

Митохондриальная нейропротекция при болезни Альцгеймера, опосредованная применением глицитеина, в эксперименте

Д.И. Поздняков

Mitochondrial neuroprotection in Alzheimer's disease, mediated by the glycitein administration, in an experiment

D.I. Pozdnyakov

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, митохондриальная дисфункция, изофлавоны, глицитеин

Резюме

Митохондриальная нейропротекция при болезни Альцгеймера, опосредованная применением глицитеина, в эксперименте

Д.И. Поздняков

Увеличение заболеваемости и тяжести течения болезни Альцгеймера определяют необходимость поиска новых путей лечения данной патологии, среди которых особо выделяют нейропротекторную терапию. Потенциально эффективным нейропротекторным средством может являться изофлавоноид – глицитеин.

Материал и методы. Исследование выполнено на годовалых крысах-самцах линии Wistar, которым моделировали спорадическую форму болезни Альцгеймера путем инъекции фрагментов β -амилоида (1-42) в СА1 часть гиппокампа. Глицитеин и препарат сравнения этилметилгидроксипиридина сукцинат вводили перорально на протяжении 60 дней с момента моделирования патологии. По истечении указанного времени у крыс производили забор гиппокампа, в ткани которого определяли активность ферментов: сукцинатдегидрогеназы, цитратсинтазы и аконитазы. Также оценивали изменение концентрации апоптоз-индуцирующего фактора и фактора некроза опухоли α .

Результаты. Было установлено, что пероральное курсовое введение глицитеина в дозе 100 мг/кг повышало активность ферментов сукцинатдегидрогеназы, аконитазы и цитратсинтазы в ткани гиппокампа на 118,2%, 39,4% и 73,3% ($p < 0,05$) относительно нелеченых животных. Также при применении глицитеина в указанной дозе наблюдалось уменьшение концентрации апоптоз-индуцирующего фактора – на 28,2% ($p < 0,05$) и фактора некроза опухоли α – на 26,5% ($p < 0,05$). При этом по уровню эффективности глицитеин в дозе 100 мг/кг был сопоставим с референс-препаратом. Также необходимо подчеркнуть, что введение низких (25 мг/кг и 50 мг/кг) и высоких (200 мг/кг) доз глицитеина не вызывало повышения терапевтических преимуществ по сравнению с вариантом дозирования 100 мг/кг.

Выводы. Курсовое применение глицитеина в дозе 100 мг/кг при экспериментальной болезни Аль-

цгеймера восстанавливает митохондриальную функцию, что подтверждается повышением активности цитратсинтазы, сукцинатдегидрогеназы и аконитазы. Также введение глицитеина подавляло реакции апоптоза в сопоставимой степени с этилметилгидроксипиридина сукцинатом.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, митохондриальная дисфункция, изофлавоны, глицитеин.

Abstract

Mitochondrial neuroprotection in Alzheimer's disease, mediated by the glycitein administration, in an experiment

D.I. Pozdnyakov

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute is a branch of the «Volgograd State Medical University» Kalinin Ave., 11. Pyatigorsk.

Abstract

The increase in the incidence and severity of Alzheimer's disease determine the need to find new ways to treat this pathology, among which neuroprotective therapy is particularly distinguished. Isoflavone – glycitein can be a potentially effective neuroprotective agent.

Materials and methods. The study was performed on one-year-old male rats of the Wistar line, which were modeled sporadic form of Alzheimer's disease by injection of β -amyloid fragments (1-42) into the CA1 part of the hippocampus. Glycitein and the reference medication ethylmethylhydroxypyridine succinate were administered orally for 60 days from the moment of pathology modeling. After the specified time, the hippocampus was sampled, in the tissue of which the activity of enzymes succinate dehydrogenase, citrate synthase and aconitase was determined. Changes in the concentration of apoptosis-inducing factor and tumor necrosis factor – α were also evaluated.

Results. It was found that course oral administration of glycitein at a dose of 100 mg/kg increased the activity of succinate dehydrogenase, aconitase and citrate synthase enzymes in hippocampal tissue by 118.2%, 39.4% and 73.3% ($p < 0.05$) relative to untreated animals. Also, when using glycitein at this dose, there was a decrease in the concentration of apoptosis-inducing factor – by 28.2% ($p < 0.05$) and tumor necrosis factor- α – by 26.5% ($p < 0.05$). At the same time, glycitein at a dose of 100 mg/kg was comparable to the reference drug in terms of effectiveness. It should also be noted that the administration of low (25 mg/kg and 50 mg/kg) and high (200 mg/kg) doses of glycitein did not cause an increase in therapeutic benefits compared to the 100 mg/kg dose.

Conclusions. The course administration of glycitein at a dose of 100 mg/kg in experimental Alzheimer's disease restores mitochondrial function, which is confirmed by increased activity of citrate synthase, succinate dehydrogenase and aconitase. Also, the administration of glycitein suppressed apoptosis reactions to a comparable extent with ethylmethylhydroxypyridine succinate.

Key words: Alzheimer's disease, mitochondrial dysfunction, isoflavones, glycitein.

Введение

Глицитеин – биоизофлавоны, который в больших количествах обнаруживается в сое (*Glycine max*) и других представителях семейства *Fabaceae* (бобовые). В растениях глицитеин является вторичным метаболитом, выполняющим функцию фитоалексина и обеспечивающий защиту от чужеродных бактерий, грибков, а также предотвращающий рост злокачественных новообразований [1]. С момента обнаружения и выделения из растительных объектов, глицитеин стал объектом пристального изучения. Многочисленные исследования показали наличие у данного соединения гормональной активности, прежде всего, эстрогенной. Наряду с другими изофлавонами, такими как генистеин и даидзеин, глицитеин является эффективным фитоэстрогенным средством. Дальнейшее изучение фармакологической активности глицитеина развивалось именно в контексте его оценки гормональных свойств. *Winzer с соавт.* установили, что применение глицитеина за счет усиления апоптоза осте-

окластов значительно уменьшает гипоестроген-зависимую резорбцию костной ткани [2]. Также было установлено положительное влияние глицитеина на функциональную активность эндотелия сосудов при атеросклеротическом поражении артерий. Стоит отметить, что в данных условиях введение глицитеина не только снижало степень повреждения эндотелиальной выстилки, но и способствовало нормализации липидного профиля плазмы крови, что выражалось в уменьшении фракции атерогенных липопротеинов [3]. Широко изучались противораковые свойства глицитеина. *Lee с соавт.* было показано, что применение глицитеина ингибирует экспрессию матриксных металлопротеиназ 3 и 9 типов, уменьшая, тем самым, пролиферацию клеток астроглиомы человека U87MG [4]. Помимо, эстрогенной активности глицитеин, как соединение, имеющее в своем составе фенольный гидроксил и сопряженные ненасыщенные связи, обладает выраженными антиоксидантными свойствами, что открывает определенные перспективы в лечении

нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера. Также необходимо выделить установленные в исследованиях *in vitro* антиамилоидные и гидротропные свойства глицитеина, что также может вносить свой вклад в нейропротекторное действие данного соединения [5]. Как известно, болезнь Альцгеймера является заболеванием со сложным патогенетическим каскадом событий, приводящим к необратимой потере целостности нейронов. Ряд исследований демонстрирует, что одним из триггеров нейродегенеративного процесса при болезни Альцгеймера является уменьшение внутриклеточного пула АТФ, приводящего к активации окислительного стресса и апоптоза. Данная концепция патогенеза болезни Альцгеймера отразилась в теории «митохондриального каскада», центральным механизмом которого является нарушение функциональной активности митохондрий клетки [6]. В настоящее время возможность митохондриальной нейропротекции при нейродегенеративных патологиях активно изучается. *Ying* с соавт установили, что применение КоQ10 и его производных, например, MitoQ или пластохинон восстанавливает митохондриальную функцию и, что немаловажно, способствовало уменьшению амилоидогенеза в мозговой ткани у животных [7]. Семейство пептидов SS-31 также известно своими митохондриоориентированными свойствами. Белки SS-31 связываются с кардиолипином, стабилизируют структуру митохондриальных крист и увеличивают биогенез митохондрий [8]. Таким образом, целенаправленное воздействие на изменение функциональной активности митохондрий является перспективным подходом к патогенетической терапии болезни Альцгеймера, и, учитывая мультитаргетность действия глицитеина, рационально предположить, что применение данного соединения может оказывать влияние на митохондрии клетки.

Цель исследования

Оценить влияние глицитеина на изменение митохондриальной функции в условиях экспериментальной болезни Альцгеймера.

Материалы и методы

Болезнь Альцгеймера моделировали у крыс-самцов линии Wistar массой 300-320 грамм, возрастом 1 год. Животные были получены из вивария Пятигорского медико-фармацевтического института. Во время эксперимента крысы содержались в полипропиленовых боксах по 5 особей со свободным доступом к воде и полнорационному экструдированному корму при температуре воздуха 18-22°C, относительной влажности $60 \pm 5\%$ и естественной смене суточного цикла. Размещение, содержание и экспериментальные процедуры, проводимые с животными, соответствовали положениям Директивы ЕС 2010/63 «О защите животных, используемых

в научных целях».

Болезнь Альцгеймера моделировали у животных путем инъекции агрегатов β -амилоида (А β) в СА 1 часть гиппокампа (передне-задняя = - 3,8 мм, медиально-латеральная = 2,0 мм, дорсально-вентральная = 2,6 мм от брегмы, согласно G. Paxinos). А β был получен от *Sigma-Aldrich*. Для получения стабильных амилоидных агрегатов А β растворяли на холоду (40С) в фосфатно-солевом буфере (рН =7,4) при непрерывном перемешивании в течение 36 часов. Полученную взвесь вводили анестезированным животным (хлоралгидрат, внутривентриально, 350 мг/кг), при помощи микро-дозатора в конечном объеме 2 мкл. Рану послойно ушивали и обрабатывали 10%-ным раствором повидон-йода [9]. При постановке эксперимента выделялись следующие экспериментальные группы: ложноперированные животные (ЛО) – к крысам данной группы применялись все последовательные оперативные манипуляции за исключением введения А β ; негативный контроль (НК) – группа животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера, но без фармакологической коррекции; группа животных с экспериментальной болезнью Альцгеймера, которая получала референс-препарат этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС, «Мексидол» ФАРМАСОФТ, Россия) вводили в дозе 100 мг/кг [10]; группы крыс с экспериментальной болезнью Альцгеймера, которым вводили глицитеин (*Hunan Warrant Pharmaceuticals, KHP*) в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг соответственно. Количество животных в каждой экспериментальной группе равнялось 10 особям, при этом, общее количество животных в эксперименте составило 70 крыс. ЭМГПС и глицитеин вводили перорально через атравматичный зонд в виде тонкодисперсных суспензий на протяжении 60-ти дней после введения А β . Первое введение осуществляли после пробуждения животных. На 61-й день эксперимента крыс декапитировали под хлоралгидратной анестезией и извлекали головной мозг, выделяя гиппокамп, который гомогенизировали в среде, состоящей из 1 ммоль/л ЭГТА, 215 ммоль/л маннита, 75 ммоль/л сахарозы, 20 ммоль/л HEPES и 0,1% раствора бычьего сывороточного альбумина. рН среды составлял 7,2. Гомогенат разделяли на две равные аликвоты. Первую аликвоту центрифугировали при ускорении 1100g 2 минуты, полученный супернатант переносили в пробирки Эппендорф и наслаивали 10%-раствор перколла. Полученную смесь повторно центрифугировали при ускорении 18000 g в течение 10 минут. Супернатант отбрасывали, осадок ресуспендировали в 1 мл изолирующей среды и центрифугировали в течение 5 минут при 10 000 g. Вторичный супернатант использовали для определения активности митохондриальных ферментов: цитратсинтазы, сукцинатдегидрогеназы и аконитазы. Вторую аликвоту гомогената центрифугировали при 10000g 10 минут. Супернатант использовали для определения концентрации фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) и апоптоз-индуци-

Табл. 1.
Влияние введения глицитеина в различных вариантах дозирования и этилметилгидроксипиридина сукцината на изменение активности митохондриальных ферментов в условиях патологии Альцгеймера.

Группа	ЛО	НК	ЭМГПС	Глицитеин, 25 мг/кг	Глицитеин, 50 мг/кг	Глицитеин, 100 мг/кг	Глицитеин, 200 мг/кг
Сукцинатдегидрогеназа, Ед/мг белка	3,1 ± 0,14	1,1 ± 0,19#	2,3 ± 0,186*	1,5 ± 0,105 Δ	2 ± 0,175*	2,4 ± 0,195*	1,4 ± 0,121* Δ
Цитратсинтаза, Ед/мг белка	3,4 ± 0,141	1,5 ± 0,574#	2,2 ± 0,117*	1,8 ± 0,238 Δ	2,1 ± 0,196*	2,6 ± 0,218*	1,6 ± 0,735* Δ
Аконитаза, Ед/мг белка	45,6 ± 4,485	23,6 ± 4,378#	36,5 ± 2,071*	24,6 ± 4,741 Δ	28,7 ± 4,319* Δ	32,9 ± 2,433*	25,9 ± 3,349* Δ

Примечание: данные представлены в виде М (среднее значение) ± SEM (стандартная ошибка среднего); ЛО – ложнооперированные животные, НК – группа негативного контроля; ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат; # – достоверно относительно ЛО крыс ($p < 0,05$; тест-Ньюмена-Кейлса); * – достоверно относительно НК группы крыс ($p < 0,05$; тест-Ньюмена-Кейлса); Δ – достоверно относительно крыс, получающих ЭМГПС ($p < 0,05$; тест-Ньюмена-Кейлса).
 Примечание: условные обозначения аналогичны таблице 1.

рующего фактора (АИФ).

Активность аконитазы определяли спектрофотометрически при 340 нм, путем регистрации НАДФН, образовавшегося в ходе сопряженной аконитаза-изоцитратдегидрогеназной реакции. Активность фермента рассчитывали по изменению оптической плотности используя коэффициент экстинкции $0,0313 \mu\text{M}^{-1}$ [11].

Активность цитратсинтазы оценивали спектрофотометрической детекцией окрашенных продуктов реакции деградации 5,5'-ди-тиобис- (2-нитробензойной кислоты) в присутствии ацетил-КоА и оксалоацетата при 412 нм [12].

Активность сукцинатдегидрогеназы оценивали спектрофотометрически в реакции сукцинат-зависимого восстановления дихлорфенолиндофенола при добавлении в анализируемую среду ротенона при 600 нм [13].

Каталитические свойства ферментов выражали в единицах действия (ЕД) с поправкой на концентрацию белка в образце. Содержание белка определяли методом Бредфорда.

Концентрацию ФНО-α и АИФ оценивали методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием наборов реактивов производства Cloud Clone. Анализ выполнялся в соответствии с рекомендациями производителя. Аналитический сигнал регистрировали на микропланшетом ридере Infinite F50 (Tecan).

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики. В ходе статистического анализа использовали пакет прикладных программ STATISTICA 6.0. (StatSoft, США). Нормальность распределения данных оценивали с применением теста Шапиро-Уилка. Однородность дисперсий определяли тестом Левена. Статистически значимые отличия между группами оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа с пост-тестом Ньюмена-Кейлса (при нормальном распределении данных) или пот-тестом Краскелла-Уоллиса (при распределении данных отличных от нормального) при критическом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было установлено, что у НК группы крыс отмечено снижение (относительные показатели приведены в сравнении с ЛО животными в табл.1) активности сукцинатдегидрогеназы – на 64,5% ($p < 0,05$), цитратсинтазы – на 55,9% ($p < 0,05$) и аконитазы – на 48,2% ($p < 0,05$). Полученные данные отражают тот факт, что в условиях Аβ- индуцированной болезни Альцгеймера у крыс отмечается развитие выраженной митохондриальной дисфункции. При этом понижение активности цитратсинтазы может свидетельствовать об уменьшении общего пула структурно-функционально неповрежденных митохондрий и о повреждении внутренней митохондриальной мембраны [14]. Сукцинатдегидрогеназа является частью

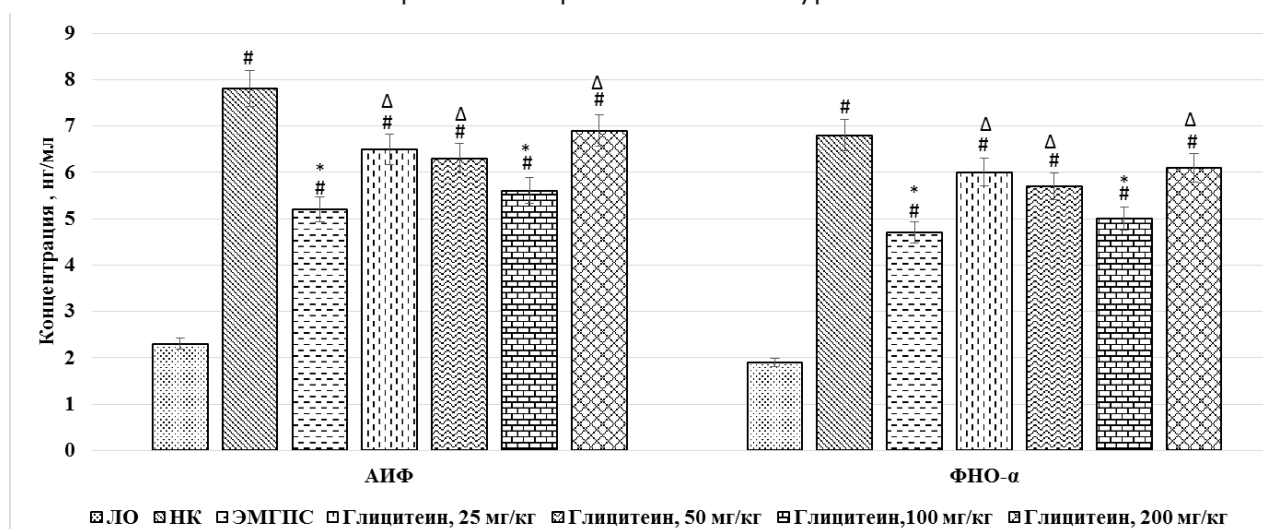


Рис. 1. Влияние введения глицитеина в различных вариантах дозирования и этилметилгидроксипиридина сукцината на изменение концентрации АИФ и ФНО-α в условиях патологии Альцгеймера

Примечание: условные обозначения аналогичны таблице 1.

комплекса II митохондриальной дыхательной цепи и в тоже время, является ферментом цикла Кребса, катализирующим реакцию превращения сукцината в фумарат. Дефицит сукцинатдегидрогеназы в условиях патологии Аβ свидетельствует о значительном ухудшении энергопродукции и превалировании анаэробных реакций окисления над аэробными [15]. Данный факт особенно важен, т.к. при высоких тканевых концентрациях Аβ и сопутствующим уменьшением пула АТФ, повышается способность некоторых белков к самоагрегации, примером чего может служить накопление агрегатов гиперфосфорилированного тау-белка в головном мозге в условиях патологии Альцгеймера [16]. Уменьшение активности аконитазы у крыс НК группы может являться одним из маркеров развития окислительно-стресса и активации апоптоза [17].

Дальнейший ход исследований показал, что у крыс, получавших ЭМГПС, отмечено повышение активности митохондриальных ферментов цитратсинтазы, аконитазы и сукцинатдегидрогеназы в сравнении с НК группой животных на 46,7% ($p < 0,05$), 54,7% ($p < 0,05$) и 109,1% ($p < 0,05$), соответственно (табл.1). Введение глицитеина в дозе 25 мг/кг не оказало значимого влияния на изменения анализируемых показателей. В то же время применение глицитеина в дозах 50 мг/кг и 100 мг/кг способствовало увеличению активности цитратсинтазы – на 40,0% ($p < 0,05$) и 73,3% ($p < 0,05$), аконитазы – 21,6% ($p < 0,05$) и 39,4% ($p < 0,05$), сукцинатдегидрогеназы – на 81,8% ($p < 0,05$) и 118,2% ($p < 0,05$), соответственно. Введение животным более высоких доз глицитеина приводило к снижению фармакологической эффективности. Так статистически значимых отличий между НК группой крыс и животными, получавшими глицитеин в дозе 200 мг/кг, не установлено. Необходимо отметить, что введение животным референс-препарата и глицитеина в дозе 100 мг/кг

вызывало развитие эквивалентного фармакологического ответа в виде сопоставимых показателей активности митохондриальных ферментов.

Важным составляющим патогенеза нейродегенеративных заболеваний и, в частности, болезни Альцгеймера, является неконтролируемый патологический апоптоз. Известно, что апоптоз инициируется и протекает по двум механизмам: внутреннему и внешнему пути. Внеклеточный путь апоптоза активируется под воздействием на TRAIL-рецепторы экзотических стимулов, основным из которых является ФНО-α. Внутренний или митохондриальный апоптотический каскад непосредственно связан с активностью митохондрий клетки и активируется при нарушении целостности мембран митохондрий. В результате высвобождается митохондрио-ассоциированный белок АИФ, который по независимым от каспаз механизмам вызывает конденсацию хроматина и гибель клетки [18]. В ходе исследования было установлено, что у животных без фармакологической поддержки содержание АИФ и ФНО-α в гиппокампе превосходило аналогичные показатели ЛО крыс в 3,4 ($p < 0,05$) и 3,6 ($p < 0,05$) раза, соответственно (рис.1). На фоне введения ЭМГПС и глицитеина в дозе 100 мг/кг наблюдалось уменьшение содержания АИФ на 33,3% ($p < 0,05$) и 28,2% ($p < 0,05$), соответственно, при уменьшении концентрации ФНО-α на 30,9% ($p < 0,05$) и 26,5% ($p < 0,05$). Стоит отметить, что введение животным глицитеина в дозах 25 мг/кг, 50 мг/кг и 200 мг/кг значимого влияния на течение реакций апоптоза не оказало.

Таким образом, подавление реакций апоптоза в условиях патологии может являться значимым компонентом нейропротекторного действия глицитеина. При этом уменьшение уровня АИФ, вероятно, связано с восстановлением митохондриальной функции. В то же время глицитеин известен как агонист эстрогеновых рецепторов, что может лежать в

основе снижения концентрации ФНО-α [3].

Выводы

Было показано, что применение глицитеина дозозависимо повышает активность митохондриальных ферментов аконитазы, сукцинатдегидрогеназы и цитратсинтазы с максимально выраженным эффектом в дозе 100 мг/кг. Уровни проапоптотических маркеров АИФ и ФНО-α на фоне введения глицитеина в дозе 100 мг/кг также были ниже, чем у нелеченых животных. Необходимо подчеркнуть, что применение глицитеина в дозе 100 мг/кг оказывало сопоставимое с референс-препаратом действие, в то время как в более низких или высоких дозах эффективность глицитеина снижалась.

Литература

1. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules*. 2019;24(6):1076. doi: 10.3390/molecules24061076.
2. Winzler M, Rauner M, Prietschmann P. Glycitein decreases the generation of murine osteoclasts and increases apoptosis. *Wien Med Wochenschr*. 2010; 160 (17-18):446-51. doi: 10.1007/s10354-010-0811-4.
3. D.L. Katz, M.A. Evans, V.Y. Njike, M.L. Hoxley, Nawaž H., B.P. Comerford, P.M. Sarrel Raloxifene, soy phytoestrogens and endothelial function in postmenopausal women. *Climacteric*. 2007;10:500-507. doi: 10.1080/13697130701750123.
4. Lee EJ, Kim SY, Hynn JW, Min SW, Kim DH, Kim HS. Glycitein inhibits glioma cell invasion through down-regulation of MMP-3 and MMP-9 gene expression. *CheM Biol Interact*. 2010; 185(1):18-24. doi: 10.1016/j.cbi.2010.02.037.
5. Simunkova M, Alwasel SH, Albazza IM, Jomona K, Kollar V, Rusko M, Valko M. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. *Arch Toxicol*. 2019; 93(9):2491-2513. doi: 10.1007/s00204-019-02538-y.
6. Sverdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2018; 62 (3):1403-1416. doi: 10.3233/JAD-170585.
7. Ying M, Sui X, Zhang Y, Sun Q, Qu Z, Luo X, Chang RC-C, Ni J, Liu J, and Yang X. Identification of novel key molecules involved in spatial memory impairment in triple transgenic mice of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 54: 3843-3858, 2017
8. Reddy PH, Manczak M, Kandimalla R. Mitochondria-targeted small molecule SS31: a potential candidate for the treatment of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26(8):1483-1496. doi:10.1093/hmg/ddx052
9. Manczak M, Reddy PH. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum Mol Genet*. 2012; 21(11):2538-47. doi: 10.1093/hmg/dd072.
10. А.И. Поздняков, В.М. Руквицина, В.Т. Абаев, Э.Т. Оганесян Влияние 3-[(е)-3-(3,5-диптер-бутил-4-гидроксибензил)-3-оксипроп-1-енил]-6-метокси-хромен-4-она на окислительный статус головного мозга крысы в условиях церебральной ишемии. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2021; 84(3): 3-7. doi:10.30906/0869-2092-2021-84-3-3-7
11. Ternette N., Yang M., Laroyia M. Inhibition of mitochondrial aconitase by succination in fumarate hydratase deficiency. *Cell Rep*. 2013; 3 (3):689-700. doi:10.1016/j.celrep.2013.02.013.
12. Shepherd D., P.B. Garland The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem J*. 1969; 114 (3):597-610.
13. Wang H., Huwaimel B., Verma K. Synthesis and Antineoplastic Evaluation of Mitochondrial Complex II (Succinate Dehydrogenase) Inhibitors Derived from Atpenin A5. *ChemMedChem*. 2017; 12(13):1033-1044. doi:10.1002/cmdc.201700196
14. Larsen S, Nielsen J, Hansen CN, et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J Physiol*. 2012; 590 (14):3349-3360. doi:10.1113/jphysiol.2012.230185.
15. Karimzadeh P, Keramatipour M, Karamzade A, Pourbakhtyar E. Succinate Dehydrogenase Deficiency: A Treatable Neurometabolic Disorder. *Iran J Child Neurol*. 2020;14(4):111-116.
16. Wegmann S, Biernat J, Mandelkow E. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2021; 69: 131-138. doi: 10.1016/j.conb.2021.03.003.
17. Khodagholi F, Shaerzadeh F, Montazeri F. Mitochondrial Aconitase in Neurodegenerative Disorders: Role of a Metabolism-related Molecule in Neurodegeneration. *Curr Drug Targets*. 2018; 19 (8):973-985. doi: 10.2174/1389450118666170816124203.
18. Obulesu M, Lakshmi MJ. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochem Res*. 2014; 39 (12):2301-12. doi: 10.1007/s11064-014-1454-4.