transferazė (Schulz, 2008).

Tokie mainai, ypač acilkarnitino į karnitiną, yra būtini ilgų grandinių riebalų rūgščių pernešimui iš citozolio į mitochondrijas. Be to, translokazės palengvina lėtą vienkryptį karnitino srautą per vidinę mitochondrijų membraną. Mitochondrijų užpilde, karnitino palmitoiltransferazės II (CPT II) fermentas, kuris yra susijęs su vidinės mitochondrijų membrana, katalizuoja acilo grupių iš karnitino KoA formos perkėlimą į acil-KoA tioesterius, kad galėtų patekti į β -oksidacijos spiralę. CPT I priešingai nei CPT II grįžtamai slopinamas malonil-KoA, tai yra natūralus reguliatorius ir yra

kovalentiškai modifikuojamas bei inhibuojamas tam tikros alkilglicido rūgšties KoA darinių (McGarry, 2001).

Skeleto raumenų mitochondrijų funkcionalumo sumažėjimas priklausomas nuo sočiųjų riebalų rūgščių kiekio. Keletas tyrimų parodė, kad mitochondrijų kiekis, jų funkcijos ir oksidacinis pajėgumas yra sumažėjęs insulinui atsparių nutukusių ir 2 tipo cukriniu diabetu sergančių asmenų (Boushel ir kt., 2007).

1.7.2 Riebalų rūgščių β -oksidacija

Riebalų rūgščių β -oksidacija yra procesas, kurio metu yra skaidomos ilgos acil-KoA grandinės molekulės į acetil-KoA molekules. Ilgos grandinės riebalų rūgščių β -oksidacija yra svarbiausias procesas aprūpinantis organizmą energija, tai ypač svarbu širdies ir skeleto raumenims. Tačiau ir kiti audiniai, visų pirma kepenys, taip pat inkstai, plonosios žarnos gali panaudoti β -oksidacijos produktus ketonams formuoti, kurie gali būti naudojami energijai kitų audinių. Ryšys tarp riebalų oksidacijos ir angliavandenių panaudojimo kaip energijos šaltinio yra sudėtingas ir priklauso nuo audinio, mitybos būklės, fizinio krūvio ir kitų veiksnių, tokių kaip infekcijos ar kitų pataloginių būsenų įvairovės (Bartlett ir Eaton, 2004). Mitochondrijų β -oksidaciją trimis etapais:

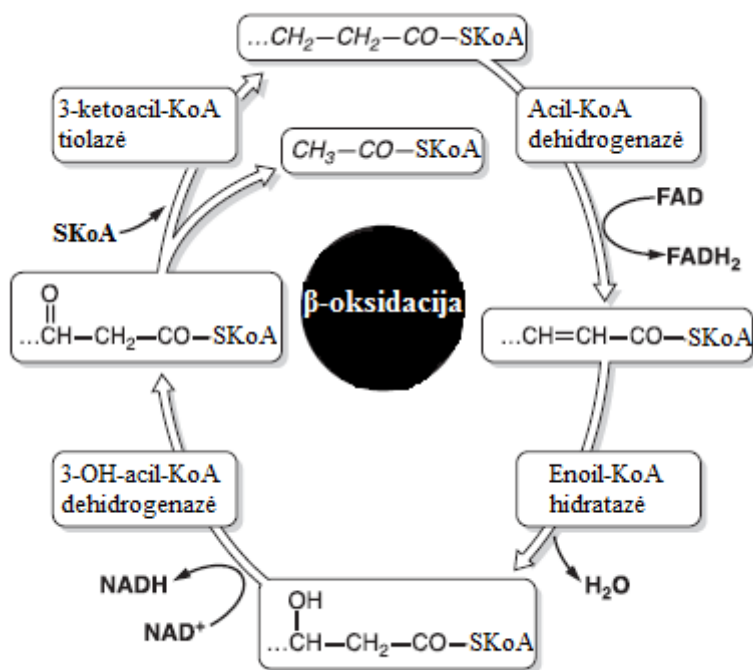
1. Per pirmąjį etapą oksiduojantis riebalų rūgščiai dviejų anglies atomų fragmentas pašalinamas aceti-KoA pavidalu, o keturi H^+ atomai redukuoja NAD^+ ir FAD;
2. Per antrąjį etapą acetil-KoA suskaidomas trikarboksirūgščių cikle, kuriame jis visiškai oksiduojamas iki CO_2 ir redukuojami nukleotidai NAD^+ ir FAD;
3. Per trečiąjį etapą NADH ir $FADH_2$ oksiduojami oksidacinio fosforilino metu ir išsiskyrusi energija sukaupiama ATP molekulėse (Kadziauskas, 2012).

Karnitino vaidmuo yra ypač svarbus β -oksidacijos srauto kontrolei. Acil-KoA esteriai, kaip minėta anksčiau, negali tiesiogiai kirsti mitochondrijų vidinės membranos ir jų patekimas į mitochondrijas yra pagrindinis dalykas, kontroliuojant ir reguliuojant β -oksidacijos srautą (Eaton, 2002). Pernešimas per mitochondrijų membraną yra pasiekiamas perleidžiant acilo grupę iš kofermento A karnitinui, pernešimas per vidinę membraną ir pakartotinį keitimą į acil-KoA esterį vyksta mitochondrijos viduje. Tai yra pasiekiamą dėka karnitino palmitoiltransferazės I (CPT I) ant išorinės mitochondrijų membranos, karnitino acilkarnitino translokazės vidinėje membranoje ir karnitino palmitoiltransferazės II (CPT II) ant vidinės membranos paviršiaus pagalba (6 pav.)

Palmitoilkarnitinas yra pagrindinis β -oksidacijos substratas. Jis patenkęs į mitochondrijas karnitino-acilkarnitino translokazės pagalba virsta palmitoil-KoA (Perevoshchikova ir kt., 2013). Pagamintų acetil-KoA molekulių skaičius priklauso nuo oksiduojamų riebiųjų rūgščių anglies grandinės ilgio. Šis procesas yra susijęs su fermentų įvairove. Riebalų rūgščių β -oksidacijos procese dalyvauja keturi pagrindiniai fermentai, išsidėstę tokia tvarka: acil-KoA dehidrogenazės, enoil-KoA

hidratazė, L-β-hidroksiacil-KoA dehidrogenazės ir β-ketoacil-KoA tiolazė (8 pav.) (Schulz, 2008). Kiekvienas iš šių fermentų yra jautrus grįžtamojo ryšio slopinimui fermentinių reakcijų metu susidariusiam produktui, įskaitant FADH₂ ir NADH (Lopaschuk ir kt., 2010). Kiekvieno β-oksидacijos ciklo pabaigoje, yra suformuojamos dvi naujos molekulės, viena iš jų yra acetil-KoA ir acil-KoA. Be to, β-oksидacijos metu susidaro NADH ir FADH₂, reikalingi mitochondrijoje esančiai elektronų pernašos grandinei ir ATP sintezei. Viena FADH₂ molekulė susidaro reakcijos metu katalizuojant ją acil-KoA dehidrogenazei, o NADH susidaro reakciją katalizuojant 3-hidroksiacil-KoA dehidrogenazei.

Acetil-KoA ir NADH gamybos padidėjimas dėl piruvato dehidrogenazės (PDH) komplekso veiklos gali tiesiogiai slopinti riebalų rūgščių β-oksидaciją (Lopaschuk ir kt., 2010). Riebalų rūgščių β-oksидacijos fermentai taip pat yra reguliuojami transkripcijos kontrolės veiksnių ir sąlygų, todėl reguliuojama riebalų rūgščių β-oksидacija yra dažnai susijusios su padidėjusia β-oksидacijos fermentų išraiška (Lopaschuk ir kt., 2007). β-oksидacijos metu susidariusios acetil-KoA molekulės yra panaudojamos trikarboksirūgščių cikle. Veikiant citrato sintazei, vyksta kondensacijos reakcija, kurios metu oksaloacetatas ir acetil-KoA sudaro citratą, kuris toliau yra naudojamas trikarboksirūgščių cikle.

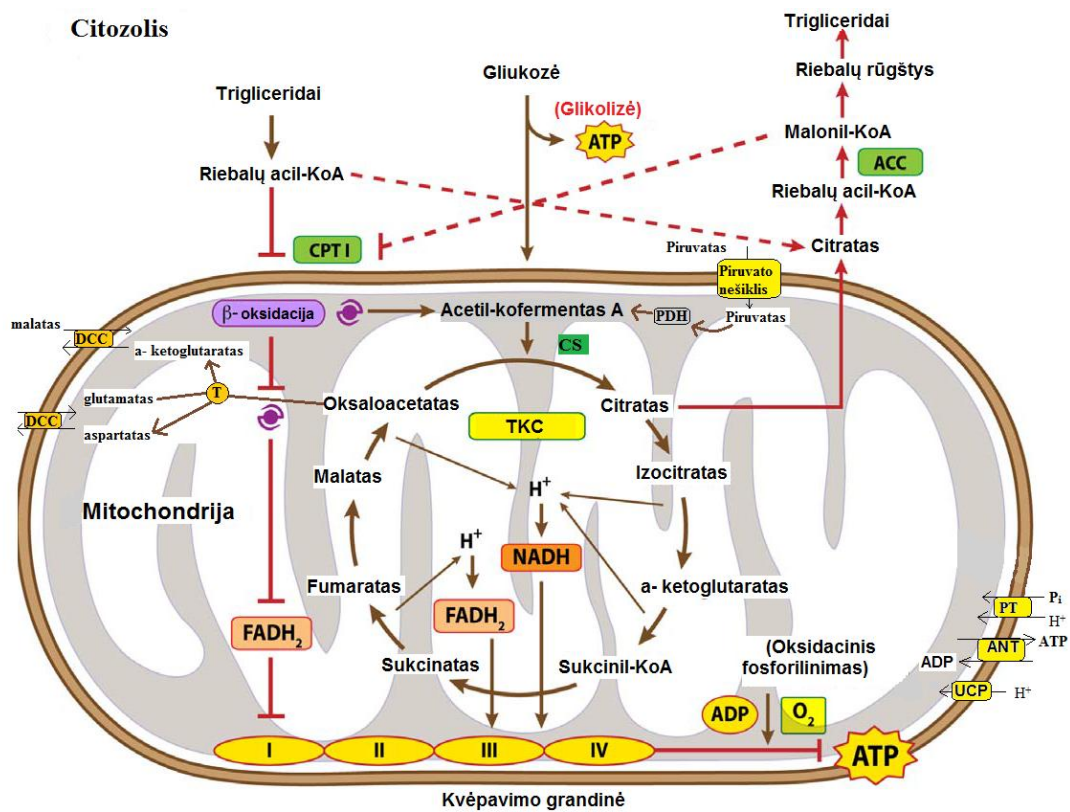


8 pav. β-oksидacija ir joje dalyvaujantys fermentai (Lopaschuk ir kt., 2010).

1.7.3 Riebalų rūgščių oksidacijos reguliacija mitochondrijose

Laisvosios riebalų rūgštys susidaro iš lipoproteinų veikiant lipazėms arba yra išskiriamos riebalinio audinio į kraujotakos sistemą, kur yra nunešamos į kitus audinius bei organus. Hormonai, pavyzdžiui, gliukagonas ir insulinas reguliuoja triacilglicerolių lipolizę riebaliniame audinyje. Riebalų rūgščių panaudojimas bet kokiai oksidacijai ar lipidų sintezei priklauso nuo mitybos, o tiksliau, nuo angliavandenių prieinamumo. Dėl glaudaus ryšio tarp lipidų metabolizmo, angliavandenių apykaitos ir ketogenezės riebalų rūgščių oksidacijos reguliavimas kepenyse skiriasi nuo kitų audinių, pavyzdžiui, širdies ir skeleto raumenų, kurie turi didelį katabolinį aktyvumą (Schulz, 2008).

Riebalų rūgščių metabolizmas kepenyse priklauso nuo mitybos: pavalgius kepenys konvertuoja angliavandenius į riebalų rūgštis, o badaujant aktyviau vyksta riebalų rūgščių oksidacijos, ketogenezės, ir gliukoneogenezės procesai. Akivaizdu, kad egzistuoja abipusis ryšys tarp riebalų rūgščių sintezės ir riebalų rūgščių oksidacijos. Yra nustatyta, kad lipidų ir angliavandenių metabolizmas yra priklausomas nuo hormonų kontrolės, bet sunkiau nustatyti mechanizmą, kuris reguliuoja riebalų rūgščių sintezę ir oksidaciją. McGarry ir Foster pasiūlė, kad malonil-KoA, pirmojo tarpininko, susijusio su riebalų rūgščių biosinteze koncentracija, lemia riebalų rūgščių oksidacijos greitį (McGarry ir Foster, 1980). Pavalgius, gliukozė yra aktyviai verčiama į riebalų rūgštis, malonil-KoA koncentracija yra padidėjusi. Mikromolinė malonil-KoA koncentracija slopina kepenų CPT I, tuo būdu slopindama riebalų rūgščių acilgrupės perkėlimą nuo KoA į karnitiną, jų pernešimą į mitochondrijas, o tuo pačiu ir β -oksidacija (9 pav.) Mažėjant malonil-KoA koncentracijai, CPT I slopinamas mažiau. Badavimas atvirkščiai - sukelia bendrą CPT I aktyvinimą ir CPT I jautrumo sumažėjimą malonil-KoA. Badavimo metu acilkarnitinas greičiau formuojasi ir pernešamas į mitochondrijas, kur stimuliuoja β -oksidaciją ir ketogenezę (Schulz, 2008).



9 pav. Sutrikusi mitochondrijų ATP sintezė. TKC – trikarboksirūgščių ciklas, CS – citrato sintazė, PDH – piruvato dehidrogenazė, DCC – dikarboksilatų nešiklis, PT – fosfatų nešiklis, T – transaminazė, UCP – baltymai skyrikliai, ACC (acetyl-CoA carboxylase) – acetil-KoA karboksilazė, ATP – adenozino trifosfatas, ADP – adenozino difosfatas, ANT – adeninų nukleotidų nešiklis (Rogge, 2009).

Malonil-KoA koncentracija ląstelėse yra tiesiogiai susijusi su acetil-KoA karboksilazės veikla, kuri yra reguliuojama hormonų. Trumpalaikis acetil-KoA karboksilazės reguliavimas apima fosforilinimo ir defosforilinimo fermentus. Gyvūnuose, kurie buvo šeriami daug riebalų turiančia dieta, buvo aukštas [gliukagono]/[insulino] santykis, sukeliantis fosforilinimą ir acetil-KoA karboksilazės inaktyvaciją. Dėl to malonil-KoA koncentracija ir riebalų rūgščių sintezė sumažėja, o β -oksidacijos lygis didėja. [gliukagono]/[insulino] santykio sumažėjimas šiuos efektus pakeis priešinga kryptimi. Taigi ir riebalų rūgščių sintezė, ir riebalų rūgščių oksidacija yra reguliuojama [gliukagono]/[insulino] santykio (Schulz, 2008).

1.7.4 Riebalų rūgščių poveikis adenino nukleotidų nešikliui (ANT)

ANT yra mitochondrijų adenino nukleotidų nešiklis (ANT, angl. *adenine nucleotide translocator*), kuris katalizuoja ADP ir ATP mainus per vidinę mitochondrijų membraną (Heldt ir Klingenberg 1968; Klingenberg, 1977; Lemasters ir Sowers 1979). Iškelta hipotezė, kad mitochondrijų adenino nukleotidų nešiklio (ANT) inhibicija gali būti priklausoma nuo ilgų

grandinių riebalų acil-KoA esterių. Eksperimentų metu buvo parodyta, kad acil-KoA esteriai gali stipriai inhibuoti ANT tiek mitochondrijose tiek ir submitochondrinėse dalyse konkrečiu ir nuo grandinės ilgio priklausomu būdu (Shug ir kt., 1971; Woldegiogis ir kt., 1982; Shrago ir kt., 1995). Inhibicija vyksta tiek iš citozolio, tiek iš vidinės mitochondrijų membranos matrikso pusės (Chua ir Shrago, 1977). Kai mitochondrinis ATP keičiamasi su citozoliniu ADP, vidumitochondrinis acil-KoA konkuruoja su mitochondrijos užpildo ATP dėl ANT ir taip mažina ATP / ADP keitimosi lygį. Acil-KoA taip pat slopina atvirkštinį mitochondrinio ADP keitimąsi su citozoliniu ATP, tačiau ANT toli nuo termodinaminės pusiausvyros net kai yra žemas kvėpavimo lygis. Esant aukštesniam mitochondrijų kvėpavimo lygiui, užpildo ATP / ADP santykis ir ATP koncentracija yra mažesni, dėl to, kad keičiamasis adenino nukleotidų fondas nesikeičia (Borutaitė ir kt., 1989).

Kap jau buvo minėta, ilgos grandinės acil-KoA esteriai negali patys kirsti vidinės mitochondrijų membranos, jie pernešami acilkarnitino esterių pagalba kartu su karnitino-acilkarnitino translokaze (Fritz, 1967; Pande, 1975; Ramsay ir Tubbs, 1975).

Lerner ir jos kolegos nustatė, kad acetil-KoA, ypač ilgos grandinės palmitoil-KoA ir oleil-KoA, slopina ANT žiurkės kepenų ir širdies mitochondrijose (Lerner ir kt., 1972). Slopinama galima sumažinti pridėjus ADP (Shug ir kt., 1971) arba karnitino (Pande ir Blanchaer, 1971). Šio tyrimo išvados taip pat paaiškino pastebėjimą, kad oleatas dalinai slopina ANT mitochondrijose, kai oleatas paverčiamas į oleil-KoA mitochondrijų užpilde. Kai KoA yra verčiamas į sukcinil- ar acetil-KoA įdėjus ketoglutarato ar piruvato, oleatas nebeslopina ADP pernašos (Klingenberg, 2008). Taip pat buvo teigiama, kad ilgos grandinės riebalų acil-KoA esterių kaupimasis ląstelėse ir vėlesnė ANT inhibicija gali padidinti ATP/ADP santykį mitochondrijų užpilde, membranos potencialą ($\Delta\psi$) ir laisvųjų deguonies radikalų gamybą (Kim ir kt., 2010). Ilgos grandinės acil-KoA taip pat slopina ir kitus mitochondrijose esančius nešiklius bei keletą mitochondrinių fermentų, tai parodo jų bent iš dalies nespecifinį amfipatinį poveikį (Klingenberg, 2008). Nustatyta, kad badavusių individų kepenyse acil-KoA atlieka inhibitoriaus vaidmenį ADP/ATP pernašoje (Panov ir kt., 1975).

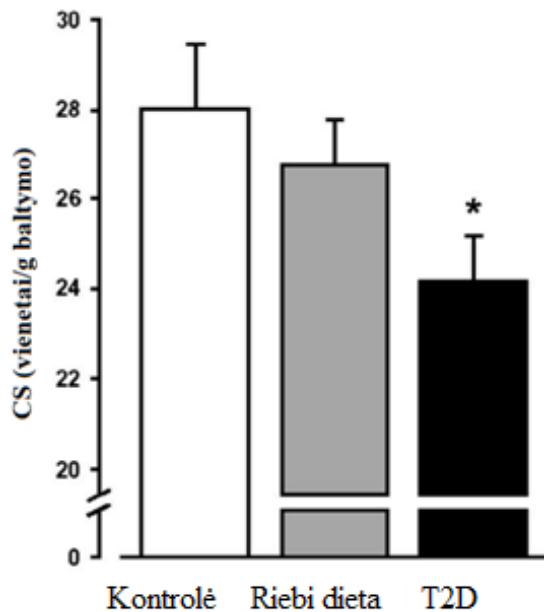
Ventura ir jo kolegos nustatė ilgos grandinės acil-KoA β -oksidacijos įtaką ADP/ATP nešikliui, remiantis ankstesniais tyrimais, kuriuose buvo įvertintas ADP/ATP nešiklio aktyvumas skirtinguose audiniuose. Laisvosios riebalų rūgštys ir nešakotos ilgos grandinės acil-KoA slopina adenino nukleotidų nešiklį, *in vitro* (ląstelėse ir izoliuotose mitochondrijose) (Ventura, 2007). Aktyvi riebalų rūgščių forma gali būti svarbi jungtis tarp nutukimo ir 2 tipo cukrinio diabeto (Bakker ir kt., 2000).

1.8. Citrato sintazės aktyvumas 2 tipo cukrinio diabeto skeleto raumenyse

Mitochondrijos jau seniai žinomos kaip energijos tiekėjos eukariotinėse ląstelėse, tiekdamos ATP. Neseniai, mitochondrijų funkcijų sutrikimas buvo susietas su atsparumo insulinui patogenezė skeleto raumenyse. Iškelta hipotezė teigianti, kad yra ryšys tarp sutrikusių mitochondrijos funkcijų ir 2 tipo cukrinio diabeto, pacientams, kurie serga tam tikromis autosominėmis ligomis, tokiomis kaip Friedreicho ataksija, yra sutrikęs oksidacinis fosforilinimas, dėl ko dažnai išsivysto cukrinis diabetas (Patti ir kt., 2003).

2 tipo cukriniui diabetui (T2D) yra būdingi tiek lipidų tiek ir gliukozės apykaitos pakitimai (Ørtenblad ir kt., 2005). Vis daugėja įrodymų, rodančių sąsajas tarp atsparumo insulinui, 2 tipo cukrinio diabeto ir mitochondrijų funkcijų sutrikimo. Pirminiai *in vivo* tyrimai parodė sumažėjusį citrato sintazės (CS)/heksokinazės (HK) santykį skeleto raumenyse, esant cukriniam diabetui, taip pat buvo parodyta, kad oksidacinis/glikolitinis santykis koreliuoja su jautrumu insulinui (Simoneau ir kt., 1997). Buvo nustatyta, kad mitochondrijų dydis ir aktyvumas sumažėjęs nutukusiuose ir T2D individuose, kas yra siejama su atsparumu insulinui (Kelley ir kt., 2002). Stump ir kolegos parodė, kad insulinas turi tiesiogiai stimuliuojantį poveikį mitochondrijų ATP gamybai ir mitochondrijų fermentų iRNR transkriptams skeleto raumenyse cukriniu diabetu nesergančiuose individuose, tuo tarpu nebuvo pastebėta mitochondrijų ATP gamybos pokyčiai T2D atveju (Stump ir kt., 2003). T2D individų raumenyse pastebėtas ATP-sintazės beta subvieneto baltymų koncentracijos sumažėjimas, kuris koreliavo su gliukozės koncentracija plazmoje badaujant (Hojlund ir kt., 2003).

Ørtenblada ir kolegų tyrimo rezultatai rodo, kad citrato sintazės (CS) aktyvumas pradinėmis sąlygomis raumenų skaidulose T2D atveju vidutiniškai yra $24,1 \pm 0,7$ vienetai/g baltymo, kontroliniuose individuose - $27,9 \pm 1,5$ ir $26,7 \pm 1,0$ - nutukimo atveju (10 pav.). CS aktyvumas buvo kur kas mažesnis (14%) raumenų skaidulose sergant cukriniu diabetu palyginus su CS aktyvumu kontrolių raumenų skaidulose ($p < 0,05$, 10 pav.). Inkubuojant su insulinu ($1 \mu\text{M}$) 4 valandas kontrolių raumenų skaidulose citrato sintazės aktyvumas padidėjo 26% ir 33% nutukusių kontrolių, cukriniu diabetu sergant raumenų skaidulose CS aktyvumas išliko nepakitęs taikant insulino inkubaciją. 4 valandų inkubacija naudojant didelius kiekius tarpląstelinių riebalų rūgščių (palmitatas $0,6 \text{ mM}$), neparodė jokio poveikio CS aktyvumui nei vienoje iš grupių. Tačiau, kai inkubacijai buvo naudotas palmitatas kartu su insulinu, stimuliuojantis insulino poveikis CS aktyvumui buvo panaikintas (Ørtenblada ir kt., 2005).



10 pav. Citrato sintazės aktyvumas raumenų skaidulose kontrolėse, taikius riebią dietą ir sergant cukriniu diabetu. CS aktyvumas buvo nustatomas suspensijose, turinčiomis daug mitochondrijų. * $p < 0.05$ lyginant su kontrolėmis (Ørtenblada ir kt., 2005).

Šio tyrimo rezultatai pateikia įrodymų apie CS veiklos sutrikimus, kurie gali suvaidinti svarbų vaidmenį 2 tipo cukrinio diabeto patogenezėje. Be to, duomenys rodo, kad atsparumas insulinui CS lygiu gali būti sukeltas dėl per didelio kiekio laisvųjų riebalų rūgščių liesuose ir nutukusiuose individuose. Neatrodė, kad pirmiausia būtų paveikta elektronų transporto grandinė dėl atsparumo insulinui (Ørtenblada ir kt., 2005).

Keletas tyrimų parodė sąsajas tarp nutukimo, atsparumo insulinui ir sumažėjusio oksidacinio pajėgumo raumenyse (Simoneau ir Kelley, 1997; He ir kt., 2001; Simoneau ir kt., 1995), tyrimo metu paaiškėjo, kad yra sumažėjęs mitochondrijų skaičius, pakitusi mitochondrijų morfologija ir sumažėjęs mitochondrijų fermentų lygis, t.y. sukcinato dehidrogenazės (He ir kt., 2001; Goodpaster ir kt., 2001), citrato sintazės (CS) (Simoneau ir Kelley, 1997; Kelley ir kt., 2002; Simoneau ir kt., 1999; Kim ir kt., 2000) ir karnitino palmitoiltransferazės-1 (CPT1) (Simoneau ir kt., 1999; Kim ir kt., 2000)

Anksčiau buvo parodyta, kad riebalų rūgštys (FFA angl. *Free fatty acids*) panaikina insulino sukeltą gliukozės oksidacijos padidėjimą raumenų skaidulose (Gaster ir Beck-Nielsen, 2004) ir atsižvelgiant į tai, yra patvirtinama išvada, kad FFA susilpnina insulino sukeltą citrato sintazės (CS) aktyvumą raumenų skaidulose individų, nesergančių cukriniu diabetu. Šis pastebėjimas rodo, kad padidėjęs FFA kiekis yra susijęs su 2 tipo cukriniu diabetu ir nutukimu ir gali veikti per CS, taip pat gali prisidėti prie lipidų sukkelto atsparumo insulinui patogenezės. Ørtenblada ir kolegės iškėlė hipotezę, kad FFA, tam tikru būdu, gali panaikinti kovalentines CS modifikacijas.

II. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Visos tyrimuose naudotos medžiagos buvo *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen, Vokietija).

2.2. Tiriamosios medžiagos apimtis bei tyrimų pobūdis

Eksperimentai buvo atliekami su mitochondrijomis, išskirtomis iš C57/B6 ir B6A/Kjn veislių 12-14 savaičių amžiaus 8 pelių patinų (C57B6) ir 8 (B6A/Kjn) ir 9 patelių (C57B6) ir 9 (B6A/Kjn) kepenų ir raumenų. Pelės gautos iš Lietuvos Kūno kultūros universiteto, kur buvo šeriamos standartizuotu graužikų pašaru. Studijos protokolas buvo patvirtintas Lietuvos Maisto ir Veterinarijos Tarnybos Etikos komitete (LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Etikos komisijos leidimas Nr. 0223).

Kongeninių pelių gavimas. Inbrydingas – yra reprodukcijos variantas, kai poruojasi genetiškai giminingi tėvai. Jos rezultatas yra padidintas homozigotiškumas, tai yra absoliutus konkretaus geno dominavimas. Kuo daugiau tokių poravimų iš kartos į kartą, tuo homozigotiškumas stipresnis. Kongeninių pelių atveju poruojamos dvi inbrydinės linijos (I kryžminimosi etapas), ir po 5-10 generacijų dviejų tų linijų palikuonys (donoras) poruojami su originalia linija (akceptoriumi). Po kelių kryžminimų (II kryžminimosi etapas) (angliškai, backcrossing) gaunama gryna kongeninė linija, išlaikusi retą donorų mutaciją.

2.3. Kepenų mitochondrijų išskyrimas

Mitochondrijos išskiriamos diferencinio centrifugavimo metodu šaltoje patalpoje 0 – 4 °C temperatūroje (Scholte ir kt., 1973). Pelės anestezuojamos CO₂ ir nutraukiamos stuburo smegenys. Pelės kepenys plaunamos mažoje stiklinėlėje 0,9 % KCl tirpale (0 – 4 °C), kelis kartus pamaigant pincetu. Po to organas išimamas, nuo jo nukarponomas jungiamasis audinys, riebalai. Kepenys įdedamos į kitą stiklinėlę, kurioje yra 0 °C 0,9 % KCl tirpalas, ir vėl praplaunama, pamaigant pincetu. Organas išimamas, nusausinamas filtriniu popieriumi ir pasveriamas. Pagal kepenų svorį imamas homogenizavimo terpės (HT) (1:10 (m/V)), kurios sudėtis: sacharozės 250 mM, tris-HCl 10 mM, EGTA 5 mM, 2 mg/ml jaučio serumo albumino (pH 7,7, 2 °C) (HT). Kepenys susmulkinamos mažoje stiklinėje žirkulutėmis, laikant indą ant ledu, ir po to praplaunama 0,9 % KCl tirpalu. Sukarpytas audinys perkeliamas į homogenizatorių ir užpilamas anksčiau apskaičiuotu HT kiekiu. Homogenizuojama 20–30 sekundžių (homogenizatorius prieš tai praplaunamas HT tirpalu ir įstatomas į indą su leda). Homogenatas supilstomas į centrifuginius mėgintuvėlius ir

centrifuguojama $800\times g$ 5 min. Supernatantas perkošiamas per dvigubą marlės sluoksnį ir centrifuguojama $6800\times g$ 10 min. Gautas supernatantas nupilamas, o mitochondrijų nuosėdos suspendatoriumi suspenduojamos ST terpėje, kurios sudėtis: sacharozės 250 mM (8,56 g), tris-HCl 5 mM (60,6 mg), bidistiliuoto H₂O iki 100 ml, pH 7,3 (2 °C temperatūroje) (apie 20 ml) ir dar kartą centrifuguojamos $6800\times g$ 10 min.

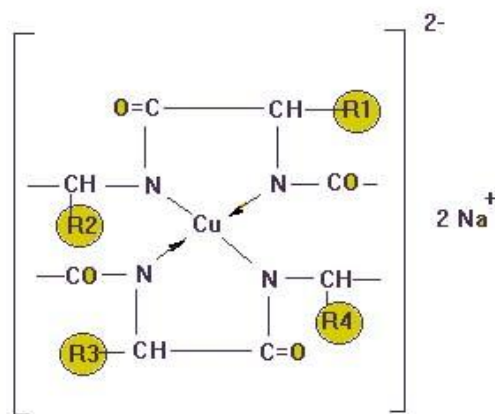
Gautas supernatantas išpilamas, o mitochondrijos suspenduojamos, pasitelkiant suspendatorių. Mėgintuvėlis su mitochondrijų suspensija (60 – 100 mg/ml mitochondrijų baltymo) uždengiamas dangteliu ir įstatomas į indą su ledais.

2.4. Raumenų mitochondrijų išskyrimas

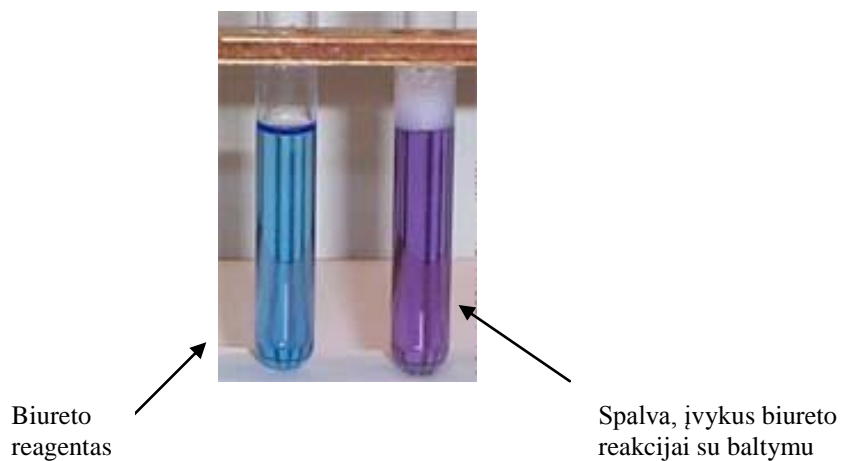
Pelės abiejų užpakalinių galūnių raumenų audinys iškerpamas, plaunamas mažoje stiklinėlėje 0,9 % KCl tirpale (0 – 4 °C). Po to audinys išimamas į atšaldytą Petri lėkštelę, sukarpomas ir 5 min. inkubuojamas ant ledu su 2,5 ml terpės, kurios sudėtis: sacharozės 150 mM, KCl 75 mM, MOPS 50 mM, KH₂PO₄ 1 mM, MgCl₂, 5 mM, EGTA 1 mM, 0,2 mg/ml proteinazės, pH 7,4 (4 °C). Sukarpytas audinys perkeliamas į stiklo-teflono homogenizatorių ir užpilamas 20 ml homogenizavimo terpės (HT), kurios sudėtis: 250 mM sacharozės, 0,1 mM EGTA, 20 mM MOPS, 1 mg/ml BSA, pH 7.4 (4 °C). Homogenizuojama 10 mostų 750 aps./min. greičiu. Homogenatas supilstomas į centrifuginius mėgintuvėlius ir centrifuguojama $800\times g$ 10 min. (4 °C). Supernatantas perkošiamas per dvigubą marlės sluoksnį ir centrifuguojama $10000\times g$ 10 min. (4 °C). Gautas supernatantas nupilamas, o mitochondrijų nuosėdos suspendatoriumi suspenduojamos 10 ml ST terpėje, kurios sudėtis: sacharozės 250 mM, 0,1 mM EGTA, 20 mM MOPS, pH 7,4 (4°C) ir dar kartą centrifuguojamos $10000\times g$ 10 min. Gautas supernatantas išpilamas, o mitochondrijos suspenduojamos 150 μ l ST. Mitochondrijų suspensija laikoma leduose.

2.5. Mitochondrijų baltymų kiekio nustatymas biureto metodu

Viena labiausiai paplitusių ir naudojamų reakcijų peptidams ir baltymams nustatyti yra biureto reakcija (Gornal ir kt, 1949). Šiai reakcijai vykti reikia kelių peptidinių ryšių, todėl viena aminorūgštis reakcijoje nedalyvauja. Veikiant peptidus ar baltymus Cu²⁺ šarminėje aplinkoje, susidaro purpurinės spalvos Cu²⁺ – peptido kompleksas:



Kadangi tirpalo spalvos intensyvumas priklauso nuo baltymo kiekio (11 pav.), ši reakcija naudojama baltymo koncentracijai nustatyti, susidariusio komplekso spalvos intensyvumą matuojant spektrofotometriškai.



11pav. Mitochondrijų baltymo nustatymas biureto metodu.

Biureto metodas baltymui nustatyti nėra labai jautrus ir tinka, kai baltymo koncentracija yra 2 – 10 mg baltymo mėginyje. Nustatyti baltymą trukdo amonio jonai.

Gradavimo grafiko paruošimas

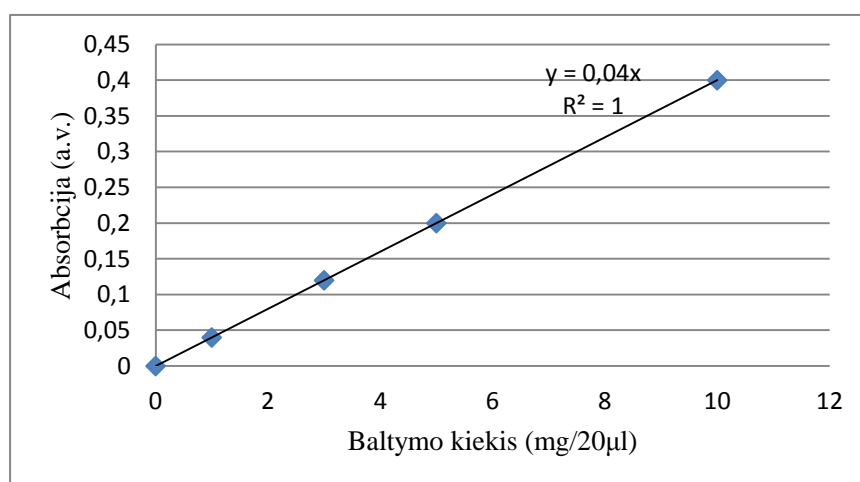
Pagal lentelę paruošiami jaučio serumo albumino tirpalai:

3 lentelė. Jaučio serumo albumino tirpalų paruošimas.

Gaminamas tirpalas	Skiedimai	Baltymo kiekis 20-yje μ l tirpalo
80 mg/ml		4 mg
60 mg/ml	750 μ l baltymo tirpalo (80 mg/ml) + 250 μ l H ₂ O	3 mg
40 mg/ml	500 μ l baltymo tirpalo (80 mg/ml) + 500 μ l H ₂ O	2,5 mg
30 mg/ml	750 μ l baltymo tirpalo (40 mg/ml) + 250 μ l H ₂ O	1,5 mg
20 mg/ml	500 μ l baltymo tirpalo (40 mg/ml) + 500 μ l H ₂ O	1 mg
10 mg/ml	500 μ l baltymo tirpalo (20 mg/ml) + 500 μ l H ₂ O	0,5 mg
5 mg/ml	500 μ l baltymo tirpalo (10 mg/ml) + 500 μ l H ₂ O	0,25 mg
4 mg/ml	100 μ l baltymo tirpalo (40 mg/ml) + 900 μ l H ₂ O	0,2 mg
2,5 mg/ml	100 μ l baltymo tirpalo (20 mg/ml) + 900 μ l H ₂ O	0,1 mg

Baltymui nustatyti imama 20 μ l kiekvieno paruošto baltymo tirpalo, 380 μ l 0,33 % deoksicholininės rūgšties (DOX) ir 1,6 ml biureto reagento. Paruošiamas *kontrolinis tirpalas* be baltymo: pridedama 400 μ l DOX (vietoje baltymo tirpalo ir 380 μ l DOX tirpalo) ir 1,6 ml biureto reagento. Baltymo tirpalai ir kontrolinis tirpalas inkubuojami 20 min. vandens termostate 37 °C temperatūroje.

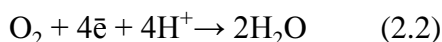
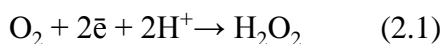
Matuojamas šviesos sugėrimas spektrofotometru „Helios“ (bangos ilgis – 536 nm). Kaip lyginamasis tirpalas naudojamas *kontrolinis tirpalas*. Braižomas gradavimo grafikas.



12 pav. Baltymo nustatymo gradavimo grafikas.

2.6. Mitochondrijų kvėpavimo greičio matavimas

Mitochondrijų kvėpavimas fiksuojamas poliarografiškai, naudojant uždara Klarko tipo deguonies elektrodą ir poliarografą (*Rank Brothers LTD*, Anglija), cirkuliacinį termostatą. Poliarografinis metodas pagrįstas vandenyje ištirpusio deguonies elektrochemine redukcija:



Tinkamai maišant tirpalą, kuriame vyksta (4.1) ir (4.2) elektrocheminės reakcijos, deguonies difuzijos greitis nemišomame tirpalo sluoksnyje prie pat elektrodo paviršiaus priklauso nuo ištirpusio deguonies koncentracijos.

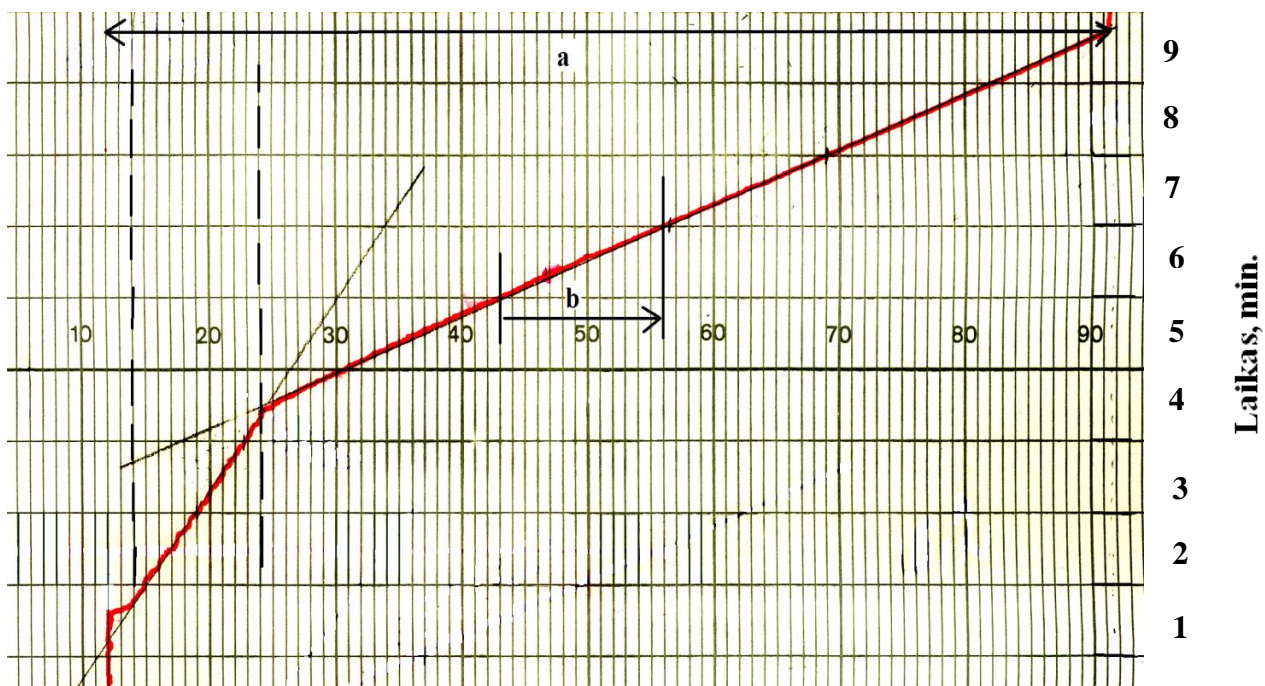
Deguonis poliarografiškai matuojamas taip parinkus darbinio elektrodo potencialą, kad elektrocheminė reakcija ant elektrodo paviršiaus neribotų bendro proceso greičio (0,7 V). Šiomis sąlygomis pasiekama vadinamoji „soties srovė“. Todėl deguonies koncentracija nemišomame tirpalo sluoksnyje prie elektrodo paviršiaus daug kartų mažesnė už deguonies koncentraciją tirpale.

Parodymai registruojami nepertraukiamai savirašio juostoje. Juostos judėjimo greitis – 1 cm/min. Į termostatuojamą kiuvetę (37 °C) įpilama 1 ml inkubavimo terpės, kurios sudėtis: KCl 110 mM, MgCl₂ 2,24 mM, Tris-HCl 10 mM, KH₂PO₄ 5 mM, pH 7,2 (37 °C temperatūroje) (IT), pridedama 10 μl 5 mM piruvato + malato, 5 mM glutamato + malato, 0,25mM malato + 0,05mM pamitoilkarnitino, 5 mM glutamato + malato + 0,05mM pamitoilkarnitino, 5 mM piruvato + malato + 0,05mM pamitoilkarnitino, 5mM sukcinato + 1μM Ro tirpalo. Kiuvetė užkemšama kamščiu ir registruojama bazinė linija (terpėje nesant mitochondrijų, deguonis neturi būti naudojamas).

Pridedama mitochondrijų suspensijos (1 mg mitochondrijų baltymo). Stebimas nedidelis deguonies sunaudojimas. Deguonis sunaudojamas dėl nespecifinio membranos laidumo. Kvėpavimo grandinė palaiko pakankamą Δ*p*, tačiau fosforilinimas nevyksta, nes nėra fosforilinimo substrato ADP (II metabolinė mitochondrijų būseną). Greitis registruojamas 3 min.

III metabolinė mitochondrijų būseną inicijuojama, pridedant 1 mM ATP tirpalo. Kreatinfosfokinazė katalizuoja kreatino fosforilinimą ir nuolat palaiko terpėje didelę ADP koncentraciją, todėl tokia eksperimentinė sistema lemia maksimalų mitochondrijų kvėpavimo greitį esant stacionarioms sąlygoms (Kholodenko, 1987).

Mitochondrijų kvėpavimo greitis apskaičiuojamas, brėžiant liestinę toje kreivės dalyje, kuriuo laiko momentu (kurioje metabolinė būseną) yra skaičiuojamas greitis nmol/ O/min. vienam mg mitochondrijų baltymo (12 pav.).



13 pav. Poliarogramos pavyzdys. Brūkšnine linija pažymėti priedų pridėjimo laikas arba perėjimas iš vienos mitochondrijų metabolinės būsenos į kitą.

$$V = \frac{T_{O_2} \times b}{a \times B} \quad (2.3)$$

kur T_{O_2} – deguonies tirpumas atitinkamoje temperaturoje (nmolO/ml, 37 °C temperatūroje naudotoje terpėje - 395 nmol O/ ml terpės), B – pridėtas mitochondrijų baltymo kiekis (mg), a – skalės dydis (cm), kai deguonies koncentracija keičiasi nuo 100 % iki 0 %, b – sunaudoto deguonies kiekis (t. y. atstumas (cm), kuriuo pasislinko savirašio plunksna per 1 min.).

2.7. Citrato sintazės aktyvumo nustatymas

Atšildome raumenų mitochondrijų mėginius nuo -20 °C iki 4 °C (laikyti inde su ledais). Po to kai mitochondrijų homogenatas tampa skystas, užrašyti (ant popieriaus ar į Excel failą) kiekvieno mėginio tūrį, tūčio nustatymui naudojame 200 μl pipetę.

Paruošiamas homogenizavimo buferis, kurio sudėtis: Tris-HCl (50 mM), EDTA (1 mM), EGTA (1 mM), Triton X-100 (10%), pH 7,5 bendras tūris 100ml. Buferis naudojamas tam, kad iš homogenizuotų raumenų mitochondrijų būtų išskirti fermentai. Paruoštą homogenizavimo buferį įpilti į mitochondrijų homogenatą (santykiu 1:1) ir atsargiai sumaišyti. Centrifuguoti 10 min. 10 000 rpm. Paėmus naujus Eppendorf mėgintuvėlius užrašome pelės duomenis ir nucentrifuguotą

supernatantą įpilmame į šiuos mėgintuvėlius. Nuosėdas užšaldome – 20 °C temperatūroje. Mėgintuvėliai viso eksperimento metu turi būti laikomi inde su ledais.

Citrato sintazės aktyvumas buvo nustatomas rinkinio pagalba (Sigma, Vokietija) reakcijos mišinyje, kurį sudaro į rinkinį įeinantis reakcijos buferis, 0,3 mM acetil-KoA, 0,1 mM 5',5'-ditiobis-(2-nitrobenzoinės rūgštis) (DTNB) ir 4 μl audinio homogenato arba mitochondrijų suspensijos (0,2 mg mitochondrijų baltymo/ml reakcijos mišinio). Paruošiamo 1 ml spektrofotometro kiuvetes kiekvienam bandiniui: 636 μl H₂O, 80 μl 0,1M DTNB, 20 μl 10% Triton X-100, 40 μl 10mM oksaloacetato. Po to įdėti 20 μl 12,2mM acetil-KoA ir 4 μl bandinio. Absorbicija registruojama 1,5 min. kas 5 s 30°C, esant 412 nm be oksaloacetato priedo (endogeninis aktyvumas) ir reakciją inicijavus 1 mM oksaloacetato.

Citrato sintazės aktyvumas homogenate skaičiuojamas pagal lygtį: Aktyvumas [$\mu\text{mol/ml/min}$]= $(\Delta A_{412}/\text{min} \cdot V \cdot \text{skied})/(\epsilon_{\text{mM}} \cdot L \cdot V_{\text{mėg}})$, kur V- reakcijos mišinio tūris, V_{mėg} – mėginio tūris, ϵ_{mM} – TNB ekstinkcijos koeficientas, esant 412 nm, lygus 13,6 mM⁻¹cm⁻¹. Aktyvumas mitochondrijų suspensijoje paskaičiuojamas $\mu\text{mol/mg baltymo/min}$.

2.8. Statistinė duomenų analizė

Darbe pateikiami 4 eksperimentų matavimų vidurkiai \pm standartinė paklaida. Kiekvieno eksperimento su tuo pačiu mitochondrijų preparatu vidurkiai gauti, atlikus mažiausiai 3 kiekvieno matavimo pakartojimus. Statistinis palyginimas atliktas SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., JAV), naudojant Stjudento t-testą. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

III. REZULTATAI

Tyrimo metu įvertinome kepenų ir raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičio antroje (II) ir trečioje (III) metabolinėse būsenose (atitinkamai V_2 ir V_3). Kvėpavimo greičiai buvo vertinami 12-14 savaičių kontrolinių (C57B6 linijos) patinų ir patelių bei kongeninių (B6A/Kjn linijos) patinų bei patelių izoliuotose skeleto raumenų ir kepenų mitochondrijose, joms oksiduojant piruvatą + malatą (5 mM + 5 mM), glutamatą + malatą (5 mM + 5 mM), palmitoilkarnitiną + malatą (0,05mM + 0,25 mM), sukcinatą + rotenoną (5 mM + 1 μ M). Palmitoilkarnitino poveikis ANT buvo vertinamas registruojant kvėpavimo greitį, mitochondrijoms oksiduojant glutamatą + malatą + palmitoilkarnitiną (5 mM + 5 mM + 0,05mM), piruvatą + malatą + palmitoilkarnitiną (5 mM + 5 mM + 0,05mM) ir jį lyginant su atitinkamų substratų oksidacija be palmitoilkarnitino, termostatu palaikant 37 °C matavimo terpės temperatūrą.

Mitochondrijų kvėpavimo greitis II metabolinėje būsenoje atsiranda dėl nespecifinio membranos laidumo protonams. Kvėpavimo grandinė palaiko pakankamą Δp , tačiau fosforilinimas nevyksta, nes nėra fosforilinimo substrato – ADP. III metabolinė būseną vadiname mitochondrijų būseną, kuriai būdingas maksimalus fosforilinimo greitis, pasiekiamas 1 mM ATP priedu. Kreatinfosfokinazė nuolat palaiko terpėje didelę ADP koncentraciją ir taip stimuliuoja maksimalų mitochondrijų kvėpavimą.

3.1. Kontrolinių ir kongeninių pelių citrato sintazės aktyvumo palyginimas

CS aktyvumo rezultatai patvirtina, kad abiejų lyčių kongeninėse pelėse, turinčiose citrato sintazę slopinančią mutaciją, CS aktyvumas yra sumažėjęs. Kongeniniuose patinuose šis aktyvumas sumažėjęs 35%, o kongeninėse patelėse – 25%, aktyvumą normalizuojant miligramui mitochondrijų baltymo. Ta pati tendencija išlieka ir išreiškiant CS aktyvumą SDH aktyvumo vienetui (4 lentelė).

4 lentelė. Kontrolinių ir kongeninių pelių raumenų mitochondrijų CS aktyvumas ir SDH aktyvumas. CS – citrato sintazė; SDH – sukcinato dehidrogenazė. Vidurkiai (n = 6) \pm standartinė paklaida.

Fermentas Pelė	CS aktyvumas (vienetai/mg)	SDH aktyvumas (vienetai/mg)	CS/SDH santykis
Kontrolinis patinas	858,4 \pm 103	10,9 \pm 2	92,4 \pm 17
Kongeninis patinas	653,4 \pm 86	11,8 \pm 1	60,4 \pm 15
Kontrolinė patelė	858,9 \pm 135	10,7 \pm 3	95,4 \pm 17
Kongeninė patelė	721,7 \pm 71	15,3 \pm 3	71,7 \pm 29

Atlikus eksperimentus, taikant daug riebalų turinčią dietą (Fokin, 2014 nepublikuoti duomenys), su mūšų tirtomis pelėmis paaiškėjo, kad kontrolinės pelės buvo linkusios į svorio priaugimą, o kongeninės – ne. Individai, kurie yra nutukę ar serga 2 tipo cukriniu diabetu, anot daugelių straipsnių autorių turi mitochondrijas, kurių funkcijos yra sutrikusios.

3.2. Skirtingų audinių (kepenų ir raumenų) kontrolinių ir kongeninių patinų ir patelių mitochondrijų kvėpavimo greičių II metabolinėje būsenoje (V₂) palyginimas

Kontrolinių ir kongeninių pelių patinų mitochondrijose buvo pastebėta, kad esant antrai metabolinei būsenai, kvėpavimo greičiai ženkliai skiriasi skirtinguose gyvūno audiniuose (kepenyse ir raumenyse). Kontrolinių pelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai antroje metabolinėje būsenoje (V₂) yra apie 2 – 6 kartus didesni nei kepenų mitochondrijų (9 ir 10 lentelės). Tokią pačią tendenciją matome ir tarp kongeninių pelių (B6A/Kjn) raumenų ir kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičių. Iš šių rezultatų galime spręsti, kad raumenų mitochondrijų membranos turi didesnį laidumą.

Tiek kontrolinių tiek kongeninių pelių patinų kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai oksiduojuojant parinktus substratus yra labai panašūs. Stebime skirtumus oksiduojuojant glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu. Kontrolinių patinų kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai mažesni nei kongeninių patinų oksiduojuojant šiuos substratus (5 lentelė).

5 lentelė. Kontrolinių ir kongeninių pelių patinų kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičių (V₂) (deguonies suvartojimas nmol O₂/min*mg baltymo) palyginimas. Paryškintos vertės žymi statistiškai patikimą skirtumą tarp kontrolės ir kongeninės pelės.

Pelė/substratas	G+M	P+M	M+PC	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinė	26,0	19,9	15,5	29,5	21,4	56,9
Kongeninė	26,4	19,9	18,1	32,2	23,4	54,8

Oksiduojuojant glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu kongeninių patinų mitochondrijų kvėpavimo greitis yra statistiškai patikimai didesnis nei kontrolinių patinų (6 lentelė). Karnitinas prisijungdamas riebalų rūgštis perneša jas į mitochondriją, susidaro KoA. Per vidinę mitochondrijų membraną riebalų rūgštys pernešamos karnitino palmitoiltransferazės I. Vėliau perneštos riebalų rūgštys dalyvauja β-oksidacijoje, kur galutinis produktas acetil-KoA dalyvauja Krebso cikle.

Sprendžiant iš kvėpavimo greičio antroje metabolinėje būsenoje, kongeninių patelių membranos yra laidesnės nei kontrolinių pelių.

6 lentelė. Kontrolinių ir kongeninių pelių patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičių (V_2) (nmol O /min*mg baltymo). Paryškintos vertės žymi statistiškai patikimą skirtumą tarp kontrolės ir kongeninės pelės.

Pelė/substratas	G+M	P+M	PC+M	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinė	63,9	70,7	25,8	72,2	69,8	123,4
Kongeninė	83,0	80,6	34,6	99,1	81,6	143,1

Ekperimentų rezultatai rodo, kad tarp kontrolinių ir kongeninių pelių patelių kepenų ir raumenų audinių antrojo metabolinio greičio skirtumai panašūs į patelių V_2 (7 ir 8 lentelės). Išsiskiria tik naudojant substratą piruvatą su malatu ir palmitoilkarnitinu, kontrolinių pelių V_2 yra didesnis nei kongeninių pelių (7 lentelė). Naudojant palmitoilkarnitiną kartu su substratais kvėpavimo greičiai padidėjo nežymiai.

7 lentelė. Kontrolinių ir kongeninių pelių patelių kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičių (V_2) (nmol O /min*mg baltymo). Paryškintos vertės žymi statistiškai patikimą skirtumą tarp kontrolinės ir kongeninės pelės.

Pelė/substratas	G+M	P+M	PC+M	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinė	27,3	21,0	18,8	32,2	25,6	46,7
Kongnienė	27,7	21,2	19,1	32,5	22,9	62,3

8 lentelė. Kontrolinių ir kongeninių pelių patelių raumenų mitochondrijų V_2 (nmol O /min*mg baltymo). Paryškintos vertės žymi statistiškai patikimą skirtumą tarp kontrolinės ir kongeninės pelės.

Pelė/substratas	G+M	P+M	PC+M	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinė	63,9	52,0	33,3	63,8	60,4	72,7
Kongeninė	85,0	79,9	34,5	90,5	73,1	117,6

Kongeninių pelių (B6A/Kjn) patelių raumenų II metabolinė būseną oksiduojant visus substratus yra didesnė nei kontrolinių (B6) pelių (8 lentelė). Kontrolinių patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai naudojant palmitoilkarnitiną su glutamata ir malatu šiek tiek sumažėjo, o oksiduojant piruvatą su malatu ir palmitoilkarnitinu padidėjo. Kongeninių patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai naudojant palmitoilkarnitiną su substratais sumažėjo, lyginant kai jis buvo nenaudojamas. Oksiduojant piruvatą su malatu bei sukcinatą su rotenonu kongeninių pelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai statistiškai patikimai didenssi nei kontrolinių pelių patelių (8 lentelė).

3.3. Kvėpavimo kontrolės indeksas

Norint sužinoti apie energijos sutrikimą izoliuotose mitochondrijose tai padaryti galima pasitelkiant, paprastą mitochondrijų kvėpavimo kontrolės santykio RCI (angl. *respiratory control index*, kvėpavimo kontrolės indeksas) įvertinimą (Brand ir Nicholls, 2011). Absoliučios kvėpavimo greičio vertės, esant skirtingoms būsenoms ir sąlygoms, bei kokybiniai protonvaros (PMF) matavimai gali paaiškinti mechanizmus, tačiau geriausias būdas įgyti praktinės įžvalgos yra vienu metu matuoti tiek kvėpavimo greitį, tiek ir PMF ir oksidacinio fosforilinimo skirtingų modulių kinetiką (Brand ir Nicholls, 2011). Didelis RCI reiškia, kad mitochondrijos turi didelį substrato oksidacijos pajėgumą ir ATP gamybą bei mažą nespecifinį membranos laidumą protonams. Tačiau tai nėra absoliutus rodiklis, kuris nurodo mitochondrijų funkcijų sutrikimą, nes vertės priklauso nuo substrato ir audinio. Mitochondrijų kvėpavimo kontrolė yra sudėtinga funkcija, kurios reikšmės priklauso nuo daugelio veiksnių, tačiau šis sudėtingumas ir yra vertingas: bet koks oksidacinio fosforilinimo pokytis pakeis RCI (Brand ir Nicholls, 2011).

Taigi kvėpavimo kontrolės indeksas yra vienas naudingiausių bendro pobūdžio priemonių, izoliuotų mitochondrijų funkcijoms įvertinti. Aukštas RCI rodo geresnę mitochondrijų oksidacinį pajėgumą, ir mažas RCI paprastai rodo prastesnę oksidacinį pajėgumą (Brand ir Nicholls, 2011).

9 lentelė. Patinų (kontrolinių ir kongeninių) kepenų mitochondrijų kvėpavimo kontrolės indeksai.

	G+M	P+M	PC+M	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinis	3,3	1,6	1,6	2,6	2,1	2,5
Kongeninis	3,2	1,4	1,5	2,6	2,3	2,1

10 lentelė. Patelių (kontrolinių ir kongeninių) kepenų mitochondrijų kvėpavimo kontrolės indeksai.

	G+M	P+M	PC+M	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinė	2,9	2,0	1,5	2,7	1,7	1,7
Kongeninė	2,8	1,9	2,0	2,5	2,2	2,1

11 lentelė. Patinų (kontrolinių ir kongeninių) raumenų mitochondrijų kvėpavimo kontrolės indeksai.

	G+M	P+M	PC+M	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinis	3,8	3,6	2,3	2,3	1,9	2,1
Kongeninis	3,5	3,0	1,2	2,5	1,7	1,7

12 lentelė. Patelių (kontrolinių ir kongeninių) raumenų mitochondrijų kvėpavimo kontrolės indeksai.

	G+M	P+M	PC+M	G+M+PC	P+M+PC	Succ+Ro
Kontrolinė	2,7	2,7	1,0	1,8	1,7	2,0
Kongeninė	2,5	2,7	1,0	1,8	1,6	2,1

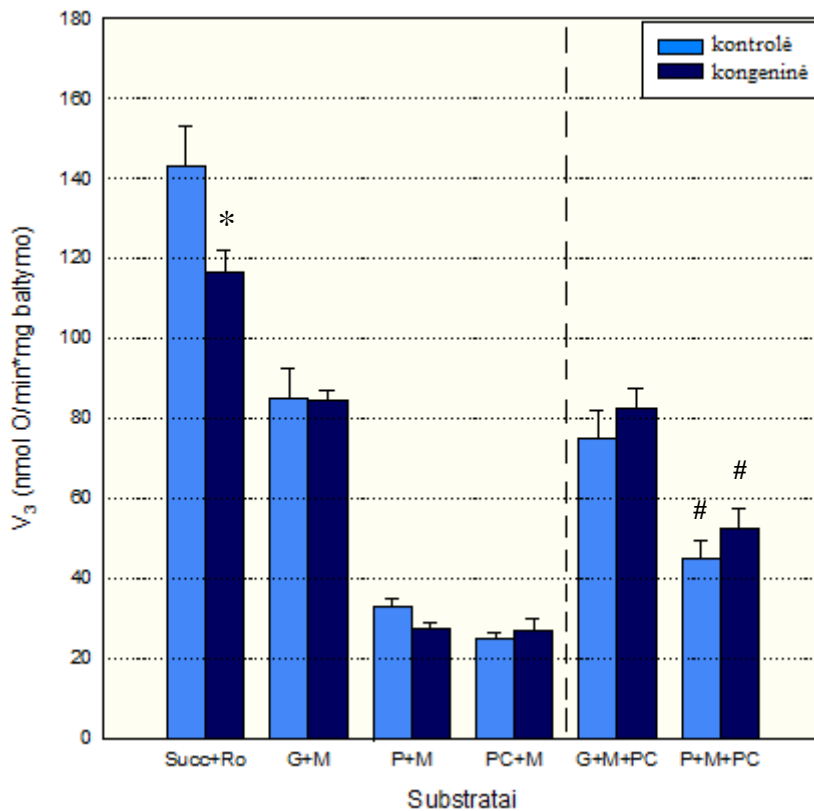
Šie rezultatai bus aptariami kituose skyriuose, kur vertinami kvėpavimo greičiai 3 metabolinėj būsenoj, skirtinguose audiniuose.

3.4. Kontrolinių ir kongeninių patinų kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičių III metabolinėje būsenoje (V₃) palyginimas

Tyrimo rezultatai su kontrolinių ir kongeninių pelių patinų kepenų mitochondrijomis rodo, kad didžiausi mitochondrijų greičiai yra naudojant sukcinatą ir slopiklį rotenoną (14 pav.). Oksiduojant šį substratą kongeninių pelių kvėpavimo greitis buvo mažesnis nei kontrolinių. Rotenonas yra I kvėpavimo grandinės komplekso slopiklis. Jis pridedamas norint išvengti sukcinato dehidrogenazės slopinimo susidariusiu oksaloacetatu. Nuslopinus I kvėpavimo grandinės kompleksą NADH priklausomos dehidrogenazės slopinamos dėl redukuoto NADH pertekliaus ir oksalo acetatas nesusidaro. Kvėpavimo grandinės substratas šiuo atveju yra FADH₂ ir elektronai pernešami II, III ir IV kvėpavimo grandinės kompleksais. Matome oksiduojant piruvatą su malatu bei sukcinatą, kontrolinių pelių mitochondrijų kvėpavimo greitis didesni nei kongeninių. Taip pat matome, kad mitochondrijų kvėpavimo greičiai statistiškai patikimai didesni oksiduojant piruvatą su malatu ir palmitoilkarnitinu nei jo nenaudojant 29 % – kontroliniuose patinuose ir 48 % kongeniniuose patinuose (14 pav.). Oksiduojant glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu kvėpavimo greitis sumažėjo lyginant kai jis nebuvo naudojamas (14 pav.). Glutamatas žinomas kaip būdingas kepenų substratas, jo kepenyse gausu.

Oksiduojant sukcinatą su rotenonu matome statistiškai patikimus skirtumus tarp kongeninių ir kontrolinių pelių. Kongeninių patinų mitochondrijų kvėpavimo greitis yra patikimai mažesnis 18 % nei kontrolinių pelių patinų.

Kvėpavimo kontrolės indekso (RCI) vertės, oksiduojant visus substratus, kontrolinių ir kongeninių pelių kepenų audinyje nesiskyrė (9 lentelė). Oksiduojant sukcinatą ya didžiausi skirtumai tarp kontrolinių ir kongeninių pelių RCI: 2,5 – kontroliniuose patinuose ir 2,1 – kongeniniuose patinuose. Oksiduojant kitus substratus kontrolinių ir kongeninių RCI buvo labai panašūs (9 lentelė).

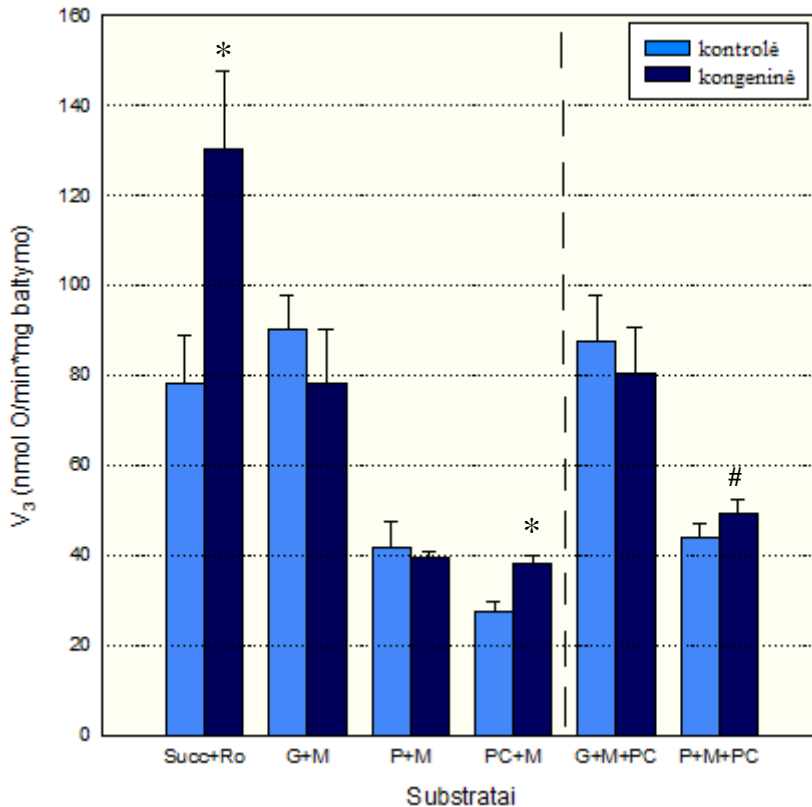


14 pav. Kontrolinių ir kongeninių pelių patinų kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: G+M – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), PC+M – palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), G+M+PC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), P+M+PC – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), Succ+Ro - sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiai (n = 8) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su kontrole, $p < 0,05$, # - statistiškai patikimas PC poveikis, $p < 0,05$.

3.5. Kontrolinių ir kongeninių patelių kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičių (V_3) palyginimas

Oksiduojant palmitoilkarnitiną su maltu ir sukcinatą su rotenonu mitochondrijų kvėpavimo greičiai statistiškai patikimai didesni kongeninių patelių lyginant su kontrolinėmis, 28 % ir 40 % atitinkamai. Kartu su substratais naudojant ir palmitoilkarnitiną nematome mitochondrijų V_3 sumažėjimo, priešingai, V_3 šiek tiek padidėjo (15 pav). Kongeninių patelių V_3 padidėjo apie 20 %, oksiduojant piruvatą su maltu ir palmitoilkarnitinu.

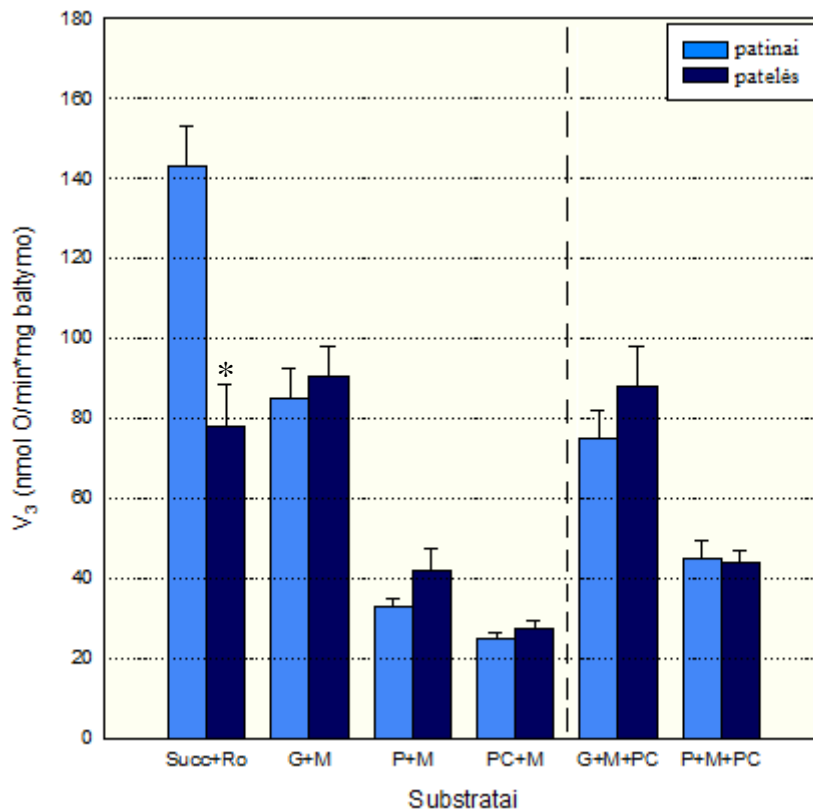
Kaip ir patinų kepenų mitochondrijose, taip ir patelių didelių RCI skirtumų tarp kontrolinės ir kongeninės grupių nematome. Oksiduojant palmitoilkarnitiną ir piruvatą su maltu ir palmitoilkarnitinu kongeninių patelių RCI didesni 0,5, o oksiduojant sukcinatą - 0,4, lyginant su kontrole (10 lentelė).



15 pav. Kontrolinių ir kongeninių pelių patelių kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: GM – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), PM – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), GMPC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), Succ+Ro - sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiai (n = 9) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su kontrole, p < 0,05, # - statistiškai patikimas PC poveikis, p < 0,05.

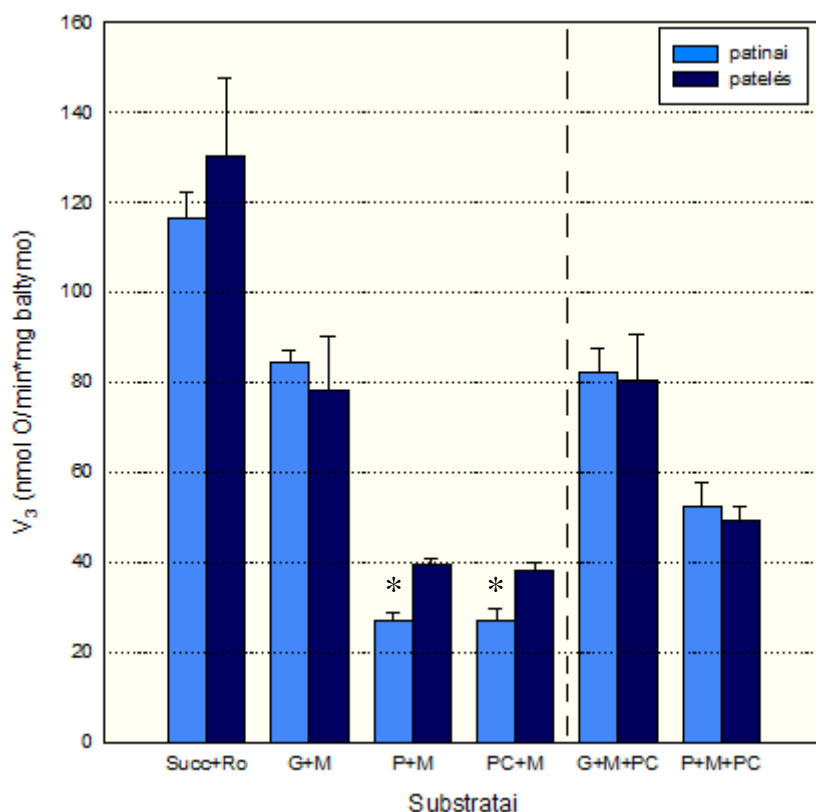
3.6. Lyties poveikis kontrolinių ir kongeninių pelių kepenų mitochondrijų funkcijoms

Oksiduojant sukcinatą su rotenonu kontrolinių patinų mitochondrijų V_3 yra statistiškai patikimai didesnis nei kontrolinių patelių 45 % (16 pav.). Su substratais naudojant palmitoilkarnitiną pastebime, kad mitochondrijų kvėpavimo greitis ne sumažėjęs, o priešingai net šiek tiek padidėjęs tiek patinų tiek patelių. Mūsų atliktų eksperimentų rezultatai rodo, kad palmitoilkarnitinas ANT neslopina. Priešingai nei mūsų rezultatai, ankščiau atlikti tyrimai rodo žiurkių kepenų mitochondrijų ANT slopinamą palmitoil-KoA, esant 5 μ M koncentracijai. Tiek oleoil-KoA tiek ir palmitoil-KoA slopina ANT ir neturi tiesioginio efekto kitiems oksidacinio fosforilinimo komponentams (Čiapaitė, 2007).



16 pav. Kontrolinių pelių patinų ir patelių kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: G+M – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), G+M+PC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), P+M+PC piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), Succ+Ro - sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiai (n = 8) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas tarp lyčių, p < 0,05.

Kongeninių patelių ir patinų rezultatuose nematome vienos vyraujančios tendencijos. Oksiduojant piruvatą su malatu, palmitoilkarnitiną su malatu kongeninių patelių mitochondrijų kvėpavimo greitis yra statistiškai patikimai didesni nei kongeninių patinų, 30 % ir 28 % atitinkamai (17 pav.). Kaip ir kontrolinių pelių kepenų audinyje, taip ir kongeninių pelių kartu su substratais naudojant palmitoilkarnitiną mitochondrijų kvėpavimo greičiai nesumažėjo, oksiduojant piruvatą su malatu ir palmitoilkarnitinu V_3 net padidėjo 48 % patinų ir 20 % patelių mitochondrijose. Didžiausias kvėpavimo greitis pastebimas oksiduojant sukcinatą su rotenonu. Inhibavus pirmąjį kvėpavimo kompleksą rotenonu, elektronai perduodami antrajam kvėpavimo grandinės kompleksui.



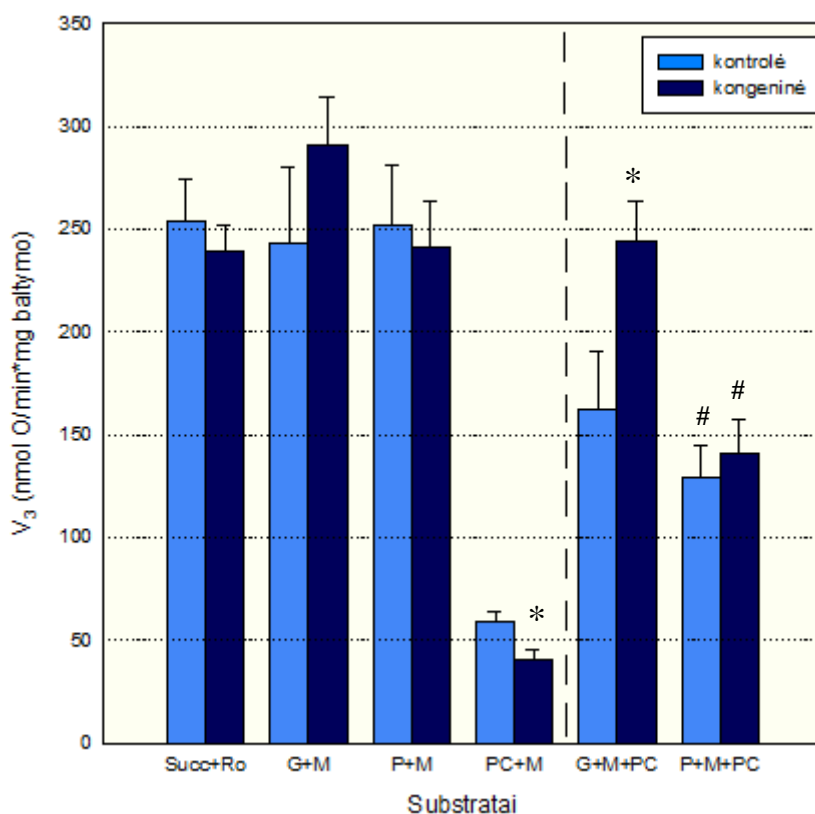
17 pav. Kongeninių pelių patinų ir patelių kepenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: G+M – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), PC+M palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), G+M+PC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), P+M+PC piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), Succ+Ro - sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiai (n = 8) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas tarp lyčių, p < 0,05.

3.7. Kontrolinių ir kongeninių patinų raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičių III metabolinėje būsenoje (V_3) palyginimas

Didžiausi kontrolinių ir kongeninių patinų raumenų mitochondrijų V_3 yra oksiduojant glutamatą su malatu bei piruvatą su malatu. Mažiausias V_3 yra mitochondrijoms oksiduojant palmitoilkarnitiną ir malatą, t. y., gaunant acetil-KoA per β -oksidaciją. Naudojant palmitoilkarnitiną su Krebso ciklo substratais raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai yra prislopinti lyginant su greičiais be palmitoilkarnitino. Oksiduojant palmitoilkarnitiną greitis buvo sumažėjęs, tiek kontrolinių tiek kongeninių patelių lyginant kai šis substratas nebuvo naudojamas (18 pav.). Oksiduojant glutamatą malatą ir palmitoilkarnitiną kontrolinių pelių patinų raumenų mitochondrijų kvėpavimo greitis sumažėjo 33 %, kongeninių pelių – 15 %. Esant substratui piruvatui su malatu ir palmitoilkarnitinu raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai statistiškai patikimai mažesni tiek kontrolinių tiek kongeninių patinų, atitinkamai – 48 % ir 41 %. Oksiduojant palmitoilkarnitiną su

malatu, kontrolinių pelių mitochondrijų V_3 yra statistiškai patikimai didesnis 32 % nei kongeninių. Taip pat esant substratui glutamatas su malatu ir palmitoilkarnitinu kongeninių pelių mitochondrijų V_3 yra statistiškai patikimai didesnis 33 % nei kontrolinių (18 pav.).

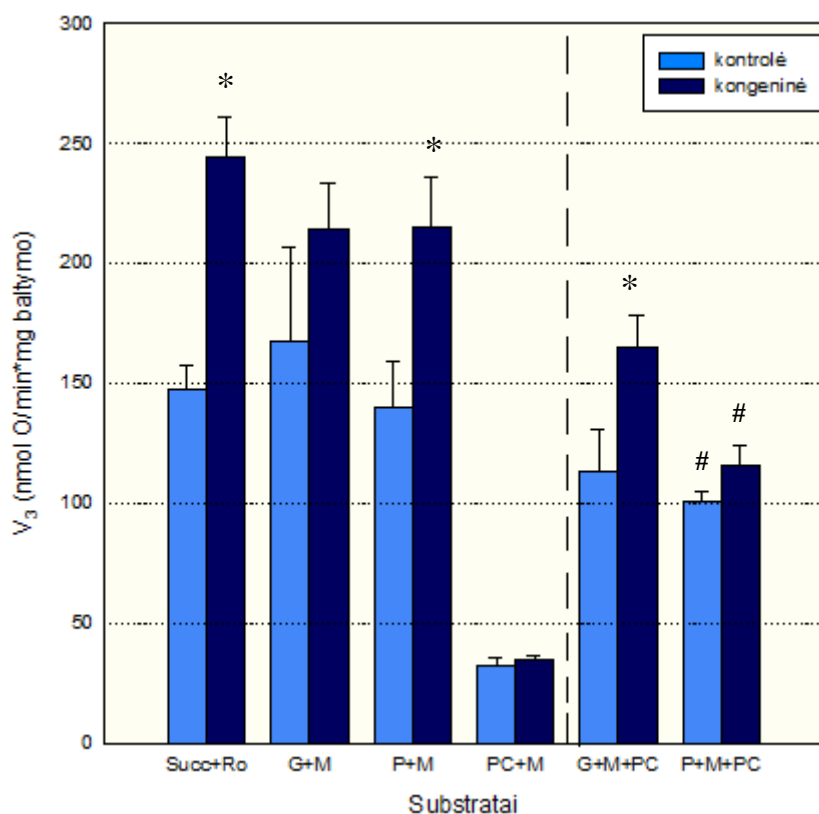
Kvėpavimo kontrolės indekso (RCI) vertės, oksiduoiant palmitoilkarnitiną ir malatą bei piruvatą ir malatą, tarp kontrolinių ir kongeninių pelių kepenų audinyje buvo pastebėti didesni, nei oksiduoiant kitus substratus skirtumai. Oksiduoiant palmitoilkarnitiną ir malatą RCI siekė 2,3 kontroliniuose patinuose ir 1,2 kongeniniuose patinuose. Oksiduoiant piruvatą ir malatą šis indeksas atitinkamai buvo 3,6 ir 3,0. Oksiduoiant kitus substratus šie indeksai buvo panašūs (6 lentelė). Iš RCI rezultatų matome, kad kongeninių pelių membranos laidumas yra šiek tiek didesnis, nei kontrolinių patinų. Tai reiškia, kad kontrolinių patinų mitochondrijos turi didesnę oksidacinę pajėgumą, ir gali susintetinti daugiau ATP.



18 pav. Kontrolinių ir kongeninių pelių patinų raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: G+M – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), PC+M palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), G+M+PC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), P+M+PC piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), Succ+Ro - sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiai (n = 8) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su kontrole, $p < 0,05$, # - statistiškai patikimas PC poveikis, $p < 0,05$.

3.8. Kontrolinių ir kongeninių patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičių III metabolinėje būsenoje (V_3) palyginimas

Tarp kontrolinių ir kongeninių patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičių matome viena tendenciją, kad oksiduojant visus substratus kongeninių pelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai yra didesni nei kontrolinių pelių (19 pav.). Oksiduojant substratus piruvatą su malatu, glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu, sukcinatą su rotenonu kongeninių pelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai yra statistiškai patikimai didesni 35 %, 31 % ir 39 % nei kontrolinių pelių (19 pav.).



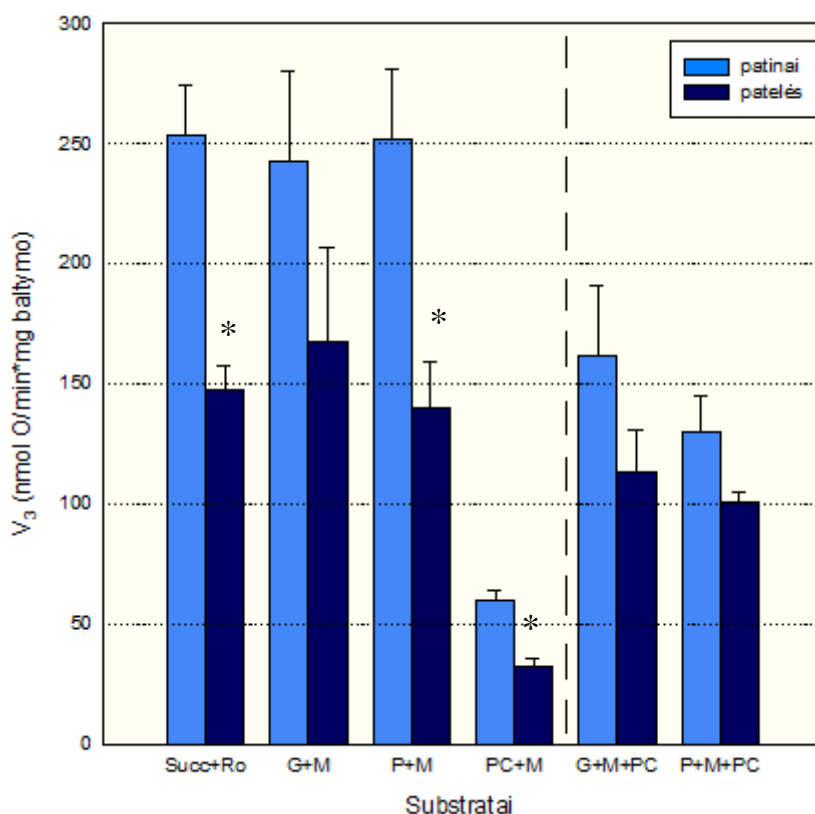
19 pav. Kontrolinių ir kongeninių pelių patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: G+M – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), PC+M – palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), GMPC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), P+M+PC – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), Succ+Ro - sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiai (n = 9) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas, lyginant su kontrole, $p < 0,05$, # - statistiškai patikimas PC poveikis, $p < 0,05$.

Kongeninių pelių V_3 didžiausi yra naudojant sukcinatą su rotenoną, kontrolinių pelių – oksiduojant glutamatą su malatu. Su substratais naudojant palmitoilkarnitiną matome ženklų V_3 sumažėjimą tiek su glutamatu ir malatu, tiek ir su piruvatu ir malatu. Šios tendencijos nematėme kepenų mitochondrijose. Kontrolinių patelių mitochondrijoms oksiduojant glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu V_3 sumažėjo 32 %, kongeninių V_3 sumažėjo 23 %. Raumenų mitochondrijų funkcijoms matome slopinantį palmitoilkarnitino poveikį, oksiduojant piruvatą su malatu ir

palmitoilkarnitinu, statistiškai patikimai mažesni V_3 greičiai kontrolinių patelių 27 %, o kongeninių – 46 %. Tarp kontrolinių ir kongeninių patelių raumenų RCI nematome didelių skirtumų (12 lentelė). Iš rezultatų matome, kad didėjant kvėpavimo greičiui trečioje ir antroje metabolinėse būsenose, RCI nekinta. Aukštas RCI rodo geresnį mitochondrijų oksidacinį pajėgumą.

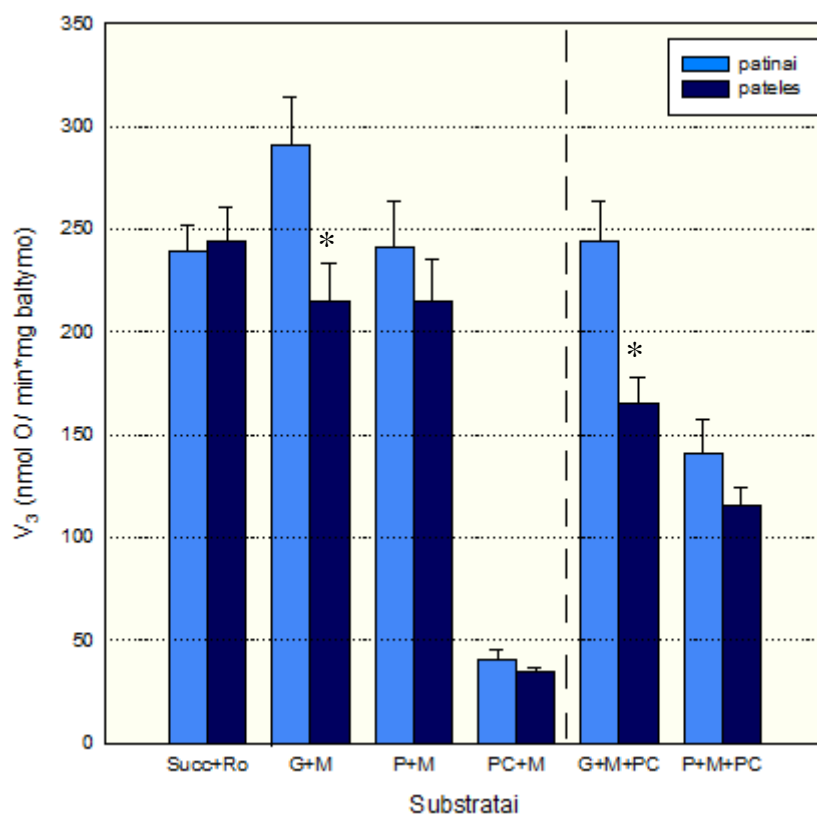
3.9. Lyties poveikis kontrolinių ir kongeninių pelių raumenų mitochondrijų funkcijoms

Kontrolinių patinų raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai oksiduojant visus substratus yra didesni nei kontrolinių patelių. Oksiduojant piruvatą su malatu, palmitoilkarnitiną su malatu ir sukcinatą su rotenonu, matome, kad kontrolinių patinų mitochondrijų kvėpavimo greičiai yra statistiškai patikimai didesni 44 %, 54 % ir 58 % už kontrolinių patelių (20 pav.).



20 pav. Kontrolinių pelių patinų ir patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: G+M – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), PC+M - palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), G+M+PC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), SuccRo – sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiai (n = 8) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas tarp lyčių, $p < 0,05$.

Kontrolinių pelių raumenų audinio mitochondrijoms oksiduojant substratus kartu su palmitoilkarnitinu matome sumažėjusius kvėpavimo greičius. Patinų V_3 , oksiduojant glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu, piruvatą su malatu ir palmitoilkarnitinu, sumažėjo atitinkamai 33 % ir 48 %, patelių V_3 sumažėjo atitinkamai 32 % ir 27 %. Skirtumai tarp kontrolinių patinų ir patelių, oksiduojant glutamatą ir malatą bei glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu, yra 31 % ir 30 %.



21 pav. Kongeninių pelių patinų ir patelių raumenų mitochondrijų kvėpavimo greičiai III metabolinėje būsenoje, esant skirtingiems substratams. Substratai: G+M – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM), P+M – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM), PC+M – palmitoilkarnitinas (5 μ M) ir malatas (0,25 mM), G+M+PC – glutamatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), P+M+PC – piruvatas (5 mM) ir malatas (5 mM) + palmitoilkarnitinas (5 μ M), Succ+Ro – sukcinatas (5 mM) ir rotenonas (1 μ M). Vidurkiaai (n = 8) \pm standartinė paklaida. * - statistiškai patikimas skirtumas tarp lyčių, p < 0,05.

Analizuojant kongeninių pelių rezultatus nepastebime tokių didelių skirtumų kaip su kontrolinių pelių raumenų audinio mitochondrijomis. Skirtumai tarp kongeninių patinų ir patelių yra mažesni, nei tarp kontrolinių. Oksiduojant glutamatą su malatu ir glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu kongeninių patinų mitochondrijų kvėpavimo greičiai statistiškai patikimai didesni 26 % ir 32 % nei kongeninių patelių (21 pav.). Kaip ir kontrolinių pelių, taip ir kongeninių pelių mitochondrijų kvėpavimo greičiai yra sumažėję su substratais naudojant palmitoilkarnitiną. Kongeninių patinų V_3 oksiduojant glutamatą su malatu ir palmitoilkarnitinu sumažėjęs – 15 %, patelių – 27 %.

oksiduojant piruvatą su malatu ir palmitoilkarnitinu – 41 %, patelių atitinkamai – 23 % ir 46 %. Oksiduojant sukcinatą patinų ir patelių V₃ nesiskiria.

Visi pasirinkti substratai oksiduojami Krebso cikle, susidarant kofermentams NADH ir FADH₂ bei GTP, kuris panaudojamas ATP sintezei substratinio fosforilavimo metu. Palmitoilkarnitinas yra pagrindinis β-oksidacijos substratas. Jis patenka į mitochondrijas karnitino-acilkarnitino translokazės pagalba ir virsta palmitoil-KoA. Skirtingai nuo daugelio kitų substratų, tokių kaip malato, glutamato, sukcinato, ar glicerol-3-fosfato, riebalų rūgščių β-oksidacijai reikia keturių fermentinių reakcijų (jose dalyvaujantys fermentai: Acil-KoA dehidrogenazė, 2-enoil-KoA hidratazė, L-3-hidroksiacil-KoA dehidrogenazė ir 3-ketoacil-KoA tiolazė) ir perduoda elektronus per jų transporto grandines: I kompleksu, ETFQOR (elektronų nešiklis flavoproteinas: ubichinono oskireduktazė) ir sudėtingu II kompleksu (susidarant sukcinatui Krebso cikle). Galutinis β-oksidacijos produktas, acetil-KoA, jungdamasis su oksalacetatu, veikiant citrato sintazei, sudaro citratą, kuris vėliau oksiduojamas trikarboksirūgščių cikle. (Perevoshchikova ir kt., 2013).

Mitochondrijos vaidina pagrindinį vaidmenį perduodant medžiagas ATP gamybai arba energijos kaupime riebalų pavidalu. Kai maisto suvartojimas yra didesnis nei reikia energijos organizmui, trikarboksirūgščių ciklas ir riebalų oksidacija sulėtėja, o riebalų rūgščių sintezė pagreitėja. Išaugus energijos poreikiui, daugiau citrato sunaudojama trikarboksirūgščių cikle ir mažiau išnešama į citozolį, kur dalyvauja riebalų rūgščių sintezėje (Rogge, 2009). Taigi mitochondrijų funkcijos gali būti siejamos su nutukimu. Iš tyrimo rezultatų matome, kad esant CS slopinančiai mutacijai, matome kongeninių pelių kvėpavimo greičių padidėjimus lyginant su kontrole. Tikimasi, kad nuslopinus šį fermentą turėtų kvėpavimo greičiai sumažėti. Šio efekto nematome, turbūt dėl to, kad mitochondrijos sugeba prisitaikyti prie šių pakitimų ir susintetina reikalingą ATP energijos kiekį. Galbūt užslopinus fermento veikimą, padidėja kitų fermentų raiška, kuri galėtų kompensuoti vieno fermento slopinimą ir palaikyti reikalingą mitochondrijų efektyvumą.

Nors mitochondrijos, izoliuotos iš sudėtingos ląstelės aplinkos, praranda kai kurias medžiagų apykaitos kontrolės sąnaudas, tačiau yra plačiai naudojamas modelis, kuris suteikia išsamų supratimą apie apykaitos reguliavimo mechanizmus, įskaitant tuos, kurie susiję su mitochondrijų ROS gamyba. Šios įžvalgos didina mūsų supratimą apie sudėtingesnes sistemas, tokias kaip sveikas ląsteles, audinius (Perevoshchikova ir kt., 2013).

IV. IŠVADOS

1. Kongeninių pelių citrato sintazės (CS) aktyvumas buvo 35% mažesnis patinų ir 25% patelių mitochondrijose lyginant su kontrole.
2. Kontrolinių patinų raumenų mitochondrijų V_3 yra didesni nei patelių, II komplekso aktyvumas bei β -oksidacija yra apie 50 % didesni nei patelių, o kongeninių patelių raumenų mitochondrijų V_3 yra didesni nei kontrolinių, kas, manoma, gali lemti mažesnę patinų ir kongeninių pelių polinkį į nutukimą. Kongeninių pelių raumenų mitochondrijų funkcijų lyčių skirtumai yra mažesni, nei kontrolinių.
Kepenų mitochondrijų funkcijų lyčių skirtumai pasireiškė didesniu kontrolinių patinų kepenų II komplekso aktyvumu ir kongeninių patelių piruvato oksidacija ir β -oksidacija. Mutacija sukėlė II komplekso aktyvumo sumažėjimą patinų ir padidėjimą patelių mitochondrijose (V_3 tapo vienodi) bei β -oksidacijos padidėjimą patelių mitochondrijose.
3. **Kepenų** mitochondrijose nebuvo pastebėtas žymus palmitoilkarnitino slopinantis poveikis ANT, o mitochondrijoms oksiduojant piruvatą, palmitoilkarnitinas netgi padidino V_3 . Palmitoilkarnitino slopinantis poveikis ANT buvo žymesnis **raumenų** mitochondrijose, visose tyrimo grupėse, slopinantis poveikis ANT buvo tiek kongeninėse patelėse tiek kongeniniuose patinuose patinuose.

V. LITERATŪRA

1. **Abumrad N.A., El-Maghrabi M.R., Amri E.Z., Lopez E., Grimaldi P.A.** Cloning of a rat adipocytemembrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268:17665–8, 1993;
2. **Bakker S.J., RG I.J., Teerlink T., Westerhoff H.V., Gans R.O., Heine R.J.** Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: The missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure? *Atherosclerosis* 148: 17 – 21, 2000;
3. **Bartlett K., Eaton S.**, Mitochondrial b-oxidation. *Eur. J. Biochem.* 271, 462–469, 2004;
4. **Bezair V, Bruce CR, Heigenhauser GJ, et al.** Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E509 – 15, 2006;
5. **Blomstrand E., Rådegran G., Saltin B.** Maximum rate of oxygen uptake by human skeletal muscle in relation to maximal activities of enzymes in the Krebs cycle. *J Physiol* 501: 455-460, 1997;
6. **Blouet C., Mariotti F., Azzout-Marniche D., Bos C., Mathe V., Tome D., Huneau J.F.** The reduced energy intake of rats fed a high-protein low-carbohydrate diet explains the lower fat deposition, but macronutrient substitution accounts for the improved glycemic control. *J Nutr* 136: 1849 – 1854, 2006;
7. **Bonen A., Chabowski A., Luiken J.J.F.P., Glatz J.F.** Is membrane transport of FFA mediated lipid. protein or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* 22: 15 – 29, 2007;
8. **Bonen A., Luiken J.J., Arumugam Y., Glatz J.F., Tandon N.N.** Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* 275: 14501–8, 2000;
9. **Borutaitė V., Mildažienė V., Ivanovienė L., Kholodenko B., Toleikis A., Praškevičius A.** The role of long-chain acyl-CoA in the damage of oxidative phosphorylation in heart mitochondria, *FEBS* 243; 2: 264 – 266, 1989;
10. **Boushel R., Gnaiger E., Schjerling P., Skovbro M., Kraunsøe R., Dela F.** Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle, *Diabetologia*, 50: 790 – 796, 2007;

11. **Borras C., Sastre J., Garcia-Sala D., Lloret A., Pallardo F.V., Vina J.** Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34: 546 – 552, 2003;
12. **Brand M.D., Nicholls D.G.** Assessing mitochondrial dysfunction in cells, *Biochem. J.* 435: 297 – 312, 2011;
13. **Burrage L.C., Baskin-Hill A.E., Sinasac D.S., Singer J.B., Croniger C.M., Kirby A., Kulbokas E.J., Daly M.J., Lander E.S., Broman K.W., Nadeau J.H.** Genetic resistance to diet-induced obesity in chromosome substitution strains of mice. *Mamm Genome* 21: 115 – 129, 2010;
14. **Cacicedo J.M., Benjachareonwong S., Chou E., Yagihashi N., Ruderman N.B., Ido Y.** Activation of AMP-activated protein kinase prevents lipotoxicity in retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 52, 6: 3630 – 3639, 2011;
15. **Campbell S.E., Tandon N.N., Woldegiorgis G., Luiken J.J., Glatz J.F., Bonen A.** A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279: 36235 – 41, 2004;
16. **Català-Niell A., Estrany M.E., Proenza A.M., Gianotti M., Lladó I.** Skeletal Muscle and Liver Oxidative Metabolism in Response to a Voluntary Isocaloric Intake of a High Fat Diet in Male and Female Rats. *Cell Physiol Biochem* 22: 327 – 336, 2008;
17. **Christe M., Hirzel E., Lindinger A., Kern B., von Flüe M., Peterli R., Peters T., Eberle A.N., Lindinger P.W.** Obesity Affects Mitochondrial Citrate Synthase in Human Omental Adipose Tissue. *ISRN Obesity, Clinical Study*, 8, 2013;
18. **Chua B.H., Shrago E.** Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation by long chain acyl-CoA esters in bovine heart mitochondria and inverted submitochondrial particles. Comparison with atractylate and bongkreikic acid. *J. Biol. Chem.* 252: 6711 – 6714, 1977;
19. **Coatmellec-Taglioni G., Dausse J.P., Giudicelli Y., Ribiere C.** Sexual dimorphism in cafeteria diet-induced hypertension is associated with gender-related difference in renal leptin receptor down-regulation. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 305: 362 – 367, 2003;
20. **Cole M.A., Murray A.J., Cochlin L.E., Heather L.C., McAleese S., Knight N.S., Sutton E., Jamil A.A., Parassol N., Clarke K.** A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 106: 447 – 457, 2011;
21. **Colom B., Alcolea M.P., Valle A., Oliver J., Roca P, Garcia-Palmer F.J.** Skeletal muscle of female rats exhibit higher mitochondrial mass and oxidative phosphorylative capacities compared to males. *Cell Physiol. Biochem.* 19: 205 – 212, 2007;

22. **Colom B., Oliver J., Roca P., Garcia-Palmer F.J.** Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H₂O₂ production and oxidative damage. *Cardiovasc Res* 74: 456 – 465, 2007;
23. **Čapková M., Houštěk J., Hansíková H., Hainer V., Kunešová M., Zeman J.**, Activities of cytochrome c oxidase and citrate synthase in lymphocytes of obese and normal-weight subjects, *International Journal of Obesity*, 26, 8, 1110 – 1117, 2002;
24. **Čiapaitė J.** Doktoro disertacija. Obesity and type 2 diabetes: a systems biology perspective of a molecular mechanism, Kaunas, 165: 42 – 43, 2007;
25. **Dalziel A.C., Moore S.E., Moyes C.D.** Mitochondrial enzyme content in the muscles of high-performance fish: evolution and variation among fiber types. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R163 – R172, 2005;
26. **Drahota Z., Milerová M., Stieglerová A., Houštěk J., Ostádal B.**, Developmental changes of cytochrome c oxidase and citrate synthase in rat heart homogenate, *Physiological Research* 53, 1, 119 – 122, 2004;
27. **Eaton S.**, Control of mitochondrial b-oxidation flux. *Prog. Lipid. Res.* 41, 197 – 239, 2002;
28. **Fritz I.B.** *Perspect. Biol. Med.* 10, 643 – 677, 1967;
29. **Frøsig C., Roepstorff C., Brandt N., Maarbjerg S.J., Birk J.B., Wojtaszewski J.F., Richter E.A., Kiens B.** Reduced malonyl-CoA content in recovery from exercise correlates with improved insulin-stimulated glucose uptake in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E787 – E795, 2009;
30. **Gaster M., Beck-Nielsen H.**, The reduced insulin mediated glucose oxidation in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects may be of genetic origin—evidence from cultured myotubes, *Biochim. Biophys. Acta* 1690; 85 – 91, 2004;
31. **Goldenthal M.J., Marín-García J.** Mitochondrial signaling pathways: A receiver/integrator organelle. *Molecular and Cellular Biochemistry* 262:1 – 16, 2004;
32. **Gómez-Pérez Y., Amengual-Cladera E., Català-Niell A., Thomàs-Moyà E., Gianotti M., Proenza A.M., Lladó I.** Gender Dimorphism in High-Fat-Diet-Induced Insulin Resistance in Skeletal Muscle of Aged Rats. *Cell Physiol Biochem* 22: 539 – 548, 2008;
33. **Gonzalez-Franquesa A., De Nigris V., Lerin C., Garcia-Roves P.M.** Skeletal Muscle Mitochondrial Function/Dysfunction and Type 2 Diabetes, Chapter 12, 2012.
34. **Goodpaster B.H., He J., Watkins S., Kelley D.E.**, Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86; 5755 – 5761, 2001;
35. **Gornal A.G., Bardawill C.J., David M.M.** Determination of serum protein by means of the burette reaction. *J Biol Chem*, 177: 751 – 766, 1949;

36. **Han D.H., Hancock C., Jung S.R., Holloszy J.O.** Is “fat-induced” muscle insulin resistance rapidly reversible? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E236 – E241, 2009;
37. **He J., Watkins S., Kelley D.E.,** Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* 50; 817 – 823, 2001;
38. **Heldt H.D., Klingenberg M.** *Eur. J. Biochem.* 4, 1±8, 1968;
39. **Hojlund K., Wrzesinski K., Larsen P.M., Fey S.J., Roepstorff P., Handberg A., Dela F., Vinten J., McCormack J.G., Reynet C., Beck-Nielsen H.** Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta-subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes, *J. Biol. Chem* 278,10436 – 10442, 2003;
40. **Holloszy J.O., Booth F.W.** Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. *Annu Rev Physiol* 38: 273 – 291, 1976;
41. **Holloszy J.O., Oscai L.B., Don I.J., Mole P.A.** Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 40: 1368 – 1373, 1970;
42. **Holloway G.P., Bezaire V., Heigenhauser G.J., et al.** Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J Physiol* 571:201 – 10, 2006;
43. **Horton T.J., Gayles E.C., Prach P.A., Koppenhafer T.A., Pagliassotti M.J.** Female rats do not develop sucrose induced insulin resistance. *Am J Physiol* 272: R1571 – 1576, 1997;
44. **Houmard J.A.** Intramuscular lipid oxidation and obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 294 :R1111 – 1116, 2008;
45. **Jeukendrup A.E.** Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann N Y Acad Sci* 967: 217-235, 2002;
46. **Justo R., Boada J., Frontera M., Oliver J., Bermudez J., Gianotti M.** Gender dimorphism in rat liver mitochondrial oxidative metabolism and biogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C372 – 378, 2005;
47. **Kadziauskas J.** Biochemijos pagrindai: bendrasis vadovėlis. Vilniaus universitetas, 9skyrius, 359 – 365, 2012.
48. **Kelley D.E., He J., Menshikova E.V., Ritov V.B.** Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51; 2944 – 2950, 2002;
49. **Kholodenko B., Zilinskiene V., Borutaite V., Ivanoviene L., Toleikis A., Praskevicius A.,** The role of adenine nucleotide translocator in regulation of oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *FEBS Letters*, 233 – 247, 1987;
50. **Kiens B.** Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev* 86: 205 – 243, 2006;

51. **Kim E.H., Eun Hee Koh, Park Joong-Yeol, Lee Ki-Up.** Adenine Nucleotide Translocator as a Regulator of Mitochondrial Function: Implication in the Pathogenesis of Metabolic Syndrome. *Korean Diabetes J*, 34:146 – 153, 2010;
52. **Kim J.Y., Hickner R.C., Cortright R.L., Dohm G.L., Houmard J.A.,** Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.* 279; E1039 – E1044, 2000;
53. **Kim J.A., Wei Y., Sowers J.R.** Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance *Circ Res.* 102:401 – 414, 2008;
54. **Klingenberg M.,** The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier, *Biochimica et Biophysica Acta* 1778; 1978 – 2021, 2008;
55. **Koves T.R., Ussher J.R., Noland R.C., Slentz D., Mosedale M., Ilkayeva O., Bain J., Stevens R., Dyck J.R., Newgard C.B., Lopaschuk G.D., Muoio D.M.** Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7:45 – 56, 2008;
56. **Kraegen E.W., Saha A.K., Preston E., Wilks D., Hoy A.J., Cooney G.J., Ruderman N.B.** Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E471 – 479, 2006;
57. **Kus V., Prazak T., Brauner P., Hensler M., Kuda O., Flachs P., Janovska P., Medrikova D., Rossmeisl M., Jilkova Z., Stefl B., Pastalkova E., Drahota Z., Houstek J., Kopecky J.** Induction of muscle thermogenesis by high-fat diet in mice: association with obesity-resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E356 – E367, 2008;
58. **Leibowitz S.F., Alexander J., Dourmashkin J.T., Hill J.O., Gayles E.C., Chang G.Q.** Phenotypic profile of SWR/J and A/J mice compared to control strains: possible mechanisms underlying resistance to obesity on a high-fat diet. *Brain Res* 1047, 2:137 – 47, 2005;
59. **Lemasters J.J., Sowers A. E.** *J. Biol. Chem.* 254, 1248 ± 1251, 1979;
60. **Lerner E., Shug A.L., Elson C., Shrago E.,** Reversible inhibition of adenine nucleotide translocation by long chain fatty acyl coenzyme A esters in liver mitochondria of diabetic and hibernating animals. *J. Biol. Chem.* 247; 1513 – 1519, 1972;
61. **Lewis G.F., Uffelman K.D., Szeto L.W., Weller B., Steiner G.** Interaction between free fatty acids and insulin in the acute control of very low density lipoprotein production in humans. *J Clin Invest* 95: 158 – 166, 1995;
62. **Lionetti L., Mollica M.P., Crescenzo R., D'Andrea E., Ferraro M., Bianco F., Liverini G., Iossa S.** Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis. *Int J Obes (Lond)* 31: 1596 – 1604, 2007;

63. **Llado I., Rodriguez-Cuenca S., Pujol E., Monjo M., Estrany M.E., Roca P., Palou A.** Gender effects on adrenergic receptor expression and lipolysis in white adipose tissue of rats. *Obes Res* 10: 296 – 305, 2002;
64. **Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D.L., Jaswal J.S., Stanley W.C.** Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90: 207 – 258, 2010;
65. **Luscombe-Marsh N.D., Noakes M., Wittert G.A., Keogh J.B., Foster P., Clifton P.M.** Carbohydrate-restricted diets high in either monounsaturated fat or protein are equally effective at promoting fat loss and improving blood lipids. *Am J Clin Nutr* 81: 762 – 772, 2005;
66. **Lunenfeld B.** The Aging Male. *Aging Male* 5, 2, 73, 2002;
67. **May R.C.** Gender, immunity and the regulation of longevity. *Bioessays* 29, 8: 795 – 802, 2007;
68. **Marin-Garcia J., Ananthakrishnan R., Goldenthal M. J.,** Human mitochondrial function during cardiac growth and development. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 179, 1-2, 21–26, 1998;
69. **Martin D.B., Vagelos P.R.,** *J. Biol. Chem.*, 237,1797, 1962;
70. **McGarry J.D.,** Travels with carnitine palmitoyltransferase I: from liver to germ cell with stops in between. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 241 – 245, 2001;
71. **McGarry J.D., Foster D.W.** Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.* 49, 395 – 420, 1980;
72. **Muoio D.M, Koves T.R.** Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 874 – 883, 2007;
73. **Noland R.C., Koves T.R., Seiler S.E., Lum H., Lust R.M., Ilkayeva O., Stevens R.D., Hegardt F.G., Muoio D.M.** Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem* 284: 22840 – 22852, 2009;
74. **Olson M.S. ir Williamson J.R.** Regulation of Citrate Synthesis in Isolated Rat Liver Mitochondria. *The journal of biological chemistry*, 246, 24: 7794 – 7803, 1971;
75. **Ørtenblada N., Mogensena M., Petersenb I., Højlundb K., Levinb K., Sahlina K., Beck-Nielsenb H., Gaster M.,** Reduced insulin-mediated citrate synthase activity in cultured skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes: Evidence for an intrinsic oxidative enzyme defect. *Biochimica et Biophysica Acta* 1741; 206 – 214, 2005;
76. **Pamplona R., Barja G.** Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: Two key traits of longevity. *Ageing Res Rev* 6: 189 – 210, 2007;

77. **Pande S.V.** *Proc. Natl. Acad. Sci. G. S.A.* 72, 83 – 87, 1975;
78. **Pande S.V., Blanchaer M.C.**, Reversible inhibition of mitochondrial adenosine diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A esters. *J. Biol. Chem.* 246; 402 – 411, 1971;
79. **Panov A.V., Konstant Y.M., Lyakhovich V.V., Kaznacle V.P.**, Possible role of palmitoyl CoA in regulation of ANT in mitochondria under different metabolic states. 1. Comparison of liver mitochondria from starved and fed rats. *J. Bioenerg.* 7; 75 – 85, 1975;
80. **Parmeggiani A., and Bowman R.H.** *Biochem. Biophys. Res. Commun* 12, 268, 1963;
81. **Passonneau V.J., and Lowry O.H.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 13, 372, 1963;
82. **Patti M.E., Butte A.J., Crunkhorn S., Cusi K., Berria R., Kashyap S., Miyazaki Y., Kohane I., Costello M., Saccone R., Landaker E.J., Goldfine A.B., Mun E., DeFronzo R., Finlayson J., Kahn C.R., Mandarino L.J.** Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100; 8466 – 8471, 2003;
83. **Patil P.B., Minter S.D., Mielke A.A., Lewis L.R., Casmaer C.A., Barrientos E.J., Ju J.S., Smith J.L., Fisher J.S.** Malonyl coenzyme A affects insulin-stimulated glucose transport in myotubes. *Arch Physiol Biochem* 113: 13 – 24, 2007;
84. **Perevoshchikova I.V., Quinlan C.L., Orr A.L., Gerencser A.A., Brand M.D.** Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 12, 2013;
85. **Petersen K.F., Befroy D., Dufour S., Dziura J., Ariyan C., Rothman D.L., DiPietro L., Cline G.W., Shulman G.I.** Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 300: 1140–1142, 2003;
86. **Pichon L., Huneau J.F., Fromentin G., Tome D.** A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. *J Nutr* 136: 1256 – 1260, 2006;
87. **Rabøl R., Boushel R., Dela F.** Mitochondrial oxidative function and type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab* 31: 675 – 683, 2006;
88. **Ramsay, R.R., Tubbs, P.D.** *FEBS Lett.* 54, 21 – 25, 1975;
89. **Randle P.J., Garland P.B., Hales C.N., Newsholme E.A.** The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1, 785 – 9, 1963;
90. **Ratkevicius A., Carroll A.M., Kilikevicius A., Venckunas T., McDermott K.T., Gray S.R., Wackerhage H., Lionikas A.** H55N polymorphism as a likely cause of variation in citrate synthase activity of mouse skeletal muscle. *Physiol Genomics* 42A, 2: 96 – 102, 2010;

91. **Richter E.A., Ruderman N.B.** AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J* 418: 261 – 275, 2009;
92. **Ruderman N.B., Saha A.K., Vavvas D., Witters L.A.** Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol* 276: E1 – 18, 1999;
93. **Sakamoto J., Barr R.L., Kavanagh K.M., Lopaschuk G.D.** Contribution of malonyl-CoA decarboxylase to the high fatty acid oxidation rates seen in the diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1196 – H1204, 2000;
94. **Saha A.K., Laybutt D.R., Dean D., Vavvas D., Sebokova E., Ellis B., Klimes I., Kraegen E.W., Shafrir E., Ruderman N.B.** Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am J Physiol* 276: E1030 – 1037, 1999;
95. **Schrauwen P., Hesselink Matthijs K.C.** Oxidative Capacity, Lipotoxicity, and Mitochondrial Damage in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 53, 2004;
96. **Schaffer J.E., Lodish H.F.** Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79:427 – 36, 1994;
97. **Scholte H.R.** The separation and enzymatic characterization of inner and outer membranes of rat-heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 330, 3: 283 – 93, 1973;
98. **Schulz H.** Oxidation of fatty acids in eukaryotes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (5th Edition)*, 131 – 154 (Vance D.E. ir Vance J. (eds.), Amsterdam) 2008;
99. **Shao H., Burrage L.C., Sinasac D.S., Hill A.E., Ernest S.R., O'Brien W., Courtland H.W., Jepsen K.J., Kirby A., Kulbokas E.J., Daly M.J., Broman K.W., Lander E.S., Nadeau J.H.** Genetic architecture of complex traits: large phenotypic effects and pervasive epistasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 19910 – 19914, 2008;
100. **Shrago E., Woldegiorgis A.E., DiRusso C.C.** *Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids* 52, 163 ± 166, 1995;
101. **Shug A.L., Lerner E., Elson C., Shrago E.** The inhibition of adenine nucleotide translocase activity by oleoyl CoA and its reversal in rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43; 557 – 563, 1971;
102. **Shug A.L., Lerner E., Elson C., Shrago E.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 557 ± 563, 1971;
103. **Simoneau J.A., Colberg S.R., Thaete F.L., Kelley D.E.** Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *FASEB J.* 9; 273 – 278, 1995;
104. **Simoneau J.A., Kelley D.E.** Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J. Appl. Physiol.* 83; 166 – 171, 1997;

105. **Simoneau J.A., Veerkamp J.H., Turcotte L.P., Kelley D.E.**, Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J.* 13; 2051 – 2060, 1999;
106. **Singer J.B., Hill A.E., Burrage L.C., Olszens K.R., Song J., Justice M., O'Brien W.E., Conti D.V., Witte J.S., Lander E.S., Nadeau J.H.** Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice. *Science* 304: 445 – 448, 2004;
107. **Skurvydas A., Brazaitis M., Venckunas T., Kamandulis S., Stanislovaitis A., Zuoza A.** The effect of sports specialization on musculus quadriceps function after exercise-induced muscle damage. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 36:1 – 8, 2011;
108. **Smith C.M., Williamson J.R.** Inhibition of citrate synthase by succinyl-CoA and other metabolites. *FEBS Lett* 18: 35 – 38, 1971;
109. **Spina R.J., Chi M.M.Y., Hopkins M.G., Nemeth P.M., Lowry O.H., Holloszy J.O.** Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7–10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol* 80: 2250 – 2254, 1996;
110. **Srere P.A.**, *Nature*, 206,766, 1965;
111. **Stannard S.R., Johnson N.A.** Insulin resistance and elevated triglyceride in muscle: More important for survival than “thrifty” genes? *J Physiol* 554: 595 – 607, 2004;
112. **Stremmel W., Lotz G., Strohmeyer G., Berk P.D.** Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest* 75:1068 – 76, 1985;
113. **Strehlow K., Rotter S., Wassmann S., Adam O., Grohe C., Laufs K., Bohm M., Nickenig G.** Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 93: 170 – 177, 2003;
114. **Stump C.S., Short K.R., Bigelow M.L., Schimke J.M., Nair K.S.** Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100; 7996 – 8001, 2003;
115. **Szczepaniak L. S., Dobbins R. L., Metzger G. J., Sartoni D'Ambrosia G., Arbique D., Vongpatanasin W., Unger R., Victor R. G.** Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med* 49: 417 – 423, 2003;
116. **Terauchi Y., Takamoto I., Kubota N., Matsui J., Suzuki R., Komeda K., Hara A., Toyoda Y., Miwa I., Aizawa S., Tsutsumi S., Tsubamoto Y., Hashimoto S., Eto K., Nakamura A., Noda M., Tobe K., Aburatani H., Nagai R., Kadowaki T.** Glucokinase and irs-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:246 – 257, 2007;

117. **Thomas-Moya E., Gianotti M., Proenza A.M., Llado I.** Paraoxonase 1 response to a high-fat diet: Gender differences in the factors involved. *Mol Med* 13: 203 – 209, 2007;
118. **Valle A., Guevara R., Garcia-Palmer F.J., Roca P., Oliver J.** Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1302 – 1308, 2007;
119. **Venckunas T.** Citrate synthase as a target in treatment of obesity and diabetes. *EFSD New Horizons Initiative*, 2012.
120. **Ventura F.V., Tavares de Almeida I., Wanders R. J.A.** Inhibition of adenine nucleotide transport in rat liver mitochondria by long-chain acyl-coenzyme A β -oxidation intermediates. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352, 873 – 878, 2007;
121. **Vieira V. J., Valentine R. J.** Mitochondrial biogenesis in adipose tissue: can exercise make fat cells ‘fit’? *Journal of Physiology*, 587, 14, 3427 – 3428, 2009;
122. **Vina J., Sastre J., Pallardo F.V., Borrás C.** Mitochondrial theory of aging: Importance to explain why females live longer than males. *Antioxid Redox Signal* 5: 549 – 556, 2003;
123. **Vina J., Borrás C., Gambini J., Sastre J., Pallardo F.V.** Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett* 579 12: 2541 – 2545, 2005;
124. **Vina J., Sastre J., Pallardo F.V., Gambini J., Borrás C.** Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders: protective effect of estrogens. *Free Radical Res.* 40 (12), 1359 – 1365, 2006;
125. **Wakil S.J., Abu-Elheiga L.A.** Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J Lipid Res* 50, Suppl S138 – S143, 2009;
126. **Wang Q., Jiang L., Wang J., Li S., Yu Y., You J., Zeng R., Gao X., Rui L., Li W., Liu Y.** Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology* 49 4: 1166 – 1175, 2009;
127. **Watson J. A., Lowenstein J.M.** *J. Biol. Chem.*, 246, 5993, 1970;
128. **Wilmoth J.R., Deegan L.J., Lundstrom H., Horiuchi S.** Increase of maximum life-span in Sweden, 1861-1999. *Science* 289 5488, 2366 – 2368, 2000;
129. **Woldegiorgis G., Yousufzai S. Y. K., Shrago E.** *J. Biol. Chem.* 257, 14783±14787, 1982;
130. **Zheng J., Ramirez V.D.** Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *British Journal of Pharmacology* 130, 1115 – 1123, 2000;
131. **Žukienė R.** Doktoro disertacija: Hipertermijos poveikio mitochondrijų oksidacinio fosforilavimo sistemai tyrimas. Kaunas, 87: 15 – 30, 2008.

Padēka

Dēkoju savo darbo vadovei doc. dr. Rasai Žūkienei už suteiktas žinias, rūpestį, malonų bendravimą, patarimus, pagalbą rašant baigiamąjį darbą. Taip pat dėkoju Andrėj Fokin už pagalbą atliekant eksperimentus, apdorojant rezultatus.

Tyrimas “Citrate synthase as a target in treatment of obesity and diabetes”, iš dalies finansuotas EFSD (European Foundation for the Study of Diabetes) (Koordinatorius - LSU, partneris - Aberdyno universitetas, Dižioji Britanija, VDU).