



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Paulina Bialaglovytė

**Hipoksijos - reoksigenacijos poveikis HL-1 kardiomiocitų
gyvybingumui ir viduląsteliniais mechanizmams**

Magistro baigiamasis darbas

Molekulinės biologijos studijų programa

Darbo vadovas

Dr. Rokas Mikšiūnas

Darbas atliktas

Valstybinis mokslinių tyrimų institutas
Inovatyvios medicinos centras, Regeneracinės
medicinos skyrius

Turinys

Santrumpos	4
Įvadas	6
1. Literatūros apžvalga	7
1.1. Širdies struktūra ir funkcija.....	7
1.1.1. Širdies sudėtis	7
1.1.2. Širdies audinio ląstelinė sandara	8
1.1.3. Kardiomiocitų struktūra ir savybės	8
1.1.4. Susitraukimo principas.....	10
1.1.5. HL-1 ir kitos kardiomiocitų ląstelių linijos	11
1.2. Išemijos ir reperfuzijos poveikis širdies funkcionavimui.....	13
1.2.1. Išemijos - reperfuzijos mechanizmas.....	13
1.2.2. Išemijos poveikis.....	14
1.2.3. Reperfuzijos poveikis	16
1.2.4. Ilgalaikiai išemijos - reperfuzijos padariniai	18
1.3. HIF1A svarba išemijai - reperfuzijai	19
1.3.1. Išemijos – reperfuzijos modeliai	19
1.4. Medžiagos apsaugančios nuo išemijos - reperfuzijos	22
1.4.1. Antioksidantai apsaugantys nuo išemijos - reperfuzijos.....	22
1.4.2. Priešuždegiminės medžiagos apsaugančios nuo išemijos - reperfuzijos.....	22
1.4.3. Mitochondrijų apsaugos priemonės	23
1.5. Kalcio svarba širdies homeostazei.....	24
1.5.1. Kalcio svarba širdies susitraukimui.....	24
1.5.2. Kalcio signalų pakitimai po išemijos reperfuzijos.....	25
2. Medžiagos ir metodai	27
2.1. Medžiagos.....	27
2.2. Metodai.....	28
2.2.1. HL-1 kardiomiocitų kultivavimas	28
2.2.2. Ląstelių auginimas hipoksijos-reoksigenacijos sąlygomis.....	28
2.2.3. Laktato dehidrogenazės aktyvumas	29
2.2.4. Gyvybingumo nustatymas su alamarBlue™.....	29
2.2.5. Ląstelių kiekio nustatymas su CyQuant™	30
2.2.6. Aneksino V kiekio nustatymas tėkmės citometru	30
2.2.7. Kalcio dažai.....	30
2.2.8. Genų raiškos įvertinimas HL-1 kardiomiocituose.....	30
2.2.9. Statistinis duomenų analizė.....	32
3. Rezultatai	33
3.1. Hipoksijos - reoksigenacijos tyrimas naudojant 1 % O ₂	33
3.1.1. Ląstelių gyvybingumo tyrimai naudojant metabolinį ir nemetabolinį metodus ...	34
3.1.2. Ląstelių gyvybingumo tyrimas naudojant LDH aktyvumo nustatymą.....	36
3.1.3. Ląstelių apoptozės nustatymas su Aneksinu V.....	37
3.2. Hipoksijos - reoksigenacijos tyrimas naudojant 0.1 % O ₂	37
3.2.1. Skirtingų terpių įtaka HL-1 ląstelių LDH aktyvumui po hipoksijos - reoksigenacijos	38
3.2.2. Skirtingų terpių įtaka HL-1 ląstelių apoptozei po hipoksijos - reoksigenacijos	41

3.3. MitoTEMPO poveikis HL-1 ląstelėms po hipoksijos - reoksigenacijos	42
3.3.1. MitoTEMPO poveikis HL-1 LDH aktyvumui ir apoptozei po hipoksijos reoksigenacijos.....	43
3.3.2. MitoTEMPO poveikis HL-1 kalcio kiekiui	43
3.3.3. MitoTEMPO poveikis HL-1 genų raiškai	45
Rezultatų aptarimas	50
Išvados	54
Autoriaus asmeninis indėlis	55
Rezultatų sklaida	56
Padėka	57
Santrauka	58
Abstract	59
Literatūros sąrašas	60

Santrumpos

AMPK - AMP aktyvuota baltymų kinazė, angl. *AMP-activated protein kinase*

AT-1 - Prieširdžių navikas-1, angl. *Atrial Tumor-1*

ATP - adenosino trifosfatas

ATRA – tretinoinas, angl. *All-Trans Retinoic Acid*

AV – atrioventrikulinis (mazgas)

Bax - Su Bcl-2 susijęs X baltymas, angl. *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2 - B ląstelių limfoma 2, angl. *B-cell lymphoma 2*

BNIP38 - BCL2/adenoviruso E1B 19 kDa baltymo sąveikaujantis baltymas 38

BSA - Galvijų serumo albuminas, angl. *Bovine Serum Albumin*

CICR - kalcio sukeltas kalcio išsiskyrimas, angl. *Calcium-Induced Calcium Release*

DAMP - su pažeidimu susiję molekuliniai modeliai, angl. *Danger-Associated Molecular Patterns*

DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle terpė, angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - dimetilo sulfoksidas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

eNOS - endotelio azoto oksido sintazės

FADH₂ - Flavino adenino dinukleotidas (redukuota forma)

FBS – Embrioninis galvijų serumas, angl. *Fetal Bovine Serum*

FTIC - Fluoresceino izotiocianatas, angl. *Fluorescein isothiocyanate*

HIF-1 α - hipoksiją indukuojantis faktorius 1-alfa

HRE - į hipoksiją reaguojančių elementų

I/R - išemija – reperfuzija

IL-1 - Interleukinas 1

IL-6- Interleukinas 6

iPSC - indukuotos pluripotentinės kamieninės ląstelės

LAD - kairioji priekinė nusileidžiančioji, angl. *left front descending*

LAMP2 - lizosominės membranos baltymas 2, angl. *Lysosomal Associated Membrane Protein2*

LDH - Laktato dehidrogenazė

LVEF - kairiojo skilvelio išstūmimo frakcija, angl. *left ventricular ejection fraction*

MitoQ - mitochondrijų kofermentas Q10, angl. *mitochondrial coenzyme Q10*

MitoSNO - Mitochondrijų S-nitrozilacija, angl. *Mitochondrial S-nitrosylation*

Mito-TEMPO - Į mitochondrijas nukreiptas TEMPOL, angl. *Mitochondrial-targeted TEMPOL*

mPTP - mitochondrijų pralaidumo perėjimo poros, angl. *mitochondrial permeability transition pairs*

NADH - Nikotinamido adenino dinukleotidas (redukuotas)

NF-κB - Branduolinio faktoriaus kappa lengvosios grandinės stiprintuvas, angl. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer*

NO - azoto oksido

NOX-1 - NADPH oksidazė 1

NOX-2 - NADPH oksidazė 2

OMA1 - proteazės, nukreiptos į OPA1

OPA1 - opinė atrofija 1

PCI - perkutaninė koronarinė intervencija

RAAS - Renino-angiotenzino-aldosterono sistema

ROS – reaktyvios deguonies formos, angl. *Reactive Oxygen Species*

RPMI 1640 – Roswell Park memorialinio instituto terpė 1640, angl. *Roswell Park Memorial Institute Medium 1640*

SA - sinoatrialinis (mazgas)

SERCA - sarko/endoplazminio tinklo Ca²⁺-ATPazės

SIRT1/SIRT3 - Sirtuinas 1

SIRT1/SIRT3 - Sirtuinas 3

SkQ1- į mitochondrijas nukreiptas antioksidantas, cheminė formulė 2-(9,10-diokso-9,10-dihidroantracen-2-il)-N-[3-(trifluormetil)fenil]acetamidas

SN - standartinis nuokrypis

TCA - trikarboksirūgštis

t-l PGR - tikro laiko polimerazinė grandininė reakcija

TNF-α - Auglio nekrozės faktorius alfa, angl. *Tumor Necrosis Factor-alpha*

VEGF - kraujagyslių endotelio augimo faktorių, angl. *vascular endothelial growth factor*

Įvadas

Kraujotakos sistemos ligos yra viena dažniausių mirčių priežasčių visame pasaulyje, nusinešanti 20,5 milijono gyvybių kasmet (Di Cesare ir kt., 2024.). Miokardo infarktas tai vienas dažniausių kraujotakos sutrikimų, kuomet dėl užsikimšusių kraujagyslių kraujo tiekimas į širdį sutrinka ir sukeliamos neatstatomos pažaidos organizme, tokios kaip fibrozė, kardiomiocitų mirtis ir kalcio signalų pokyčiai.

Išemijos – reperfuzijos metu organizme kuriam laikui sutrinka kraujo tiekimas į tam tikrus organus. Po kiek laiko jis vėl atstatomas, tačiau dėl šio staigaus kraujo tekėjimo atstatymo atsiranda deguonies kiekio šuolis, susiformuoja reaktyvios deguonies formos ir susidaro pažaidos. Norint tirti šį procesą laboratorijos sąlygomis yra pasitelkiamas hipoksijos – reoksigenacijos metodas. Laboratorinėse sąlygose jis yra lengvai kontroliuojamas: pagal poreikį galima keisti ląstelių auginimo sąlygas, reguliuoti deguonies koncentraciją ir kitus parametrus. Tokiems tyrimams palanku naudoti HL- kardiomiocitų liniją, kuri yra panaši į pirminius kardiomiocitus ir geba sėkmingai proliferuoti bei reaguoti į tyrimo metu keičiamas sąlygas.

Po išemijos – reperfuzijos kardiomiocituose įvyksta negrįžtami pokyčiai, didėja citoplazminio ir mitochondrinio kalcio kiekis, aktyvuojama programuota ląstelių mirtis (Bertero ir kt., 2024). Hipoksijos – reoksigenacijos metodu galima atkartoti sąlygas vykstančias širdyje ir tirti potencialius apsauginius junginius mažinančius kardiomiocitų apoptozę. Yra parodyta, kad 90% reaktyvių deguonies darinių susidaro mitochondrijose, todėl antioksidantai mažinantys oksidacinį stresą mitochondrijose galėtų apsaugoti ląsteles nuo žalingų išemijos – reperfuzijos padarinių (W. Zhang ir kt., 2019). Literatūroje aprašyta nemažai antioksidantų veikiančių mitochondrijose, tokių kaip, MitoNEET, MitoTEMPO ar MitoQ, tačiau kol kas trūksta studijų vertinančių šių medžiagų apsauginį poveikį po hipoksijos reoksigenacijos.

Darbo tikslas – įvertinti hipoksijos – reoksigenacijos bei mitochondrijas apsaugančių medžiagų poveikį HL-1 kardiomiocitų ląsteliniams procesams.

Darbo uždaviniai:

1. Atrasti tinkamiausias hipoksijos – reoksigenacijos sąlygas, HL-1 kardiomiocitų pažeidimams sukelti.
2. Įvertinti mitochondrijas apsaugančių antioksidantų poveikį HL-1 kardiomiocitų gyvybingumui ir apoptozei.
3. Įvertinti mitochondrijas apsaugančių antioksidantų poveikį HL-1 kardiomiocitų genų raiškai ir kalcio kiekiui.

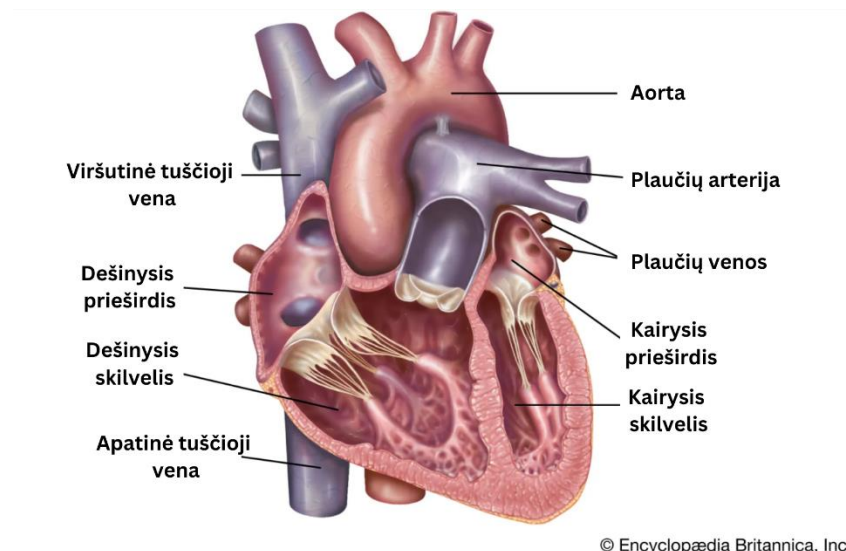
1. Literatūros apžvalga

1.1. Širdies struktūra ir funkcija

Širdis – gyvybiškai svarbus organas, kurio pagrindinė funkcija yra kraujo pumpavimas ir maistinių medžiagų bei deguonies tiekimas visiems organizmo audiniams, taip pat žalingų medžiagų šalinimas (Matienzo & Bordoni, 2024). Struktūriškai širdis yra padalinta į keturias dalis. Viršutinės yra vadinamos prieširdžiais, o apatinės – skilveliais (Saxton ir kt., 2024). Dešinė širdies pusė priima kraują neprisotintą deguonies ir pumpuoja jį į plaučius, kur jis prisotinamas deguonimi, o kairė – priima šį kraują ir pumpuoja jį po visą organizmą. Tarp šių dalių esantys vožtuvai palaiko vienpusę kraujo tėkmę (Rehman & Rehman, 2024).

Širdis veikia per koordinuotą elektrinių impulsų sistemą, kuri ritmiškai valdo širdies raumens susitraukimą ir atsipalaidavimą. Šis procesas prasideda sinoatrialiniame (SA) mazge, kuris atlieka širdies stimulatoriaus funkciją, o tada plinta per specializuotus kelius, tokius kaip Purkinjė skaidulos, ir atrioventrikulinį (AV) mazgą (Ripa ir kt., 2024).

Atsižvelgiant į širdies svarbą organizmo gyvybinės funkcijos palaikyme, mokslininkai ieško būdų kaip palengvinti širdies tyrimus ir suprasti širdies veiklą ląsteliniu lygiu. Tam sukurta daug specializuotų ląstelių linijų, skirtų širdies biologijos tyrimams (Lippi ir kt., 2020).



1 pav. Širdies anatinė sandara

Pritaikyta iš Encyclopædia Britannica, Inc.

1.1.1. Širdies sudėtis

Širdis yra sudaryta iš kelių specializuotų struktūrų, kurių kiekviena turi specifinę funkciją organizmo kraujotakos sistemoje. Ji sudaryta iš keturių pagrindinių dalių – dviejų prieširdžių, esančių viršutinėje širdies dalyje, ir dviejų skilvelių, esančių apatinėje širdies dalyje (Rehman & Rehman,

2024). Kraujas patenka į prieširdžius, o jų sienelės yra plonesnės, nes jie neatlieka pumpavimo funkcijos. Į dešinį prieširdį per viršutinę ir apatinę tuščiąsias venas iš viso organizmo suteka mažai deguonies turintis kraujas, o į kairįjį per plaučių venas suteka deguonimi turtingas kraujas. Skilveliai, kurių pagrindinė funkcija yra išpumpuoti kraują, turi storesnes sienes, kad turėtų pakankamai jėgos kraujo išstūmimui. Per plaučių arteriją dešinysis skilvelis siunčia kraują į plaučius deguonies prisotinimui, o kairysis skilvelis, turintis pačią storiausią sienelę, pumpuoja kraują po organizmą (Whitaker, 2014).

Širdis taip pat turi laidumo sistemą, kuri geba užtikrinti koordinuotą širdies dalių susitraukimą ir atsipalaidavimą. Šios sistemos veiklą inicijuoja sinoatriumo (SA) mazgas, generuojanti reguliarius elektros impulsus (Kashou ir kt., 2024). Atrioventikulinio (AV) mazgas pristabdo signalo sklaidimą iki tol kol skilveliai yra užsipildę krauju. Signalas toliau keliauja per His pluoštelį kelią, kol išsišakoja į dešinįjį ir kairįjį skilvelį (Pickoff, 2011). Į skilvelių sienes signalas perduodamas Purkinje skaidulomis ir taip skatina juos susitraukti bei išstumti kraują iš širdies. Tai užtikrina efektyvų ir sinchronizuotą širdies plakimą (Schwarzwald ir kt., 2009).

1.1.2. Širdies audinio ląstelinė sandara

Širdį sudaro kelių tipų ląstelės, svarbios širdies funkcijos palaikyme. Sinoatrialiniame ir atrioventikuliariniame mazguose esančios širdies stimulatoriaus ląstelės reguliuoja ir generuoja elektrinius širdies impulsus, geba be centrinės nervų sistemos impulso inicijuoti ritmiškus susitraukimus, kitaip tariant, palaikyti širdies ritmą (Wei ir kt., 2024). Endotelio ląstelės iškloja širdies ertmes ir kraujagysles, sudarydamos sklaidų barjerą kraujo tekėjimui, taip pat prisideda prie kraujagyslių išsiplėtimo proceso (Sandoo ir kt., 2010). Struktūrinę atramą širdžiai palaikyti padeda fibroblastai, kurie gamina užląstelinę matriksą ir prisideda prie audinio remodeliacijos po pažeidimų, tokių kaip miokardo infarktas (Goldsmith ir kt., 2014). Su širdimi sujungtų kraujagyslių sienelėse randamos lygiosios raumenų ląstelės, kurios reguliuoja kraujotaką, keisdamos kraujagyslės skersmenį (Hafen ir kt., 2024). Nervinės ląstelės įtakoja širdies susitraukimų dažnį ir jėgą pagal organizmo poreikius (Giannino ir kt., 2024). Pagrindinės širdies ląstelės yra kardiomiocitai, kurie ritmingo susitraukimo metu generuoja jėgą ir pumpuoja kraują (Ripa ir kt., 2024).

1.1.3. Kardiomiocitų struktūra ir savybės

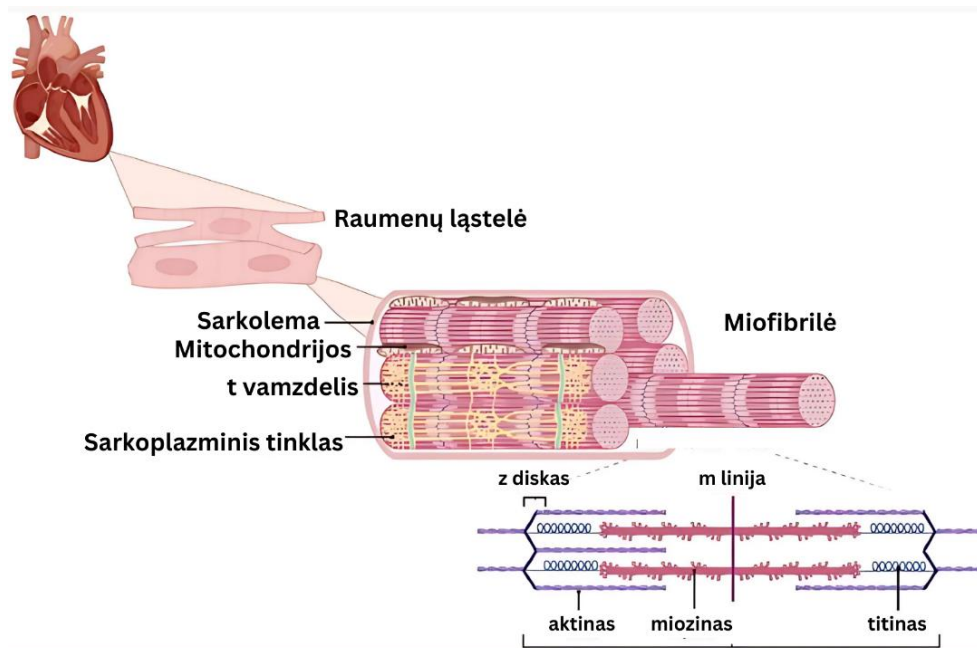
Kardiomiocitai iš viso sudaro 70-85 % širdies tūrio, o per minutę pumpuoja net 4-5 L kraujo (Kurien, 2004; Trager ir kt., 2023). Nors jų dydis gali svyruoti, dažniausiai tai yra 80 µm ilgio ir 15 µm skersmens plokščios ląstelės su vienu, centre esančiu branduoliu (kai kuriais atvejais branduoliai gali būti du). (Gartner & Hiatt, 2011). Pagrindinis kardiomiocitų išskirtinumas yra jų struktūra – tai išsišakojusios, dryžuotos skersaruožio raumens ląstelės, tarpusavyje sujungtos įterptiniais diskais (Ripa ir kt., 2024). Šie diskai susitraukimo neleidžia atitrūkti ląstelei, užtikrina sinchronizuotą širdies

susitraukimą. Tarp kardiomiocitų elektrinis signalas, kuris ateina nuo sinoatriinio mazgo, plinta plyšinėmis jungtimis (Nielsen ir kt., 2023).

Kardiomiocitai yra prisitaikę atlikti savo funkciją net 50% jų sarkoplazminio tinklo užima mitochondrijos, kurios yra išsidėsčiusios lygiagrečiai išilginei ląstelės ašiai (Gartner & Hiatt, 2011). Riebalų rūgštys yra pagrindinis suaugusių kardiomiocitų energijos šaltinis. Jų oksidacijos, o vėliau ir oksidacinio fosforilinimo metu sunaudojamas didelis kiekis deguonies, kuris yra paverčiamas į ATP. Jei deguonies kiekis organizme yra mažas, energija gali būti gaunama pasitelkiant kitus substratus, tokius kaip gliukozė, laktatas ir t.t.. Žinoma, kad dėl netinkamos mitochondrijų funkcijos, ypač patologinėmis sąlygomis, oksidacinė apykaita sumažėja. Tuo metu riebalų rūgštys gali pradėti kauptis epikardo riebaluose, taip sukeliant uždegimą, oksidacinį stresą ir net atsparumą insulinui ir sustiprinant miokardo disfunkciją (Gandoy-Fieiras ir kt., 2020).

Kardiomiocitai geba sukurti jėgą, kuri yra reikalinga ritmingiems širdies susitraukimams, užtikrinantiems kraujo varinėjimą po visą kūną. Kardiomiocitai elektrinius impulsus paverčia mechaniniu poveikiu, kuris ir sudaro širdies dūžio pagrindą. Šis veiksmas yra reikalingas kraujotakos palaikymui ir yra ypatingai koordinuotas (Ripa ir kt., 2024). Interkalaciniai diskai yra tarpininkai tarp miocitų, sujungiantys juos per tarpląstelinius signalus ir padeda jiems sinchronizuotis (Manring ir kt., 2018). Sarkomeros, pagrindiniai raumenų skaidulų vienetai, yra atsakingos už kardiomiocitų gebėjimą susitraukti (Ripa ir kt., 2024).

Sarkomeros yra pagrindiniai raumenų ląstelių susitraukimą skatinantys vienetai, kurie padaro kardiomiocitus dryžuotais. Kiekviena sarkomera yra sudaryta iš skirtingo storio aktino ir miozino baltymų. Susitraukimas yra inicijuojamas elektrinio signalo metu, kai miozino galvutės jungiasi su aktino gijomis ir slenka į vidų, taip sutrumpėdamos sarkomeras ir pačiam kardiomiocitui. Šis reiškinys vadinamas slenkančių gijų teorija ir leidžia kardiomiocitams atlikti sinchronizuotus ir stiprius susitraukimo veiksmus, taip efektyviai pumpuojant kraują (Biga ir kt., 2019). Norint užtikrinti šią funkciją yra svarbi ne tik pačių kardiomiocitų struktūra, tačiau ir inkarinės ląstelių jungtys. Jos geba užtikrinti širdies raumens stabilumą, yra ypač svarbios audiniams, patiriantiems didelį stresą. Net ir vykstant širdies susitraukimams, išsiplėtimams, inkarinės jungtys sugeba išlaikyti ląsteles mechaniškai prisitvirtinusias viena prie kitos (Mezzano & Sheikh, 2011). Žmogaus širdis vidutiniškai susitraukia 80 kartų per minutę ir kasdien sugeba paskirstyti 9 tonas kraujo per kūno audinius. Nors skeleto ir širdies raumenys yra tiek funkciškai, tiek anatomiškai panašūs, tačiau skeleto raumenys geba atsinaujinti, o ši savybė nėra būdinga žinduolių širdies raumenims. Šis skirtumas atsirado dėl kamieninių širdies ląstelių trūkumo taip pat suaugusių kardiomiocitų negebėjimo įsijungti į ląstelių ciklą ir užbaigti dalijimąsi, nes po gimimo kardiogenezės būdas yra ribotas ir antraeilis (Tzahor & Poss, 2017).

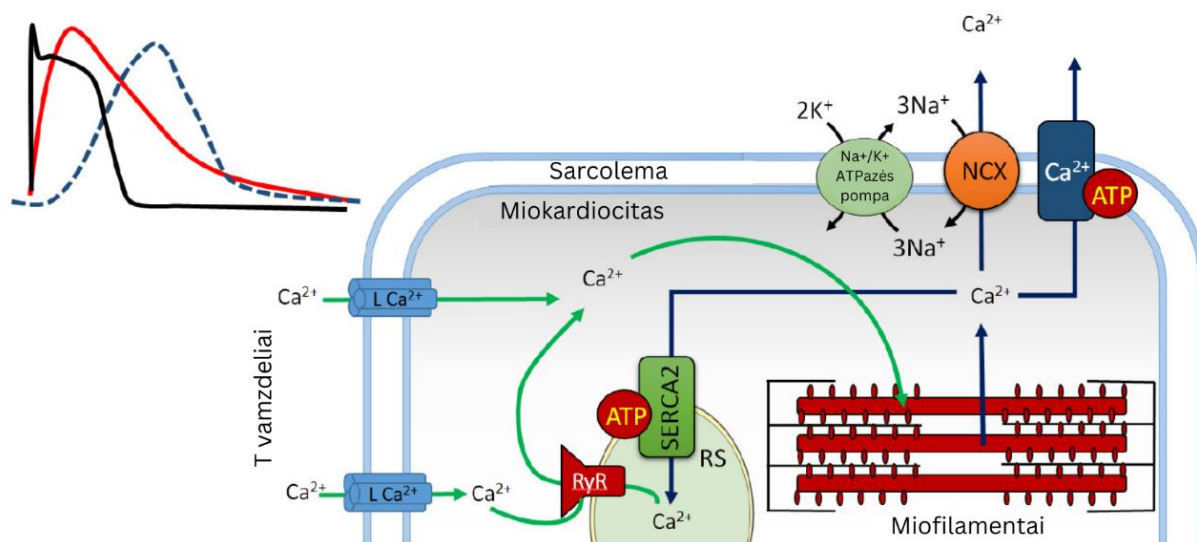


2 pav. Širdies miofibrilių ir sarkomerų struktūra

Sarkolema supa miocitus, kuriuose yra miofibrilių pluoštai, sudaryti iš sarkomerų. Sarkomeros yra sudarytos iš plonų aktino gijų ir storų miozino gijų. Z diskai yra įsiterpę tarp sarkomerų ir jas jungia. Pritaikyta iš (Solomon ir kt., 2022)

1.1.4. Susitraukimo principas

Širdies susitraukimas visų pirma prasideda ląsteliniame lygmenyje, kai kardiomiocituose prasideda procesas vadinamas sužadavimo ir susitraukimo sąsaja (Jafri, 2012). Širdies ritmą reguliuojančios ląstelės perduoda kardiomiocitams elektrinį signalą ir juose atsiveria nuo įtampos priklausomi natrio kanalų, todėl membranos depoliarizuojasi. Dėl depoliarizacijos atsidaro L tipo kalcio kanalai ir nedidelis kiekis užląstelinio kalcio plūsteli į ląstelę. Tada vyksta kalcio sukeltas kalcio išsiskyrimas (CICR, angl. *Calcium-induced calcium release*), kai į ląstelę patekęs kalcis aktyvuoja rianodino receptorius sarkoplazminiame tinkle ir paskatina didelio kalcio kiekio išsiskyrimą į citoplazmą. Padidėjęs viduląstelio kalcio kiekiui, jis jungiasi prie troponino C, esančio ant plonų sarkameros gijų, atlaisvindamas aktino ir miozino surišimo vietas. Tuomet prie aktino prisitvirtina miozino galvutės, per kryžminį tiltelį, kuriam svarbi ATP hidrolizė, sukurdamas susitraukimą. (Wei ir kt., 2024). Kai kalcis pasišalinamas iš citoplazmos, kardiomiocitas gali atsipalaiduoti. Tai vyksta per sarko/endoplazminio tinklo Ca^{2+} -ATPazės (SERCA) pompą ir natrio – kalcio mainų sistemą (NCX) (Denniss ir kt., 2020). Tuo pat metu ląstelės membrana atkuria ramybės būseną, repoliarizuojasi, ir ruošiasi kitam susitraukimo – atsipalaidavimo ciklui (Wei ir kt., 2024).



3 pav. Kalcio vaidmuo sužadavimo ir susitraukimo sąsajoje. Žalios rodyklės rodo kalcio patekimą, o mėlynos - kalcio pašalinimą. Pritaikyta iš (Martínez ir kt., 2017)

Organų lygmeniu širdies susitraukimą reguliuoja širdies laidumo sistema. Elektriniai impulsai pradeda sklirti iš sinoatrialinio (SA) mazgo (Kashou ir kt., 2024). Toliau signalas pro specializuotus laidumo kelius ir jungtis tarp kardiomiocitų sklinda į prieširdžius, taip paskatinant sistolinį prieširdžių susitraukimą, kurio metu kraujas yra aktyviai stumiamas į skilvelius (Mezzano ir kt., 2014). Signalas kuriam laikui sustabdomas antioventikuliname (AV) mazge, kad prieš skilvelių susitraukimą prieširdžiai būtų išstūmę visą kraują (Stephenson, 2020). Iš AV mazgo His pluoštu impulsas perduodamas per tarpkilvelinę pertvarą ir taip pasiekia Purkinje skaidulas, kurios šį signalą greit paskirsto per skilvelio miokardą (Feher, 2012; Patra ir kt., 2024). Tai leidžia skilveliams susitraukti sinchroniškai ir palengvinti kraujo išstūmimą, pradedant susitraukimą nuo širdies viršaus (Schwarzwald ir kt., 2009). Tikslus mechaninių susitraukimų ir elektrinių impulsų koordinavimas leidžia širdžiai efektyviai pumpuoti kraują, palaikant nuolatinę deguonies ir maisto medžiagų cirkuliaciją kraujyje (Han ir kt., 2021).

1.1.5. HL-1 ir kitos kardiomiocitų ląstelių linijos

HL-1 yra pirmoji sėkmingai proliferuojanti ir funkcionali iš širdies raumenų ląstelių sukurta kardiomiocitų linija. Ji gauta 1988 m., naudojant AT-1, išskirtas iš pelių prieširdžių naviko (Claycomb et al., 1998). AT-1 ląstelės yra laikomos HL-1 ląstelių pirmtakėmis, tačiau jų auginimo ir atsparumo savybės skiriasi. HL-1 ląstelės pasižymi aukštu išgyvenamumu užšaldymo/atšaldymo cikluose, dėl ko ji tapo tokia populiaria laboratorinių tyrimų metu (Zhang et al., 2011).

Po išsamesnių tyrimų šios ląstelių linijos tyrimų naudojant tiek elektrofiziologinius, tiek imunohistocheminius ir genetinius tyrimus buvo nustatytas panašumas į pirminius kardiomiocitus. Jonų kanalų dėka HL-1 geba generuoti pirminiams kardiomiocitams būdingus veikimo potencialus (White et al., 2004). Atsižvelgiant į tai, išaugo šios ląstelių linijos pritaikymas modeliinių sistemų,

naudojamų širdies biologijos tyrimams molekuliniame ir ląsteliniame lygiuose (Acosta-Torres et al., 2013; Bloch et al., 2016). Negalime teigti, kad HL-1 ląstelių linija pilnai atitinka suaugusių pelių kardiomiocitus. Jų energijos apykaita nėra taip gerai organizuota, tačiau pati ląstelių linija yra sudaryta iš neplakančių ir plakančių ląstelių, kurios padeda pritaikyti ją medžiagų, reguliuojančių viduląstelinę energijos perdavimą ir oksidacinį fosforilinimą, tyrimams (Eimre et al., 2008). Paskutiniaisiais metais išaugo ir HL-1 naudojimas hipoksijos – reoksigenacijos tyrimams. Jų metu pastebėta, kad kai kurios medžiagos, susijusios su Ca^{2+} kanalais, gali susilpninti ląstelių pažaidas šio proceso metu, tokiu būdu sumažinant jų žūties tikimybę. Viena iš tyrimuose naudojamų medžiagų yra cildipinas, kuris yra priskiriamas Ca^{2+} kanalų blokatoriams (Minato et al., 2020).

Be HL-1 ląstelių linijos yra kelios kitos į kardiomiocitus panašios ląstelių linijos, tinkamos naudoti tyrimams, susijusiems su širdies biologija. Viena iš jų – H9c2 mioblastai, kurie gali būti naudojami kaip kardiomiocitų alternatyva. Šios ląstelės geba diferencijuoti į širdies audinio fenotipą, esant tretinoinui (kitai žinomam kaip ATRA (angl. *all-trans retinoic acid*)) ir serumo trūkumui terpėje. Esant šiom sąlygom susidaro daugiabranduolės ląstelės, kurios pasižymi mažu proliferacinių gebėjimu. Vykdam šių ląstelių diferenciaciją padidėja transkriptų ir baltymų, susijusių su kalcio, mitochondrijų apykaita (Branco ir kt., 2015). AC16 yra proliferuojanti žmogaus kardiomiocitų ląstelių linija, kuri buvo gauta suliejus pirmines ląsteles, išskirtas iš žmogaus skilvelių širdies audinio ir SV40 transformuotus uridino auktrofinius žmogaus fibroblastus, neturinčius mitochondrinio DNR (*AC16 Human Cardiomyocyte Cell Line MSDS - SCC109 - Merck, s.a.*). Šios ląstelės naudojamos genų raiškos tyrimuose, siekiant pamatyti transkriptomą persitvarkymą veikiant jas įvairiais išoriniais dirgikliais (Luo ir kt., 2014). Žmogaus indukuotų pluripotentinių kamieninių ląstelių (iPSC) kardiomiocitai naudojami tyrimuose, siekiant regeneruoti po infarkto prarastą širdies audinį (Hsueh ir kt., 2023). Šis ląstelių tipas atrastas pastebėjus, jog neembrioninės kamieninės ląstelės geba diferencijuoti į įvairius ląstelių tipus. iPSC kardiomiocitai yra vienas iš plačiausiai naudojamų ląstelių modelių (Burnett ir kt., 2021).

Tačiau ne visos širdies modelio tyrimuose naudojamos ląstelės yra kardiomiocitai. Vienas iš to pavyzdžių – HEK293 ląstelės. Šios ląstelės yra gautos iš genetiškai modifikuotų žmogaus embrioninių inkstų ląstelių. Nors šios ląstelės nėra kardiomiocitai, tačiau genetinis modifikavimas padeda joms išreikšti pagrindinius jonų kanalus ir tirti širdies elektrofiziologiją (Ponce ir kt., 2018). P19CL6 ląstelės yra gautos iš pelių embriono karcinomos ląstelių linijos ir naudojant specifines aplinkos sąlygas, tokias kaip papildomai pridėtą DMSO, gali būti diferencijuotos į kardiomiocitus panašias ląsteles. Diferencijuotos ląstelės geba išreikšti širdies žymenis, tokius kaip troponinus ir sarkomerinius baltymus, taip pat gali pasireikšti ir spontaniniai ląstelių susitraukimai (Dehne ir kt., 2014).

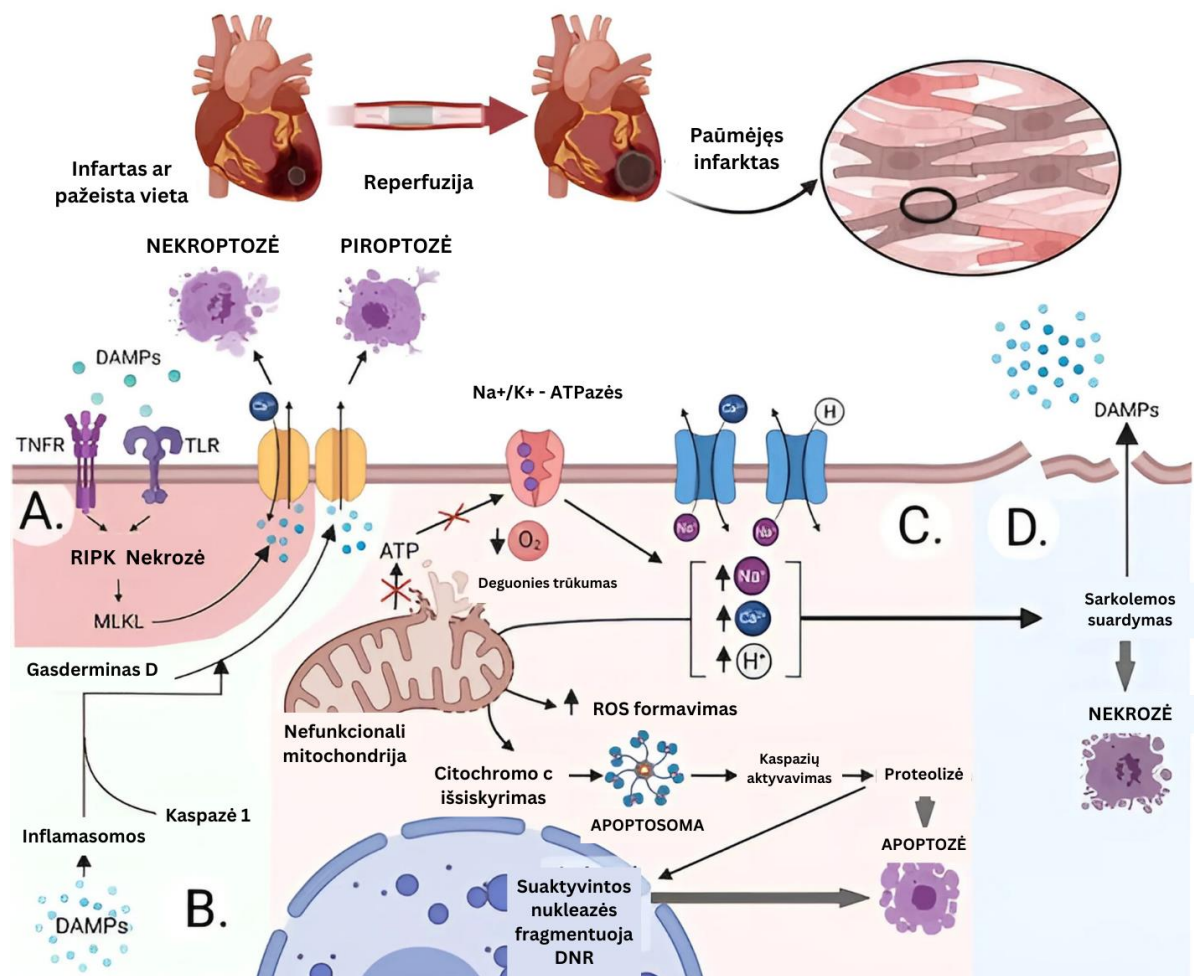
1.2. Išemijos ir reperfuzijos poveikis širdies funkcionavimui

Širdies ligos kelis paskutinius dešimtmečius išlieka opi visuomenės problema, sukelianti didžiąją dalį mirčių, todėl pastaruoju metu daug dėmesio skiriama išeminių širdies sutrikimų tyrimams, prevencijai bei gydymui. Nors apie šio tipo sutrikimus buvo rasta daug informacijos, tačiau jo kompleksiskumas neleidžia lengvai pasiekti norimų rezultatų prevencijos bei gydymo srityse (Severino et al., 2020). Išemija – reperfuzija yra sudėtingas biologinis procesas, sukeliantis pažaidas, galinčias vesti prie ląstelių žūties ir neigiamo poveikio širdies miokardui (Soares et al., 2019).

1.2.1. Išemijos - reperfuzijos mechanizmas

Miokardo infarktas yra viena iš pagrindinių koronarine širdies liga sergančių pacientų mirties priežasčių (Rohani ir kt., 2022). Miokardo infarktas gali būti vienas iš organų išemijos pasekmių. Norint išvengti tolimesnės išemijos, prasideda audinių reperfuzija, kurios metu dėl išemijos – reperfuzijos (I/R) pažeidimo, gali atsirasti dar didesnis neigiamas poveikis organui ir pačiam organizmui (M. Zhang ir kt., 2024).

Išemijos metu dėl deguonies trūkumo ir energijos eikvojimo ląstelių homeostazė sutrinka, atsiranda jonų disbalansas. Šie pokyčiai palaipsniui sukelia oksidacinį stresą ir metabolinę acidozę (Salaudeen ir kt., 2024). Reperfuzijos metu dėl staigaus kraujo tėkmės atsistatymo ir atsistačiusio deguonies aprūpinimo ląstelėse, atsiranda ląsteliniu ir organizmo lygiu žalingų įvykių kaskada. Atsiranda kalcio ir reaktyvių deguonies formų perteklius, atsiveria mitochondrijų pralaidumo perėjimo poros (mPTP) (Ong ir kt., 2015; Zhou ir kt., 2018). Dėl šių atsiradusių pokyčių, sutrinka mitochondrijų funkcija, ATP gamyba ir suaktyvinami ląstelių žūties keliai. Tai veda link kardiomiocitų disfunkcijos, aritmijos, širdies audinio pažeidimų (Schirone ir kt., 2017).



4 pav. Su išemija – reperfuzija susiję molekuliniai mechanizmai Pažeidimai atsiradę išemijos reperfuzijos metu gali vesti prie programuotų ir neprogramuotų ląstelių mirčių. DAMP (Su pažeidimais susijęs molekulinis modeliai) veikdami per skirtingus ląstelės paviršiuje esančius receptorių sukelia nekroptozę. Piroptozę sukelia DAMP aktyvuojant kaspazės ir membranoje susidarant nuo gasdermino priklausomoms poroms. Dėl sutrikusios mitochondrijų funkcijos ir pakitusios kalcio homeostazės, ląstelėje padaugėja reaktyvių deguonies formų, kurių buvimas veda link apoptozės. Membranos plyšimas ir nekrozė yra sukeliami jonų kiekio padaugėjimo ir ląstelės išbrinkimo. Pritaikyta iš (Majka ir kt., 2021)

1.2.2. Išemijos poveikis

Organizmo lygmuo

Išemija yra apibūdinama kaip konkrečios organizmo vietos netinkamas aprūpinimas krauju, dėl šių sričių aprūpinančių kraujagyslių užsikimšimo. Dėl sutrikusio kraujo tiekimo į organą automatiškai jis nėra aprūpinamas ir pakankamu kiekiu deguonies. Išeminė širdies liga dar vadinama koronarine širdies liga arba vainikinių arterijų liga nustatoma tuomet, kai susiaurėja vainikinės širdies arterijos, kurios aprūpina krauju širdies raumenį. Šį susiaurėjimą dažniausiai sukelia aterosklerozė, tai yra susikaupusios apnašos, tačiau prie to gali prisidėti ir susidarę kraujo krešuliai. Nemaža dalis žmonių,

sergančių ankstyvąją vainikinių arterijų liga nejaučia jokių simptomų, tačiau ligai progresuojant apnašų kiekis didėja ir kraujo tėkmė prastėja (Criteria, 2010).

Išemija sumažina širdies pumpavimo efektyvumą, dėl ko sumažėja širdies tūris, arba kitaip tariant, per minutę sugebamo perpumpuoti kraujo kiekis. Šis reiškinys neigiamai veikia ne tik širdį, bet ir kitus organus, kuomet sumažėja visų kūno audinių aprūpinimas krauju, ypač tokių, kuriems svarbi greitesnė medžiagų apykaita, pavyzdžiui smegenys, inkstai, kepenys (King & Lowery, 2024). Organizmui reaguojant į išemiją, vyksta simpatinės nervų sistemos suaktyvėjimas, siekiant palaikyti kraujospūdį ir gyvybiškai svarbių organų perfuziją (Gordan ir kt., 2015). Taip pat yra išskiriami streso hormonai, tokie kaip adrenalinas, kortizolis ir noradrenalinai. Iš pradžių šie hormonai padeda palaikyti kraujotaką, tačiau ilgesnis jų poveikis prisideda prie tolimesnių širdies sutrikimų (Chu ir kt., 2024). Širdies išemija ir pablogėjusi kraujotaka skatina Renino-angiotenzino-aldosterono sistemą (RAAS) padidinti kraujospūdį ir palaikyti perfuziją (Fountain ir kt., 2024).

Miokardo infarktas, dar vadinamas širdies priepuoliu, yra puikus išemijos pavyzdys organizmo lygmeniu. Šis išemijos atvejis pasireiškia sutrikusia širdies raumens, vadinamo miokardu, kraujotakai (Ojha & Dhamoon, 2024). Aterosklerozinės plokštelės plyšimas ir vainikinėse arterijose susidaręs trombas gali užkimšti kraujagysles ir pažeista sritis tuo metu netenka maisto medžiagų ir deguonies. Ilgalaike išemija veda link nekrozės, apoptozės ir infarktuoto audinio susidarymo (audinys, kuris yra miręs dėl kraujo tėkmės sutrikimų). Infarktuotas audinys gali sukelti papildomą uždegiminį atsaką vedantį link fibrozės, kuri pakeičia funkcionalų miokardo audinį randiniu (Badimon ir kt., 2012; Loftus, 2011). Dėl miokardo infarkto sutrinka širdies funkcija, atsiranda širdies nepakankamumo ir aritmijų rizika. Norint sumažinti miokardo išemijos sukeltus pažeidimus labai svarbu nedelsiant, pasitarkiant medicininius įsikišimus, taikyti reperfuzijos strategijas, tokias kaip perkutaninė koronarinė intervencija (PCI) arba trombolizė (Reddy ir kt., 2015).

Ląstelinis lygmuo

Širdies išemija, sutrikęs kraujo ir deguonies tiekimas kardiomiocitams sukelia ląstelių struktūrinių ir biocheminių pokyčių kaskadą. Deguonies trūkumas paskatina medžiagų apykaitos stresą, jonų disbalansą, trikdo ląstelinius procesus (Buja, 2022). Nors žinoma, kad išemija turi neigiamą poveikį kardiomiocitų mitochondrijų ATP gamybai, tačiau nėra žinoma, kuris oksidacinio fosforilinimo kelyje esantis kompleksas yra svarbiausias. Norint susintetinti ATP, reikalingas visos sistemos vientisas veikimas. Kiekvienas iš šių komponentų, įskaitant dehidrogenazės fermentus, elektronų transportavimo grandinę, ATP sintazes ir adenino nukleotidų translokazes. Bet kurio iš šių komponentų pakitimas gali sukelti ir pakitusią mitochondrijų funkciją, pastebimą po išemijos (Kuzmiak-Glancy ir kt., 2022).

Dalis tyrimų rodo, kad išemija skatina autofagiją. Pora išemijos sukeltos autofagijos kelių yra susiję su BNIP38 arba AMPK. Pelės modelyje, kurio širdies miocituose išreikšta neigiama AMPK, autofaginis atsakas į išemiją buvo silpnesnis. Išemijai užsitęsus pagal autolizosomas galima spręsti, kad autofaginis atsakas kažkuriuo metu sutrinka. Tai matoma pagal sumažėjusį LAMP2 baltymo kiekį, kuris yra būtinas autofagosomų ir lizosomų susiliejimui. Šis reiškinys yra lemiamas ROS sukkelto serino ir cisteino proteazių aktyvumo (Chiong ir kt., 2011).

1.2.3. Reperfuzijos poveikis

Širdies reperfuzija, arba kitaip, širdies audinių kraujotakos atstatymas po išemijos periodo, yra vienas iš organizmo būdų norint sumažinti žalą miokardo infarkto metu (Frank ir kt., 2012). Nors reperfuzijos procesas yra būtinas siekiant atkurti prieš tai laikinai sustabdytą maistinių medžiagų ir deguonies tiekimą į audinius, tačiau paradoksaliai, būtent šio atkuriamojo proceso metu atsiranda „reperfuzijos pažeidimas“. „Reperfuzijos pažeidimu“ vadinama dėl staigaus deguonies tiekimo ir kraujotakos atsistatymo atsirandantys papildomi pažeidimai jau ir taip išemijos pažeistuose audiniuose ir ląstelėse (Cowled & Fitridge, 2011).

Organizmo lygmuo

Organizmo lygiu širdies reperfuzija dažnai pasiekama tik medicininės intervencijos metu, kuomet yra atstatoma kraujo tėkmė į užsikimšusias vainikines arterijas. Yra keli pagrindiniai metodai tam atlikti: trombolitinė terapija, vainikinių arterijų šuntavimo operacija arba perkutaninė koronarinė intervencija (PCI). Visos šios procedūros revaskuliarizuoja išemijos pažeistas sritis, pašalinant išemijos priežastis ir atkuriant kraujotaką (Y. Chen ir kt., 2024). Trombolitinė terapija, dar žinoma kaip fibrinolizinė terapija yra gydymo būdas, kurio metu tirpdomi krešuliai, užkimšę kraujagysles. Šio gydymo metu skiriami tromboliginiai vaistai, kurie geba suardyti fibriną. Fibrinas yra pagrindinis baltymas kraujo krešuliuose ir jo ardymas atkuria kraujo tekėjimą į pažeistus audinius. Širdies išemijos metu į veną kuo greičiau leidžiami vaistai, kad būtų vėl atvertos vainikinės arterijos (Baig & Bodle, 2024). Vainikinių arterijų šuntavimas yra chirurginė procedūra, taikoma širdies kraujotakos atkūrimui. Vainikinių arterijų šuntavimo metu yra kuriamas naujas kelias kraujo pratekėjimui, aplenkiant užsikimšusią vietą, persodinant kraujagyslę, paimtą iš kitos organizmo vietos. Šis metodas užtikrina pastovesnį kraujo tiekimą, tačiau dėl didelio invazyvumo yra pavojingesnis (Bachar & Manna, 2024). Perkutaninė vainikinių arterijų intervencija (PCI), dar vadinama angioplastika, yra minimaliai invazinė procedūra. Procedūros metu per riešo ar kirkšnies kraujagyslę į vainikinę arteriją įkišamas kateteris, kurio gale yra balionėlis. Pasiekus užsikimšusią vietą, balionėlis pumpuojamas tol, kol arterijoje susikaupusios apnašos yra prispaudžiamos prie sienelės ir atlaisvinamas kelias kraujo tekėjimui. Norint, kad arterija liktų atvira, naudojamas stentas kuris tuo pačiu dar ir gali išskirti

vaistus, kurie padeda išvengti pakartotinio arterijos susiaurėjimo (Ahmad ir kt., 2024). Atkūrus kraujotaką, maisto medžiagos ir deguonis vėl gali apsiekti išeminį audinį (Bo ir kt., 2021).

Reperfuzijos metu iš pažeistų ląstelių taip pat išsiskiria ir su pažeidimu susiję molekuliniai modeliai (angl. *danger-associated molecular patterns*, DAMP). Organizmas šias medžiagas atpažįsta kaip netinkamo ląstelių funkcionavimo ar pažeidų požymį, todėl siekiant sumažinti žalą ir tinkamai paskirstyti resursus, yra sukeliamas uždegiminis atsakas (Silvis ir kt., 2020). Kraujagysles dengiančios endotelio ląstelės taip pat yra jautrios reperfuzijos procesui. Šio proceso metu ląstelės suaktyvėja, jų pralaidumas padidėja ir gali išsiskirti uždegiminiai mediatoriai, kas skatina kraujagyslių sukibimą su neutrofilais ir trombocitais (Dehghani & Panitch, 2020). Imuninės ląstelės, įskaitant ir neutrofilus, yra nukreipiamos į pažeistą, reperfuzinį audinį ir ten išskiria citokinus, ROS, fermentus, kad pažeistos ląstelės būtų neutralizuotos ir audiniai būtų paruoši atstatymui. Nors šis procesas yra būtinas sėkmingam audinių atstatymui tačiau jo metu dėl papildomai generuojamų ROS ir fermentų, gali būti pažeidžiamos kaimyninės, sveikomis laikytos ląstelės, ir padidinama tikimybė atsirasti audinių edemai (Francisco & Del Re, 2023).

Ląstelinis lygmuo

Reperfuzijos metu, ląstelėms, išemijos metu negavusioms pakankamo kiekio deguonies, jis yra staigiai atstatomas. Tuo metu dėl mitochondrijų, pradedančių gaminti didelį kiekį ROS, įskaitant ir superoksido anijonus, hidroksilo radikalus ir vandenilio peroksidą, yra permušama ląstelių antioksidacinė apsauga ir sukeliamas oksidacinis stresas (Granger & Kvietys, 2015). ROS tiesiogiai pažeidžia baltymus, lipidus, DNR, dėl ko yra pažeidžiamas ląstelių membranų aktyvumas ir sutrikdomos svarbiausios ląstelių funkcijos, skatinant ląstelių žūtį (Su ir kt., 2019). Reperfuzijos metu atsinaujina išemijos metu sutrikusi jonų siurblių veikla ir pradedama atstatyti jonų homeostazė, dėl kurios į kalcis sparčiai patenka į kardiomiocitus ir atsiranda jo perteklius (Wang ir kt., 2020). Rianodino receptoriai neturi galimybės atlaikyti tokio pertekliaus, todėl dalis kalcio yra paleidžiama į citoplazmą. Paleistas kalcis sukelia nekontroliuojamus miokardo susitraukimus, taip pat kalcio kaupimąsi citoplazmoje ir ilgalaikius pačio kardiomiocito pokyčius (Naito et al., 2020). Stiprus stresas ląstelėje gali paskatinti nekrozės, nekontroliuojamos ląstelių mirties, mechanizmą. Šio proceso metu ląstelės turinys išskiriamas į tarpląstelinę erdvę ir sukeliamas uždegimas (Tavernarakis, 2007).

Per didelis kalcio kiekis aktyvina ląstelių struktūras ardančius fermentus, tokius kaip proteazės, nukleazės. Taip pat prisideda prie mitochondrijų pralaidumo perėjimo poros (mPTP) kanalo atsiradimo, taip mažinant mitochondrijų membranų potencialą, dėl ko mažėja ATP gamyba ir didėja ląstelių pažaidos (Matuz-Mares ir kt., 2022). Sumažėjusi ATP sintezė pasunkina energijos pusiausvyros palaikymo procesą (Guo ir kt., 2013). Mitochondrijų funkcijos sutrikimas dažnai

prisideda prie ląstelių žūties proceso. Pažeistos mitochondrijos gali išskirti proapoptozinius veiksnius į citoplazmą, tokius kaip citochromas c, taip pat suaktyvinti kaspazės fermentus, taip inicijuojant programuotą ląstelių žūtį. Nors šis procesas šalina smarkiai pažeistas ląsteles, tačiau tuo pačiu ir mažina funkcionuojančių kardiomiocitų kiekį (Nguyen ir kt., 2023).

1.2.4. Ilgalaikiai išemijos - reperfuzijos padariniai

Ilgalaikis širdies išemijos – reperfuzijos poveikis gali būti labai kompleksinis ir sukelti daugybę komplikacijų, turinčių įtakos ne tik širdies darbui, bet ir kitų organų funkcijai. Nors reperfuzija yra būtina norint išvengti nuolatinio širdies pažeidimo, tačiau paradoksaliai šis procesas sukelia ne ką mažiau pažeidimų, prisidedančių prie ilgalaikių išemijos – reperfuzijos padarinių (Frank ir kt., 2012).

Organizmo lygmuo

Dėl mikrokraujagyslių pažeidimo ir uždegiminių ląstelių sukibimo kai kuriais atvejais stebima mikrokraujagyslių obstrukcija, dar vadinama „neatsinaujinimo“ liga. Šis reiškinys stebimas, kai smulkieji širdies kapiliarai lieka užblokuoti, nors pagrindinėse vainikinėse arterijose jau įvyko reperfuzijos procesas. Dėl šio „neatsinaujinimo“ proceso kai kurios sritys ir toliau lieka sunkiai aprūpinamos deguonimi, o tai tik prailgina išeminį pažeidimą (Bouleti ir kt., 2015). Negalinčios atsistatyti ląstelės, kurios yra per daug pažeistos, yra pakeičiamos fibrozinio audiniu. Dėl fibrozės susidaro randinis audinys, kuris nebegali atlikti funkcijų, būdingų sveikam miokardui. Viena iš jų – susitraukimas. Dėl šios funkcijos sutrikimo sumažėja ir bendras širdies kraujo pumpavimo efektyvumas, kas turi įtakos visų organų funkcijai (Talman & Ruskoaho, 2016). Tai sukelia procesą vadinamą nepalankia skilvelių remodeliacija, ilgainiui gali lemti širdies nepakankamumo išsivystimą (Talman & Ruskoaho, 2016). Dėl išemijos – reperfuzijos gali sutrikti ir širdies laidumo sistema. Dėl jonų pusiausvyros pokyčių atsiranda elektrinio nestabilumo sritys, dėl kurių padidėja rizika aritmijoms, tokioms kaip skilvelių tachikardija ar prieširdžių virpėjimas (Badura ir kt., 2024). Funkcionuojančio širdies raumens netekimas ir padidėjusi fibrozė lemia neigiamą širdies remodeliaciją. Šis persitvarkymas gali lemti širdies nepakankamumo išsivystimą (Park ir kt., 2020). Reperfuzijos metu dėl citokinų ir ROS atsirandantis uždegimas gali pažeisti ir gretimus audinius, o taip pat prisidėti prie sisteminio uždegimo būsenos, kuri dažnai siejama su lėtinėmis ligomis (L. Chen ir kt., 2017).

Ląstelinis lygmuo

Dėl ląstelių negebėjimo išemijos – reperfuzijos metu susidoroti su staigiais deguonies pokyčiais šio proceso metu sutrinka kalcio reguliacija, dėl kurios gali prasidėti aritmija ir ši širdies remodeliacija veda ląsteles link apoptozės ir nekrozės procesų (Kibel et al., 2020). Taip pat vyksta ląstelių adhezijos receptorių aktyvacija, atsirandanti dėl aktyvinto uždegiminio atsako. Šis atsakas sukelia citotoksinių

mediatorių išskyrimą, kuris padidina reaktyvių deguonies formų išskyrimą ir ląstelių pažeidų kiekį (Soares et al., 2019). Šio proceso metu sukelti pokyčiai gali būti priskiriami tiek funkciniais, tiek struktūriniais, tačiau yra neigiami ir vedantys prie ląstelių žūties (Kibel et al., 2020).

Norint palaikyti normalią širdies funkciją ir kardiomiocitų būklę svarbiausia palaikyti ląstelių redokso homeostazę. Sergančių žmonių organizme superoksido anijonų randama du kartus daugiau nei sveiko, kas parodo jų daromą žalą organizmo būklei (Montaigne et al., 2014). Organizme atsiradę negrįžtami oksidaciniai pažeidimai mitochondrijose yra siejami su įvairių širdies ligų atsiradimu. Dėl šios priežasties pradėti ieškoti terapiniai metodai ir pastebėtas į mitochondrijas nukreiptų antioksidantų terapinis potencialas ligų, susijusių su šiomis oksidacinėmis pažeidimais gydyme (Jiang et al., 2020).

1.3. HIF1A svarba išemijai - reperfuzijai

Hipoksiją indukuojantis faktorius 1-alfa (HIF-1 α), tai transkripcijos faktorius, kuris turi svarbų vaidmenį ląstelių reagavime į mažą deguonies kiekį (hipoksiją) ir yra svarbus išemijos – reperfuzijos procese. Išemijos metu, audiniams jaučiant deguonies trūkumą, HIF-1 α stabilizuojasi ir suaktyvėja, yra kaupiamas ląstelėse ir persikelia į branduolį. Ten HIF-1 α prisijungia prie DNR esančių į hipoksiją reaguojančių elementų (HRE) ir skatina genų raišką, kurie padeda ląstelėms prisitaikyti prie hipoksijos sąlygų ir reguliuoti energijos apykaitą (Taylor & Scholz, 2022). Esant normalioms organizmo sąlygoms, HIF-1 α greitai suardomas proteasoma, tačiau esant mažam deguonies kiekiui šis skilimas nevyksta (Ziello ir kt., 2007). HIF-1 α taip pat skatina medžiagų apykaitos perėjimą nuo aerobinės iki anaerobinės. Šis pokytis vyksta reguliuojant glikolinius fermentus ir mažinant mitochondrijų sunaudojamo deguonies kiekį. Tai leidžia ląstelėms generuoti ATP nenaudojant deguonies ir sumažina oksidacinio streso riziką (Lum ir kt., 2007). Indukuojant antioksidacinius genus HIF-1 α mažina ROS kiekį ir užkerta kelią ląstelių pažeidimams. Tai mažina reperfuzijos žalą, apsaugo ląsteles nuo apoptozės ir išsaugo homeostazę (Li ir kt., 2019). HIF-1 α aktyvuoja daugybę genų, susijusių su ląstelių išgyvenimu, pavyzdžiui, kraujagyslių endotelio augimo faktorių (VEGF) ir eritropoetiną. Jie sugeba palaikyti audinių atstatymą ir kraujagyslių stabilumą. VEGF padeda vystyti naujoms kraujagyslėms, gerina perfuziją ir padeda atsigaivinti išemijos pažeistiems audiniams (Pedrosa & Lemes, 2020). Ląstelės aktyvuodamos HIF-1 α gali iš anksto sureguliuoti apsauginius kelius ir taip pasiruošti numatomam reperfuzijos stresui ir sumažinti apoptozės riziką (Shi ir kt., 2007).

1.3.1. Išemijos – reperfuzijos modeliai

Išemijos – reperfuzijos modeliai yra svarbios priemonės tiriant pažeidimo mechanizmus ir kuriant naujas gydymo strategijas. Naudojant juos mokslininkai turi galimybę imituoti išemijos procesą, po kurio seka reperfuzija, įvairiuose organizmo audiniuose, pavyzdžiui širdyje. Šie modeliai

naudojami ir *in vitro* (ląstelių kultūros), ir *in vivo* (gyvūnai), o kiekvienas iš jų gali būti pritaikomas skirtingam pažeidimo aspektui tirti (Paz-Artigas ir kt., 2023).

***In vitro* modeliai**

Norint tirti išemiją – reperfuziją laboratorinėmis sąlygomis, paprastumo dėlei šis procesas yra keičiamas hipoksija – reoksigenacija. Hipoksijos metu audiniai nėra pakankamai aprūpinami deguonimi, sutrinka ląstelių funkcija, o reoksigenacijos metu atsiranda staigus deguonies atsistatymas. Nors išemijos – reperfuzijos idealių sąlygų *in vitro* atkartoti negalima, tačiau tai yra artimiausia aplinka, sukelianti panašius staigius deguonies pokyčius, kurie primena vykstančius *in vivo* (Manninen & Unger, 2016). HL-1 ląstelių linija jau kurį laiką naudojama hipoksijos – reoksigenacijos tyrimuose, norint atrasti būdų, kaip stabdyti neigiamus padarinius, atsirandančius šio proceso metu ir pritaikyti šiuos tyrimus išemijos – reperfuzijos padariniams gydyti (Qiu et al., 2020; Wang et al., 2019).

Reperfuzijos metu, dėl kalcio ir ROS sukeltų mitochondrijų dinamikos pokyčių, kardiomiocituose išryškėja mitochondrijų fragmentacija ir sumažėjusi ATP sintezė. *In vitro* modelių pagalba buvo atrasta, jog tokios medžiagos kaip Mitofuzino-2 aktyvatoriai, kurie geba stabilizuoti mitochondrijų membranos potencialą ir skatinti sintezę, gali paskatinti ATP gamybą ir taip sumažinti ląstelių žūtį (Zacharioudakis ir kt., 2022). Tyrimai taip pat atliekami izoliuotuose kardiomiocituose, kur išemijos – reperfuzijos metu pastebima struktūrinių baltymų, tokių kaip troponinas ir titinas, proteolizė. Nustatyta, kad šią žalą suaktyvina nuo kalcio priklausomų proteazių grupė – kalpaninai. Inhibuojant kalpaninus galima veiksmingai sumažinti struktūrinius pažeidimus, taip išlaikant sėkmingą kardiomiocitų susitraukimo funkciją (Lim ir kt., 2004). *In vitro* eksperimentai naudojant kardiomiocitus, išskirtus iš šunų su širdies sutrikimais, parodė, kad reperfuzijos metu kalcio perteklius greit patenka į citozolį ir mitochondrijas. Šis procesas atveria mitochondrijų pralaidumo pereinamąsias poras (mPTP), sukeliant ląstelių apoptozę ir nekrozę. Pastebėta, kad mPTP inhibitoriai, tokie kaip Ciklosporinas A, geba sumažinti mitochondrijų pažeidimus ir pagerinti kardiomiocitų gyvybingumą (Sharov ir kt., 2006). HL-1 kardiomiocitai taip pat naudojami išemijos – reperfuzijos tyrimuose. Šio tyrimo metu siekta nustatyti proceso įtaką mitochondrijų kristų persitvarkyme, dalijimesi. Ankstyvosios reoksigenacijos metu pastebėtas didesnis OMA1 (proteazės, nukreiptos į OPA1) proteolitinis aktyvumas (Kulek ir kt., 2022). OPA1 (opinė atrofija 1) yra baltymas, padedantis mitochondrijoms palaikyti tinkamą struktūrą ir funkciją. Tai GTPazė susijusi su mitochondrijų susiliejimu ir vidinė mitochondrijų membranos dinamika (H. Lee ir kt., 2017).

***In vivo* modeliai**

Išemijos metu, dėl kraujagyslių užsikimšimo nutrūksta kraujo tiekimas į širdį. Po atliktų tyrimų su pelėmis nustatyta, jog 20 – 30 min. nuo šio proceso pradžios, atsiranda negrįžtami pokyčiai širdies

raumenyje. Po kurio laiko kraujo tiekimas organizme yra atstatomas ir tai vadinama reperfuzija. Pastebėta, kad šio proceso metu, dėl staigaus deguonies sugrąžinimo į audinius ir ląsteles, susidaro reaktyvios deguonies formos ir atsiranda didžioji dalis pažaidų organelėse, įskaitant ir mitochondrijas (Soares et al., 2019).

Išemijos – reperfuzijos mechanizmas *in vivo* tyrimų metu gali būti atkartojamas keliais skirtingais būdais. Vienas iš labiausiai paplitusių metodų, naudojamas mažiems gyvūnams, tokiems kaip pelės ar žiurkės, yra vainikinių arterijų susiaurinimas ir pakartotinė infuzija. Kairioji priekinė nusileidžiančioji (LAD) vainikinė arterija yra užkemšama chirurginiu siūlu, kuris vėliau gali būti atlaisvinamas (Villiers & Riley, 2020). Žiurkėms, kurioms išemija buvo sukelta LAD okliuzijos metodu ženkliai padidėjo infarkto tikimybė, lyginant su kontroline grupe. Išeminėje srityje miokardo audinys tapo nekrotiniu, ypač ilginant išemijos ar reperfuzijos laikotarpius (Connelly ir kt., 1985). Norint tirti išemijos – reperfuzijos mechanizmą didesniuose gyvūnuose, tokiose kaip šunys ar kiaulės, yra naudojama balioninė okliuzija, kurios metu kateteris yra įkišamas į vainikinę arteriją ir pripučiamas balionas kuriam laikui užkemša arteriją ir stabdo kraujotaką (Silva & Emter, 2020). Po reperfuzijos kiaulių miokardo galimybė susitraukinėti sumažėja, dėl šios priežasties sumažėja ir kairiojo skilvelio išstūmimo frakcija. Taip pat stebima sistolinė ir diastolinė disfunkcija (Correia ir kt., 2021). Vairiagyvių modeliuose norint sukelti išemiją yra pasitelkiamas šaltis. Šis staigus temperatūros pokytis suardo baltymus ir formuojant ledo kristalus pažeidžia ląstelių membranas, taip sukeliant apoptozę ir nekrozę (Jewhurst & McLaughlin, 2016).

Išemija - reperfuzija ir modelių palyginimas

In vivo ir *in vitro* širdies išemijos-reperfuzijos (I/R) modeliai svarbūs tiriant pažeidimų mechanizmus bei kuriant gydymo strategijas. Kiekvienas iš modelių turi unikalių privalumų ir trūkumų, todėl kiekvieno aspekto tyrimams reikia kruopščiai pasirinkti tinkamiausią (Kar ir kt., 2024). *In vivo* modeliuose paprastai naudojami graužikai, kuriuose imituojamas išemijos – reperfuzijos mechanizmas organizme. Jais galima atkartoti ne tik pačios širdies sistemos veiklą, tačiau ir jos sąsają su kitomis organizmo sistemomis. Tai padeda sukurti realistišką kontekstą, kaip pažeidimai daro įtaką visam organizmui (van Doorn ir kt., 2024). *In vitro* tyrimuose dėmesys skiriamas izoliuotoms ląstelėms arba audiniams, o patys tyrimai atliekami kontroliuojamomis laboratorinėmis sąlygomis. Šių tyrimų metu tiksliai kontroliuojamo visas tyrimo sąlygas, įskaitant deguonies kiekį, todėl galima tirti ląstelių ir molekulinės reakcijas į išemiją – reperfuziją, atskiriant jas nuo bendros sistemos. Šie modeliai tinka mitochondrijų funkcijos, oksidacinio streso tyrimams (Novakovic ir kt., 2014). *In vivo* modeliai parodo tikroviškesnius atsakus, nes jiems įtakos turi ir amžius, lytis ar net laikymo sąlygos, tačiau dėl šių priežasčių apsunkėja rezultatų atsikartojamumas. *In vitro* metodai neapima daug

kintamųjų, tačiau jų rezultatų atkartojamumas yra daug geresnis (von Kortzfleisch ir kt., 2020) (Hirsch & Schildknecht, 2019).

1.4. Medžiagos apsaugančios nuo išemijos - reperfuzijos

Širdis silpnai geba kaupti didelius energijos kiekius, kurie jai yra reikalingi, todėl energija turi būti sintetinama nuolat. Maždaug trečdalį širdies miocitų tūrio užima mitochondrijos, gebančios pagaminti 95% miokardo ATP. Taip pat mitochondrijos atsako už kalcio homeostazę, redokso būklę ir lipidų sintezę (Murphy et al., 2016). Nustatyta, kad tokios medžiagos kaip antioksidantai, priešūždegiminės medžiagos ir mitochondrijų apsauginės medžiagos geba apsaugoti organizmą nuo išemijos – reperfuzijos pažeidimų (Soares ir kt., 2019).

1.4.1. Antioksidantai apsaugantys nuo išemijos - reperfuzijos

Tyrimai parodė, kad kai kurie į mitochondrijas nukreipti antioksidantai, tokie kaip Mito-TEMPO, MitoSNO, SkQ1, MitoQ, MitoE, SS-20 ir SS-31 potencialiai gali būti naudojami terapiniam mitochondrijų pažeidimų mažinimui ir kai kurių kitų išemijos – reperfuzijos sukeltų simptomų slopinimui (Jiang et al., 2020). MitoQ dėl savo teigiamo krūvio geba mažinti protonų gamybą, ribodamas kvėpavimo grandinės aktyvumą (Bao et al., 2023). Jis buvo naudingas mažinant fibrozę ir gerinant kairiojo skilvelio išstūmimo frakciją (LVEF) graužikų modeliuose miokardo infarkto metu, taip pat užkertant kelią širdies hipertrofijai. Nors ši medžiaga sėkmingai mažina išemijos – reperfuzijos sukeltų padarinių žalą, deja infarkto dydis nepakito, nes MitoQ tiesiogiai neveikia nekrozės (Souza-Neto ir kt., 2022). Sėkmingi ikiklinikiniai MitoQ tyrimų rezultatai paskatino diastolės disfunkcijos ir periferinių arterijų ligos tyrimus (Chatfield ir kt., 2019).

SS-31, dar kitaip vadinamas Elamipretidu, mažina ROS gamybą, saugodamas mitochondrijas nuo depoliarizacijos, membranų pralaidumo susidarymo, Ca^{2+} sukkelto brinkimo, neturėdamas poveikio sveikoms mitochondrijoms (Zhu et al., 2022). Žiurkių modeliuose SS-31 pagerino kairiojo skilvelio išstūmimo frakciją, kas yra pagrindinis širdies funkcijos rodiklis (F.-Y. Lee ir kt., 2018). Tyrimai rodo, kad SS-31 mažina oksidacinio streso žymenų (NOX-1 ir NOX-2), apoptozės ir uždegimo žymenų (Kaspazės-3, suskaidytos TNF-a, Bax) kiekius. Taip pat SS-31 skatino mitochondrijų vientisumo ir apsaugos nuo apoptozės žymenų SIRT1/SIRT3 ir Citochromo C raišką (Fernandez Rico ir kt., 2022; Suo ir kt., 2022). SS-31 naudojimas reperfuzijos metu buvo pranašesnis už placebo efektą ir parodė teigiamą šio antioksidanto poveikį sergant širdies nepakankamumu (Chakrabarti ir kt., 2013).

1.4.2. Priešūždegiminės medžiagos apsaugančios nuo išemijos - reperfuzijos

Uždegimas yra svarbus veiksnys išemijos – reperfuzijos pažeidimo metu. Kadangi citokinai ir imuninės ląstelės didina audinių pažeidimus, priešuždegiminiai vaistai veikia mažinant imuninių ląstelių infiltraciją, uždegiminių citokinų išskyrimą ir kitus uždegimą skatinančius procesus (Soliman & Barreda, 2023). Vienas iš tokių pavyzdžių – kortikosteroidai. Šie stiprūs priešuždegiminiai vaistai slopina citokinų gamybą, tačiau jų naudojimą išemijos – reperfuzijos pažeidimų padariniams yra ribojamas dėl šalutinio poveikio (Yasir ir kt., 2024). Po kortikosteroidų poveikio pagerėja kairiojo skilvelio išstūmimo frakcija (LVEF) gyvūnuose ir sumažėja miokardo infarkto dydis, slopinant uždegimines reakcijas (Francisco & Del Re, 2023; Wand ir kt., 2022). Kortikosteroidai slopina prouždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- α , IL-1 ir IL-6 gamybą, taip pat sumažina oksidacinę žalą, moduliuojant antioksidacinius fermentus, tokius kaip superoksido dismutazė ar katalazė (Francisco & Del Re, 2023; Jin & Kang, 2024).

Išemijos – reperfuzijos pažeidoms mažinti gali būti naudojami ir citokinų gamybą mažinantys bei ląstelių membranas stabilizuojantys statinai, kurie dažniausiai naudojami lipidų kiekio mažinimui (Koushki ir kt., 2020). Jie geba slopinti prouždegiminių citokinų, tokių kaip TNF- α , IL-6 ir IL-1 β , sintezę per poveikį mevalonato keliui, mažinant izoprenoidų gamybą, kurie yra būtini uždegiminiuose keliuose dalyvaujančių mažųjų GTPazių aktyvinimui (Bonsu ir kt., 2013). Statinai taip pat didindami endotelio azoto oksido sintazės (eNOS) aktyvumą, didina azoto oksido (NO) biologinį prieinamumą, taip praplėčiant kraujagysles ir pagreitinant kraujotaką (Gorabi ir kt., 2019). Bendrąją prasme priešuždegiminiai vaistai geba mažinti imuninio atsako poveikį širdies audiniui, apribojant fibrozę ir ląstelių žūtį, ir taip pagerinant atsistatymą po reperfuzijos (Halade & Lee, 2022).

1.4.3. Mitochondrijų apsaugos priemonės

Pagrindiniai pažeidimai išemijos – reperfuzijos metu atsiranda dėl mitochondrijų disfunkcijos nes reperfuzija gali paskatinti mitochondrijų pralaidumo pereinamųjų porų (mPTP) atsidarymą, ATP sintezės sumažėjimą ir ląstelių žūtį. Mitochondrijų apsauginės medžiagos stabilizuoja mitochondrijų funkciją, didina ląstelių energetinį atsparumą ir užkerta kelią mPTP atsidarymui. Ciklosporinas A slopina mPTP atsidarymą išsaugodamas mitochondrijų funkciją ir mažindamas ląstelių žūties tikimybę (Tapia ir kt., 2024). Jis veikia prisijungdamas prie ciklofilino D, kuris yra pagrindinis mPTP reguliatorius ir neleidžia jam atsidaryti. Taip palaikomas mitochondrijų vientisumas, DNR ir baltymai apsaugomi nuo kenksmingų ROS pažeidimų ir inhibuojamas apopototinių faktorių išskyrimas (Mishra ir kt., 2019).

Viena iš mitochondrijas apsaugančių medžiagų - išeminio pirminio kondicionavimo imitatoriai, tokie kaip adenosinas. Jie geba suaktyvinti apsauginius kelius, kurie padidina mitochondrijų atsparumą išemijos – reperfuzijos pažeidimams (Headrick & Lasley, 2009). Išeminis pirminis kondicionavimas (IPC), tai apsauginis mechanizmas, kai sukuriama trumpi išemijos – reperfuzijos

epizodai, taip sukuriant atsparumą ateityje galintiems nutikti ilgesniems išemijos – reperfuzijos procesams. Adenozinas yra vienas iš šio proceso farmakologinių imitatorių, kuris aktyvina tuos pačius molekulinis kelius. (Goldhaber, 1997). Adenozinas geba imituoti APC poveikį, jungdamasis prie adenozino (A1, A2A, A2B ir A3) receptorių širdies ląstelėse. Prisijungimas prie A1 receptoriaus mažina ciklinio AMP kiekį ir taupo energiją išemijos metu, lėtinant širdies ritmą, o prie A2 priešingai – skatina kraujagyslių išsiplėtimą ir reperfuzijos metu gerina kraujotaką, o prisijungimas prie A3 papildomai mažina oksidacinį stresą ir uždegimą (Manjunath & Sakhare, 2009).

Nors melatoninas geriau žinomas dėl savo antioksidacinių savybių, jis taip pat geba stabilizuoti ir mitochondrijų membranas, neleisdamas atsidaryti mPTP (Srinivasan ir kt., 2011). Išemijos – reperfuzijos metu staiga atsistačius kraujotakai susidaro didelis ROS kiekis. Melatoninas neutralizuoja superoksido anijonus, hidroksilo radikalus ir veikia kaip tiesioginis ROS šalintojas. Jis taip pat skatina endogeninių antioksidacinių fermentų aktyvumą, stiprina širdies apsaugą nuo oksidacinių pažeidimų (Abadi ir kt., 2018; Loren ir kt., 2017). Melatoninas mažina uždegimą ir tolesnį audinių pažeidimą slopindamas prouždegiminių citokinų išsiskyrimą, NF- κ B aktyvaciją ir reguliuodamas antiapoptozinius (Bcl-2) ir proapoptozinius baltymus (Bax), taip stabdydamas kardiomiocitų žūtį (Tarocco ir kt., 2019; Tobeiha ir kt., 2022). Mitochondrijas apsaugančios medžiagos skatina palaikyti stabilią ATP sintezę, gerina širdies ląstelių išgyvenamumą, padeda išlaikyti širdies funkciją ir po išemijos – reperfuzijos pažeidimo (Camara ir kt., 2011).

1.5. Kalcio svarba širdies homeostazei

Kalcio homeostazė ir mitochondrijų aktyvumas yra susiję procesai. Kardiomiocituose Ca^{2+} jonų mainai tarp mitochondrijų ir endoplazminio tinklo skatina ląstelių bioenergetiką, o sutrikimai – patologinius procesus. Ca^{2+} jonai citoplazmoje yra svarbūs kardiomiocitų susitraukimui, o mitochondrijų matricoje gali reguliuoti ATP sintezę, veikdamas fermentus ir baltymus. Akivaizdu, kad bet kokie citoplazminio ir mitochondrinio kalcio kiekių ar signalų pokyčiai gali nulemti patologinius procesus. (Rossi et al., 2019).

1.5.1. Kalcio svarba širdies susitraukimui

Kalcis (Ca^{2+}) atlieka svarbų vaidmenį miokardo susitraukimo procese. Jis yra būtinas sužadavimo ir susitraukimo procese, kuomet širdies skaidulos yra skatinamos elektrinio impulso ir taip efektyviai pumpuojamas kraujas. Procesas yra kontroliuojamas tikslaus kalcio jonų judėjimo ir jų reguliavimo kardiomiocituose (Hoang-Trong ir kt., 2015). Širdies plakimas inicijuojamas, kai raumens ląstelę pasiekia elektrinis signalas. Būtent jis skatina ląstelės membranos kalcio kanalų atidarymą ir nedidelio kalcio kiekio patekimą į ląstelę. Nedidelis kalcio kiekio patekimas į ląstelę skatina sarkoplazminiame tinkelyje sukaupto didesnio kalcio kiekio išsiskyrimą. Išskirtas kalcis geba prisijungti prie baltymo, esančio ant plonų aktino gijų ir vadinamo troponinu (Eisner ir kt., 2017).

Dėl šio prisijungimo aktino ir miozino filamenta sąveikauja, todėl raumeninė skaidula sutrumpėja ir raumuo susitraukia. Norint, kad ląstelės atsipalaiduotų, kalcis turi pasišalinti iš citoplazmos. Tam pasitelkiamos pompos, kurios pumpuoja kalcio jonus atgal į sarkoplazminį tinklą ir iš ląstelės. Sumažėjus viduląstelinei kalcio koncentracijai, susitraukimo procesas nutraukiamas, o širdies raumuo atsipalaiduoja iki sekančio impulso (Gash ir kt., 2024). Širdies ritmas dalinai reguliuojamas pagal tai, kaip greitai kalcis gali patekti į kardiomiocitus ir iš jų. Kuo greitesnis kalcio išskyrimas ir pakartotinis pasisavinimas, tuo greitesnis širdies plakimas, o nenormali kalcio apykaita gali sukelti aritmijas (Marks, 2013).

1.5.2. Kalcio signalų pakitimai po išemijos reperfuzijos

Išemijos – reperfuzijos metu širdyje sutrinka kalcio signalų perdavimas, o tai gali sukelti susitraukimo sutrikimą, ląstelių pažeidimus ir net žūtį. Kalcio jonai (Ca^{2+}) atlieka gyvybiškai svarbų vaidmenį, o tam būtinas tikslus kalcio apykaitos reguliavimas reikalingas širdies raumens susitraukimui ir atsipalaidavimui. Tačiau išemijos – reperfuzijos metu dėl pažaidų kalcio signalizacijos keliai dėl energijos trūkumo, oksidacinio streso ir pakitusios ląstelių aplinkos tampa nereguliuojamomis, dėl ko atsiranda kalcio perteklius (Wang ir kt., 2020).

Citoplazminis kalcis

Pastebėta, jog tokie procesai kaip išemija – reoksigenacija ne tik sukelia mitochondrijų pažaidas, tačiau ir sukelia kalcio kiekio svyravimus, kurie normaliomis sąlygomis yra griežtai kontroliuojami. HL-1 kardiomiocituose šis procesas padidina citoplazminio kalcio kiekį, skatina apoptozę, keičia kalcio osciliacijų dažnumą, kas veda link slopinamos ATP gamybos, energijos trūkumo ir programuotos kardiomiocito mirties (Åström-Olsson et al., 2012; Hu et al., 2020). Citoplazminio kalcio kiekis yra svarbus ritmingiems širdies susitraukimui, kalcio jonams patenkant į citoplazmą per L-tipo kalcio kanalus, skatinant papildomą kalcio iš sarkoplazminio tinklo išskyrimą ir jo prisijungimą prie troponino (Bravený, 2002). Norint sukelti atsipalaidavimą, kalcis SERCA siurblių pagalba sugrąžinamas atgal į sarkoplazminį tinklą arba pašalinamas per $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kanalą. Šis citoplazminio kalcio homeostazė užtikrina reguliarų plakimą ir saugo širdį nuo kalcio pertekliaus (Xu & Remmen, 2021).

Išemijos metu dėl sutrikusios ATP sintezės ir energijos trūkumo sutrinka nuo ATP priklausomi kalcio jonų kanalai, kurie padeda palaikyti žemą citoplazminio kalcio kiekį, todėl kalcis pradeda kauptis citoplazmoje (Gusarova ir kt., 2011). Dėl atsiradusių anaerobinių sąlygų, kaupiasi pieno rūgštis ir krenta viduląstelinis pH, sutrikdomas jonų gradientas (ypač Na^+ ir Ca^{2+}), didėja citoplazminio kalcio kiekis (Kalogeris ir kt., 2012). Šių procesų sukeltas citoplazminio kalcio kaupimasis apsunkina atsipalaidavimo procesą ir sukelia pažaidas, skatinamas nestabdomas kalcio kiekio didėjimas (Kristián & Siesjö, 1996).

Reperfuzijos metu atsistačius deguonies pernašai, kalcio kanalai atidaro, kalcis pradeda staigiai plūsti į kardiomiocitus, yra atstatomas jonų gradientas. Šis staigus kalcio pokytis sukelia nemažą dalį reperfuzijos pažeidimų (Wang ir kt., 2020). Šį perteklinį kalcio kiekį gali pasisavinti mitochondrijos, tačiau dėl šios priežasties atsiranda mitochondrinio kalcio perteklius (Walkon ir kt., 2022).

Mitochondrinis kalcis

Kardiomiocitų mitochondrijose sintetinama daugiau nei 90 % ATP, kurio sintezei yra svarbus ir mitochondrinis kalcis (Y. Hu ir kt., 2024). Mitochondrijų kalcis stimuliuoja pagrindinius trikarboksirūgšties (TCA) ciklo fermentus, didina kvėpavimo grandinėje dalyvaujančių redukuojančių agentų NADH, FADH₂ kiekius ir taip prisideda ATP sintezės elektronų transportavimo grandinėje (Zong ir kt., 2024). Kaip jau minėta, mitochondrijos svariai prisideda prie citoplazminio kalcio homeostazės palaikymo, pasisavinant dalį jo. Šis mechanizmas padeda palaikyti tinkamą širdies susitraukimo ir atsipalaidavimo ciklą (Boyman ir kt., 2014).

Išemijos metu dėl deguonies trūkumo yra stabdomas oksidacinis fosforilinimas ir smarkiai sumažėja ATP gamyba. Dėl šios priežasties susilpnėja mitochondrijų funkcija ir yra sutrikdomas kalcio pasisavinimas. Tačiau išeminėmis sąlygomis dėl sulėtėjusios kalcio kanalų veiklos mitochondrinio kalcio kiekis drastiškai nesikeičia (Kristián, 2004). Sumažėjęs mitochondrijų membranų potencialas dar labiau susilpnina kalcio įsisavinimo pajėgumą. Dėl to atsiranda jonų disbalansas ir ląstelės priartėja prie pažeidžiamumo ribos (Matuz-Mares ir kt., 2022).

Reperfuzijos metu, suaktyvėjus kalcio kanalams, mitochondrijos vėl pradeda savintis citoplazminio kalcio perteklių ir taip atsiranda mitochondrinio kalcio perteklius (Murphy & Liu, 2022). Šis perteklius sukelia nespecifinio kanalo mitochondrijų membranose mPTP atsivėrimą. Jis sutrikdo membranos potencialą, leisdamas tirpioms medžiagoms bei jonams laisvai tekėti iš mitochondrijų ir sukelti ATP sintezės sutrikimus, mitochondrijų patinimą bei proapoptotinių faktorių išskyrimą į citozolį (Bernardi ir kt., 2023). Reperfuzijos metu yra skatinamas ir ROS išskyrimas. Didelis ROS kiekis gali pažeisti DNR, baltymus ar lipidus ir dar padidinant pažeidų kiekį ir ląstelių žūties riziką, tęsiant mitochondrijų pažeidų ciklą (Xiang ir kt., 2021).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

Rinkiniai:

„ab14085 - Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit“ – „Abcam“ Waltham, MA, JAV
„alamarBlue®“ - Invitrogen, „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
„CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit“ - Invitrogen, „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
„Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit „ - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV
„Maxima first strand cDNA synthesis kit with dsDNase“ - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
„Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)“ - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
„RNeasy Mini Kit“ – „QIAGEN“ Germantown, MD, JAV

Terpių komponentai:

„Claycomb“ - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV
„DMEM, low glucose, pyruvate“ - Gibco™ „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
„MitoTEMPO“ - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV
„RPMI 1640“ – „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
„trypsin-EDTA“ - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
FBS - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV

Pagalbinės priemonės:

1,5 ml megintuvėliai – „Eppendorf“ Hamburgas, Vokietija
200 ul megintuvėliai - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
96 šulinėlių PGR plokštelė - „Starlab“, Hamburgas, Vokietija.
96 šulinėlių plokštelė spektrometrijai- „Greiner Bio-One“, Kremsmünsteris, Austrija

Pradmenys:

Atp2a – „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
B2m - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
Cacna1c - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
Ryr2 - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV
Slc8a1 – „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV

Dažai:

Cal520 - „Abcam“ Waltham, MA, JAV

Rhod-2 - „Abcam“ Waltham, MA, JAV

Papildomos priemonės:

BSA - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV

Etanolis - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV

Fibronektinas - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV

HL-1 kardiomiocitų linija – „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV

PBS - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV

Plėvelė PGR plokštelėms - „Thermo Fisher Scientific“, Waltham, MA, JAV

Želatina - „Sigma Aldrich“, Sent Luisas, MO, JAV

2.2. Metodai

2.2.1. HL-1 kardiomiocitų kultivavimas

HL-1 kardiomiocitai auginami pagal gamintojo (Merck) protokolą, Claycomb terpėje, papildytoje 10% FBS, penicilinu, norepinefrinu ir L-glutamatu. Ląstelėms pasiekus konfluenciją jos atkabamos su 0,05% tripsina/EDTA tirpalu. Atkėlus ląsteles tripsinas nuklenksminamas auginimo terpe su serumu, ląstelės centrifuguojamos 5 min. 500g. Nukabintos ląstelės suskaičiuojamos FastRead kamera ir užšaldomos arba sėjamos tyrimams. Prieš sėjant ląsteles indai padengiami želatinos/fibronektino tirpalu 1 val. 37°C temperatūroje sluoksniu (mišinys sudarytas iš 10 ml želatinos, 250 µl fibronektino, 39,75 ml vandens). Ląstelės šaldomos 95% FBS ir 5% DMSO terpėje ir saugomos -150°C šaldiklyje.

2.2.2. Ląstelių auginimas hipoksijos-reoksigenacijos sąlygomis

HL-1 kardiomiocitai auginami naudojant skirtingus hipoksijos laikus, naudojant BioSpherix, Xvivo System Model X3 hipoksijos kamerą. Tyrime buvo įvertinta skirtingos terpės, serumas ir kelios deguonies koncentracijos.

Hipoksija-reoksigenacija su 1% O₂. Dalis ląstelių palyginimui tris dienas auginamos normoksijos sąlygomis (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C). Kitos ląstelės po dienos normoksijoje (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) perkeliama į hipoksijos (1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas 24 valandoms, tuomet gražinamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas. Likusi ląstelių dalis pirmas 48 valandas laikomos hipoksijos (1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, tuomet parai perkeliama į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas.

Hipoksija-reoksigenacija su 0,1% O₂ DMEM, RPMI 1640 ir Claycomb terpėse. Iš pradžių HL-1 kardiomiocitai 6 valandas auginami hipoksijos sąlygomis (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) naudojant tris skirtingas terpes: DMEM, RPMI 1640 ir Claycomb. Dalis mėginių laikoma terpėse be serumo, o likusi su papildomai pridėtu 10% serumo. Po 6 valandų ląstelės perkeliama į normoksijos sąlygas (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C). Perkėlimo metu terpės pakeičiamos. Lygiagrečiai dalis to paties sėjimo ląstelių laikomos normoksijos sąlygomis ir naudojamos kaip kontrolinė grupė.

Hipoksija-reoksigenacija su 0,1% O₂ su MitoTEMPO. Ląstelės valandą laiko laikomos Claycomb terpėje su 10% serumo, normoksijos sąlygomis (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) su 1 arba 5 μM MitoTEMPO. Vėliau kardiomiocitai 6 val. perkeliama į hipoksijos sąlygas (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C), prieš tai pakeičiant terpę į RPMI 1640 be arba su 10% serumo. Tada pakeičiama terpė ir ląstelės perkeliama atgal į normoksines sąlygas (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C). Kiekvieno perkėlimo metu keičiant terpę į dalį mėginių papildomai pridėta 1 arba 5 μM MitoTEMPO.

2.2.3. Laktato dehidrogenazės aktyvumas

Tyrimas atliktas naudojant Sigma – Aldrich rinkinį „Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit“. Prieš pradėdant tyrimą reagentai atšildomi iki kambario temperatūros ir atskiedžiami iki reikiamų koncentracijų pagal protokolą. Kolimetrinei analizei paruošiami NADH standartai, dublikatais pridedant 0, 2, 4, 6, 8, 10 μl 1,25 mM NADH standarto ir iki 50 μl pripildant LDH buferiniu tirpalu.

Mėginiai taip pat pilstomi dublikatais, į kiekvieną šulinėlį pilant 15 μl mėginio ir 35 μl LDH buferinio tirpalo. Vėliau, naudojant 48 μl LDH buferinio tirpalo ir 2 μl LDH substrato mišinio (proporcijos nurodytos vienam šulinėliui), paruošiamas reakcijos mišinys. Šis mišinys išpilstomas į visus šulinėlius, gerai papipetuojama ir mėginiai 2-3 minutes, saugant nuo šviesos, inkubuojami švelniai purtant. Tuomet pusvalandį kas 2 min. atliekamas matavimas, ties 450 nm bangos ilgiu, inkubuojant plokštelę 37°C temperatūroje. Spektrofotometrinė analizė atliktas su SpectraMax® i3 (Molecular Devices).

Rezultatai apskaičiuojami pagal protokole nurodytą formulę, naudojant standartinę kreivę.

$$\frac{B}{(Rekacijos\ laikas) \times V} \times \text{mėginio skiedimas}$$

B – sugeneruoto NADH skirtumas tarp galutinio ir pradinio laikų;

V – į šulinėlį įdėto mėginio tūris (mL).

2.2.4. Gyvybingumo nustatymas su alamarBlue™

Tyrimas atliekamas pagal gamintojo Invitrogen protokolo „alamarBlue® Cell Viability Reagent“ rekomendacijas. Nuo ląstelių nusiurbiamą terpę ir pasiruošiamas mišinys, sudarytas iš 9 dalių terpės ir 1 dalies alamarBlue dažo. Į vieną 96 šulinėlį įdedama 150 μl terpės ir dažo mišinio,

inkubuojama 5 % CO₂, 37°C temperatūroje, 3 valandas. Nuo kiekvieno šulinėlio nusiurbama po 100 µl ir matuojama fluorescencija 560 Ex, 590 Em, plokštelėje be dangtelio. Spektrofotometrinė analizė atliktas u SpectraMax® i3 (Molecular Devices).

2.2.5. Ląstelių kiekio nustatymas su CyQuant™

Tyrimas atliekamas naudojant Invitrogen rinkinį „CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas. Po gyvybingumo nustatymo su alamarBlue™, plokštelė su išsėtomis HL-1 ląstelėmis parai yra užšaldoma -70 °C temperatūroje. Matavimo dieną plokštelė atšildoma iki kambario temperatūros. Paruošiamas mL dažymo mišinys: 2.5 µl dažo, 50 µl ląstelių lizės buferio ir 947.5 µl H₂O. Ląstelės su šiuo buferiu inkubuojamos 2-5 minutes kambario temperatūroje, saugant nuo šviesos, o tada matuojama fluorescencija, naudojant sužadinimą ties 480 nm, o emisiją ties 520 nm su SpectraMax® i3 (Molecular Devices).

2.2.6. Aneksino V kiekio nustatymas tėkmės citometru

Tyrimas atliekamas naudojant Abcam rinkinį „ab14085 - Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit „, pagal gamintojo rekomendacijas. Ląstelėms pasirinktu būdu sukeliami apoptozė, kad dažas galėtų patekti į ląstelės vidų. Tiriami mėginiai laikyti 1% arba 0,1% hipoksijos sąlygomis pagal 2.2.2. aprašytą metodą. Matavimo dieną ląstelės atkeliamos pagal 2.2.1 punkte aprašytą metodiką. Ląstelės dažomos 250 µl x buferio su 2.5 µl Aneksino V dažu ir inkubuojama kambario temperatūroje, tamsoje, 5 minutes. Aneksino V-FITC prisijungimas analizuojamas Cytex® Guava® easyCyte™ Flow Cytometer tėkmės citometru (Ex = 488 nm; Em = 530 nm), naudojant FITC signalo detekciją.

2.2.7. Kalcio dažai

Po 6 val. hipoksijos (0,1% O₂) ir 16 val. reoksigenacijos ląstelės dažomos atitinkamoje RPMI 1640 terpėje su arba be serumo. Citoplazminis kalcis dažomas su 3 µM Cal520, o mitochondrinis su 5 µM Rhod-2 5 % CO₂, 37°C temperatūroje, 30 min. Po dažymo terpė pakeičiama, ląstelės vizualizuojamos su EVOS M7000 fluorescenciniu mikroskopu. Kalcio kiekis nustatomas su ImageJ programa.

2.2.8. Genų raiškos įvertinimas HL-1 kardiomiocituose.

RNR gryninimas kolonėlių pagalba. RNR gryninimas atliekamas pagal gamintojo rekomendacijas, naudojant „RNeasy Mini Kit“ protokolą. Nustatomas turimų mėginių tūris ir kiekvienas mėginys papildomas 70% EtOH, kad mėginys su etanolium būtų santykiu 1:1. RNeasy Mini spin kolonėlės perkeliama į 2 ml surinkimo mėgintuvėlį ir ne daugiau nei 700 µl prieš tai padaryto mišinio perkeliama į kolonėlę. Mėginiai centrifuguojami 15 s, 800 x g greičiu, o nucentrifugavus

pašalinamas skystis. Kolonėlės praplaunamos 700 µl RW1 buferio, po to porą kartų 500 µl RPE buferio kartojamas centrifugavimo ir skysčio pašalinimo žingsniai. Kolonėlė perkeliama į naują 2 ml surinkimo mėgintuvėlį ir maksimaliu greičiu centrifuguojama 1 min., siekiant pašalinti likusį skystį ir nusausti kolonėlės membraną. Kolonėlė perkeliama į 1,5 ml surinkimo mėgintuvėlį ir į ją įpilama 20 µl vandens be RNA'zių ir centrifuguojama 1 min, 800 x g greičiu. Norint gauti geresnę RNR koncentraciją, mišinys, gautas nucentrifugavus antrą kartą praleidžiamas per kolonėlę ir centrifuguojamas pagal ankstesnius reikalavimus. RNR koncentracija ir grynumas nustatomi naudojant spektrometrą SpectraMax® i3 (Molecular Devices) ir įvertinant optinį tankį OD260/280.

Kopijinės DNR sintezė. Naudotas „Maxima first strand cDNA synthesis kit with dsDNase“ protokolas pagal gamintojo rekomendacijas. Į atvirkštinės transkripcijos reakciją dedama 250 ng RNR, pridedama papildomai H₂O, kad tūris būtų 8 µl. Į kiekvieną mėgintuvėlį dedama po 1 µl „dsDNase“ ir „10X dsDNase buffer“, mėginiai gerai sumaišomi, nucentrifuguojami ir perkeliama į termociklerį 2 min., kur bus inkubuojami 37°C temperatūroje. Išėmus iš termociklerio, į kiekvieną mėginį įdedama 4 µl „5X Reaction Mix“, 2 µl „Maxima Enzyme Mix“ ir 4 µl vandeniui be nukleazijų. Išmaišius ir nucentrifugavus mėginiai inkubuojami 10 min 25°C, 15 min 50°C, 5 min 85°C.

Tikro laiko polimerazinė grandidinė reakcija (t-l PGR). Realus laiko polimerazinė grandidinė reakcija atliekama naudojant Thermo Scientific™ „Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2X)“. Į vieną PGR reakciją dedama: 6,25 µl Maxima Probe qPCR Master Mix (2X), 1,25 µl 1X ROX, 3,75 µl vandens be nukleazijų, 0,25 µl atitinkamo pradmenys ir pabaigoje įdedamas 1 µl kDNR mėginio. Ant plokštelės paviršiaus užklijuojama permatoma plėvelė, kuri gerai užlyginama, kad nebūtų jokių burbuliukų ir nesandarių tarpų, tuomet plokštelė nucentrifuguojama 1 min. 1200xg, kad visi mišinio tūris nusėstų šulinėlio apačioje. Termocikleryje nustatoma programa (žr. 2.1 lentelė)

Naudoti *Cacna1* ir *Hif1a*, *Ryr2*, *Slc8a1* genų pradmenys, namų ruošos genu pasirinktas *B2m*. Genų raiškos pokytis vertinamas pasitelkiant $\Delta\Delta Ct$ (angl. Cycle threshold) metodą. Čia $\Delta Ct = Ct$ (tiriamo geno) – Ct („namų ruošos“ geno). Kadangi skaičiuojama logaritminėje skalėje, galutinė formulė, pagal kurią išreikšti skaičiavimai yra $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

2.1 lentelė Programa naudojama PGR metu

Žingsnis	Temperatūra, °C	Laikas	Ciklų kiekis
Pradinė denatūracija	95	10 min	1
Denatūracija	95	15 s	40
Atkaitimas	60	60 s	

2.2.9. Statistinis duomenų analizė

Matavimo duomenys pateikti su standartiniu nuokrypiu (SN) iš ne mažiau nei trijų matavimų. Patikimumas atskaičiuotas naudojant Stjudento t statistinį kriterijų p. Duomenys patikimi, kai $p \leq 0,05$.

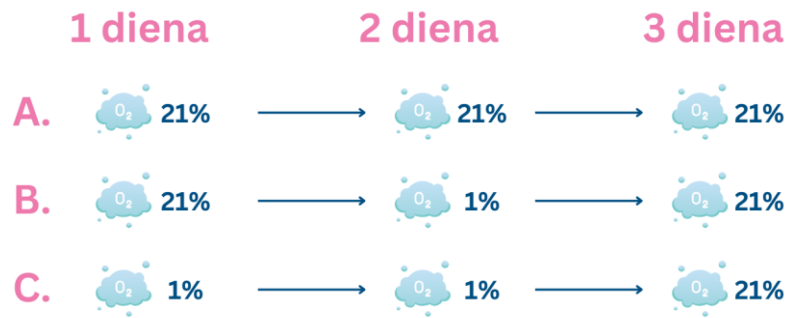
3. Rezultatai

Hipoksijos – reoksigenacijos modelio kūrimas yra svarbus norint tirti patofiziologines sąlygas, tokias kaip išemija – reperfuzija, ne organizmo, o ląsteliniame lygmenyje. Toks modelis leidžia griežtai kontroliuoti sąlygas, kaip hipoksijos laikas, deguonies koncentracija ar maisto medžiagų kiekis, leisdamas geriau suprasti protarpinės hipoksijos vaidmenį kardiomiocitų funkcionavimui. Tyrimai šioje srityje galėtų padėti atrasti terapinius būdus, mažinančius išemijos – reperfuzijos sukeltas pažaidas. Šio tyrimo metu buvo kuriamas hipoksijos – reoksigenacijos *in vitro* modelis, atitinkantis organizme vykstantį išemijos – reperfuzijos mechanizmą. Papildomai buvo įvertintas mitochondrijų antioksidanto MitoTEMPO apsauginis po žalingo hipoksijos – reoksigenacijos poveikio.

Tyrimai atliekami naudojant HL-1 kardiomiocitų liniją, kurią galima dauginti serijiniu būdu, išlaikant biochemines, morfologines ir elektrofiziologines savybes. Šiame tyrime buvo naudojamos dvi skirtingos hipoksijos sąlygos: 1 % O₂ arba 0.1 % O₂. Iš pradžių naudoti ilgesni hipoksijos laikotarpiai (24 ir 48 val.), vėliau nuspręsta juos trumpinti iki 6 val. ir pereiti prie ūmesnės hipoksijos sąlygų. Įvertinta skirtingų terpių ir serumo įtaka ląstelių gyvybingumo parametrų norint surasti žalingiausias hipoksijos - reoksigenacijos sąlygas. Sukėlus negrįžtamas pažaidas buvo nuspręsta paieškoti apsauginių medžiagų, kurios galėtų apsaugoti nuo žalingo hipoksijos reoksigenacijos poveikio. Šiam tikslui buvo pasirinktas mitochondrijų antioksidantas MitoTEMPO, kurio teigiamas poveikis dar mažai tirtas hipoksijos – reoksigenacijos kontekste.

3.1. Hipoksijos - reoksigenacijos tyrimas naudojant 1 % O₂

Remiantis literatūros duomenimis hipoksijos - reoksigenacijos pažaidos gali būti sukeltamos su 1% O₂ (Huang ir kt., 2022), todėl buvo nuspręsta išmėginti hipoksijos sąlygas trunkančias 24 ir 48 valandas pagal pateiktą schemą Claycomb terpėje su 10% serumo (žr. 5 pav.). Iš pradžių buvo įvertintas ląstelių gyvybingumas metaboliniu (AlamarBlue™) ir nemetaboliniu (CyQuant™) metodais, o vėliau nustatytas LDH aktyvumas.

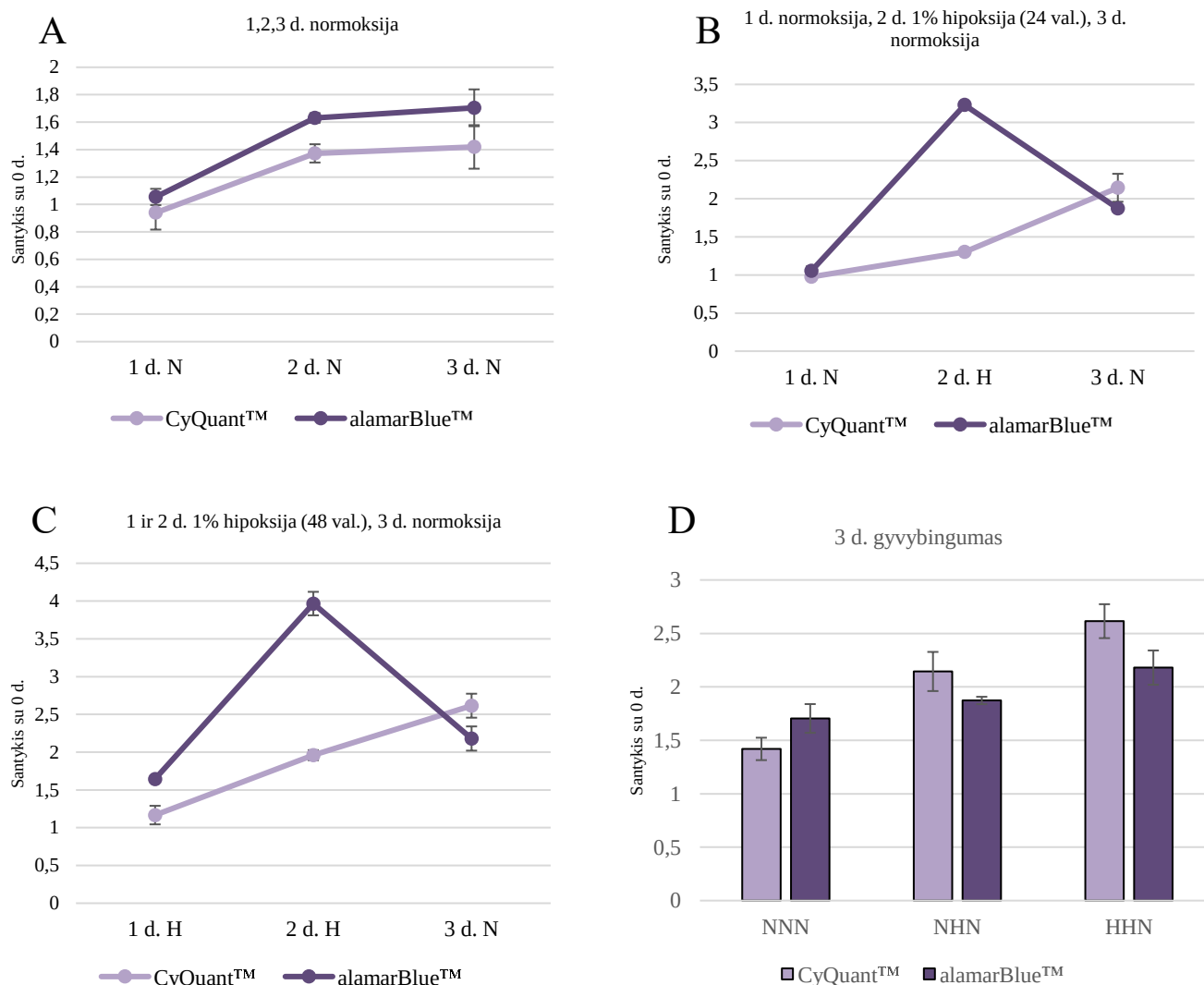


5 pav. HL-1 kardiomiocitų auginimo hipoksijos-reoksigenacijos sąlygomis schema. Ląstelės augintos 1, 2 ir 3 d. normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) ir hipoksijos (1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis Claycomb terpėje su 10% serumo. **A.** Ląstelės visas 3 dienas augintos normoksijos sąlygomis; **B.** Ląstelės pirmą dieną augintos normoksijos sąlygomis, antrą perkeltos į 1% hipoksiją, trečią – atgal į normoksiją; **C.** Pirmą ir antrą dienomis ląstelės augintos 1% hipoksijos sąlygomis, o trečią normoksijos. Įvertintas ląstelių gyvybingumas metaboliniu (alamarBlue™) ir nemetaboliniu (CyQuant™) metodais ir LDH aktyvumo metodu.

3.1.1. Ląstelių gyvybingumo tyrimai naudojant metabolinį ir nemetabolinį metodus

Tyrimas metaboliniu ir nemetaboliniu metodais turėjo atskleisti, ar sumažintas deguonies kiekis turi įtakos ląstelių gyvybingumui. Visi duomenys pateikti 6 pav. normalizuoti su gyvybingumo matavimu dieną prieš eksperimentą normoksijos sąlygomis. Pirmame grafike (žr. 6A pav.) pavaizduota ląstelių kiekio didėjimo tendencija sutampa naudojant abu metodus, tik ląstelių kiekis su nemetaboliniu kiek didesnis.

Antrame grafike (žr. 6B pav.) pavaizduotas ląstelių kiekio kitimas po 24 val. 1% hipoksijoje. Pirmą dieną ląstelių kiekis sutampa, tačiau antrą dieną HL-1 ląstelių metabolinis aktyvumas ryškiai padidėjo lyginat su nemetaboliniu metodu, trečią dieną pastebėtas gyvybingų ląstelių kiekio skirtumo sumažėjimas tarp metabolinio ir nemetabolinio metodų. Įdomu tai, kad antrąją dieną alamarBlue™ metodas parodė gyvybingumo padidėjimą 3 kartus, kai tuo metu CyQuant™ rodė 1,5 karto lyginant su 0 diena. Toks skirtumas rodo, kad alamarBlue™ metabolizmas pagreitėja hipoksijoje (žr. 6B pav.).



6 pav. HL-1 kardiomiocitų gyvybingumas hipoksijos-reoksigenacijos sąlygomis. Ląstelės augintos 1, 2 ir 3 d. normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) ir hipoksijos (1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis Claycomb terpėje su 10% serumo. Įvertintas ląstelių gyvybingumas metaboliniu (alamarBlue™) ir nemetaboliniu (CyQuant™) metodais. **A.** Ląstelės visas 3 dienas augintos normoksijos sąlygomis; **B.** Ląstelės pirmą dieną augintos normoksijos sąlygomis, antrą perkeltos į 1% hipoksiją, trečią – atgal į normoksiją; **C.** Pirmą ir antrą dienomis ląstelės augintos 1% hipoksijos sąlygomis, o trečią normoksijos; **D.** Vaizduojamas gyvybingumas trečią tyrimo dieną. NNN - Ląstelės visas 3 dienas augintos normoksijos sąlygomis, NHN - Ląstelės pirmą dieną augintos normoksijos sąlygomis, antrą perkeltos į 1% hipoksiją, trečią – atgal į normoksiją; HHN - Pirmą ir antrą dienomis ląstelės augintos 1% hipoksijos sąlygomis, o trečią normoksijos. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų ± SN.

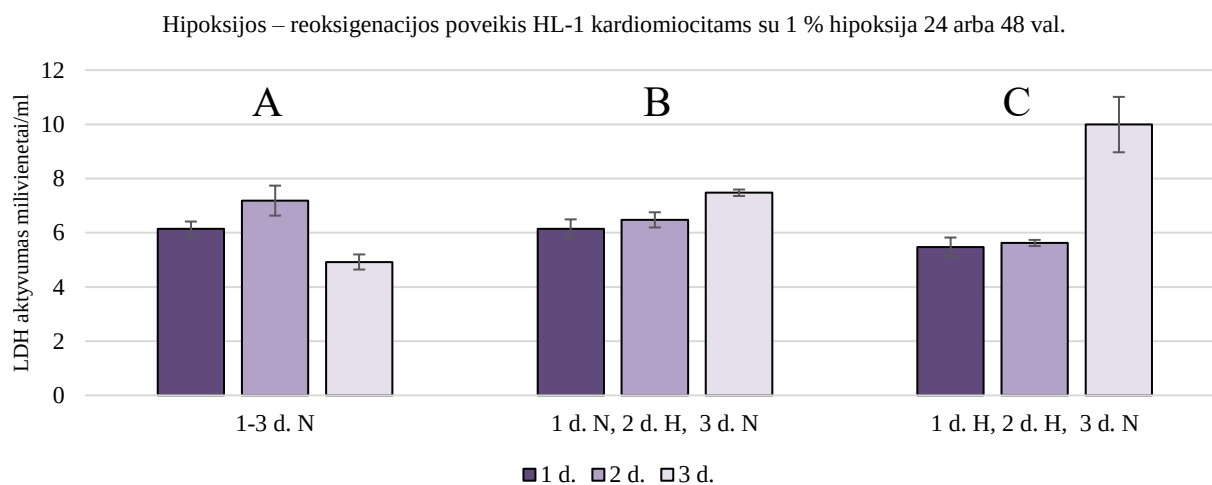
Trečiame grafike pavaizduotas ląstelių kiekio kitimas po 48 val. 1% hipoksijoje. Panašiai kaip ir po 24 val. matomas ryškus HL-1 kardiomiocitų metabolizmo padidėjimas antrą dieną, po kurio trečią dieną seka šio skirtumo sumažėjimas lyginant metabolinį ir nemetabolinį metodus. Antrąją dieną alamarBlue™ metodas parodė gyvybingumo padidėjimą 4 kartus, kai tuo metu CyQuant™ rodė apie 2 kartus lyginant su 0 diena. (žr. 6C pav.). Šis rezultatas dar kartą patvirtina, kad hipoksijos sąlygomis ląstelių metabolizmas kinta.

CyQuant™ metodas nustato nukleorūgščių kiekį ir nėra tiesiogiai susijęs su metabolizmo pokyčiais ir turėtų būti tinkamesnis gyvybingumo įvertinimui. Trečią dieną ląstelių gyvybingumas normoksijoje buvo 1,45, o po 24 val. ir 48 val. 1% hipoksijos - 2,1 ir 2,6 atitinkamai (žr. 6D pav.). Tai rodo, jog hipoksija – reoksigenacija neturėjo žalingo poveikio HL-1 kardiomiocitams, priešingai - turėjo proliferaciją stimuliuojantį efektą. Šie rezultatai su alamarBlue™ ir CyQuant™ paskatino ieškoti alternatyvių metodų hipoksijos – reoksigenacijos pažaidoms aptikti.

3.1.2. Ląstelių gyvybingumo tyrimas naudojant LDH aktyvumo nustatymą

Kadangi ląstelių gyvybingumo tyrimų naudojant metabolinį ir nemetabolinį metodus rezultatai buvo prieštaringi, o patys tyrimai nepakankamai jautrūs, todėl papildomai buvo tirtas laktatdehidrogenazės (LDH) aktyvumas. Šis metodas yra pagrįstas tarpląstelinio fermento, žinomo kaip LDH, išskyrimu po ląstelių pažeidimų, dažnu atveju siejamų su įvairiais ląstelių žūties mechanizmais.

Laikant ląsteles normoksijos sąlygomis pastebėta, kad LDH kiekis buvo didžiausias antrąją tyrimo dieną, o trečiąją sumažėjo nuo 7 milivienetų/ml iki 5 milivienetų/ml ir buvo net mažesnis nei pirmąją (žr. 7A pav.).



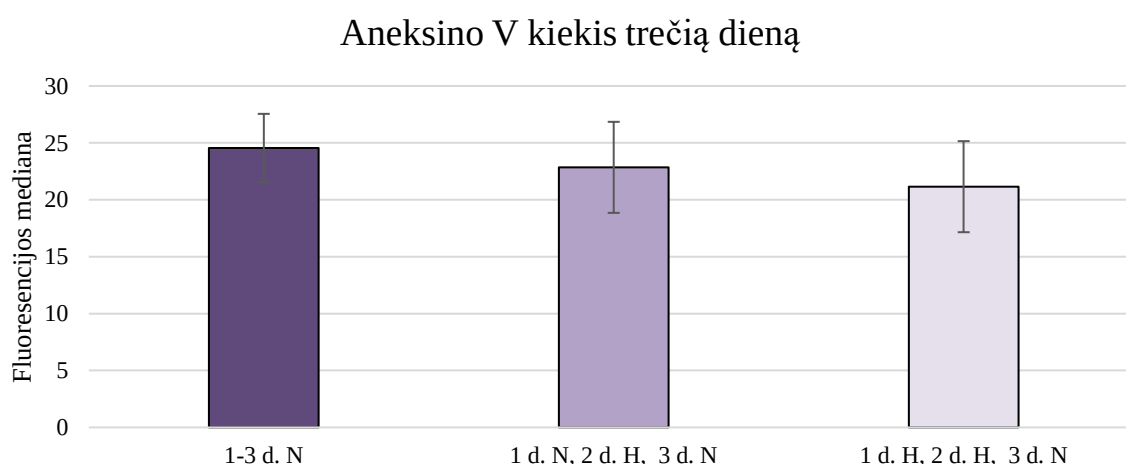
7 pav. HL-1 kardiomiocitų gyvybingumas hipoksijos-reoksigenacijos sąlygomis. Ląstelės augintos 1, 2 ir 3 d. normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) ir hipoksijos (1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis Claycomb terpėje su 10% serumo. Įvertintas ląstelių gyvybingumas naudojant LDH aktyvumo metodą. **A.** Ląstelės visas 3 dienas augintos normoksijos sąlygomis; **B.** Ląstelės pirmą dieną augintos normoksijos sąlygomis, antrą perkeltos į 1% hipoksiją, trečią – atgal į normoksiją; **C.** Pirmą ir antrą dienomis ląstelės augintos 1% hipoksijos sąlygomis, o trečią normoksijos. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų ± SN

Ląsteles auginant 24 val. 1% hipoksijoje buvo stebimas nežymus LDH aktyvumo padidėjimas nuo 6 milivienetų/ml pirmąją dieną iki 7,5 milivienetų/ml trečiąją dieną (žr. 7B pav.). LDH aktyvumo padidėjimas buvo ryškiausias po 48 val. hipoksijos, jis išaugo nuo 5,5 milivienetų/ml pirmąją dieną

iki 10 milivienetų/ml trečiąją dieną (žr. 7C pav.). Palyginus trečios dienos LDH aktyvumus galima teigti, kad po 48 val. hipoksijos LDH kiekis buvo didžiausias. Tikėtina, jog tai yra susiję su ląstelės membranos pažeidimais.

3.1.3. Ląstelių apoptozės nustatymas su Aneksinu V

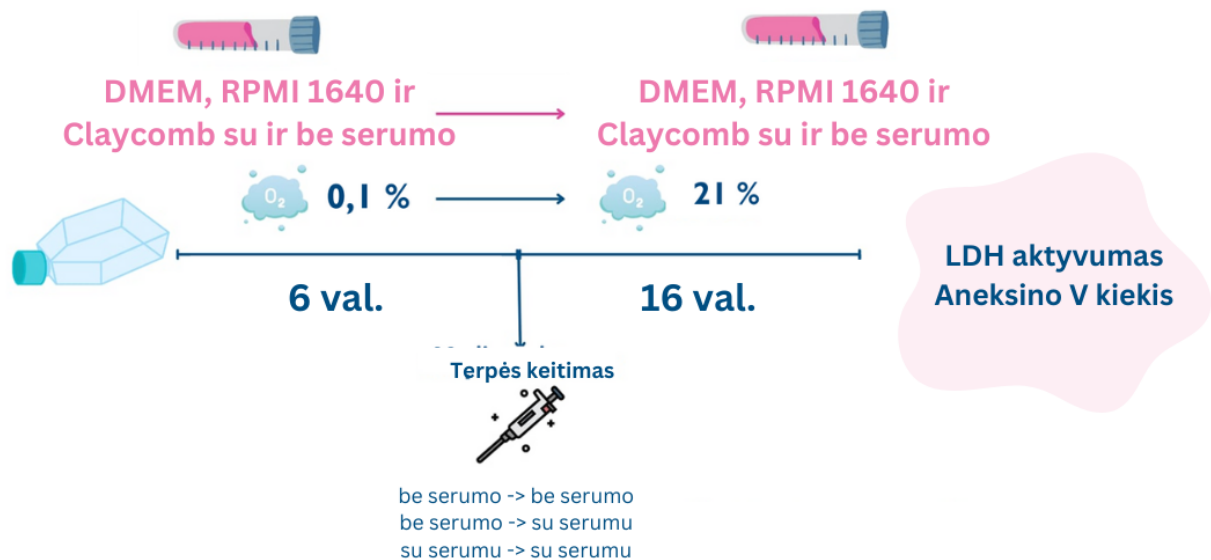
Padidėjęs LDH kiekis terpėje gali būti susijęs su plazminės membranos pažeidimais ir programuota ląstelių žūtimi, todėl buvo nuspręsta įvertinti ankstyvąją ląstelių apoptozę normoksijoje ir 1% hipoksijoje po 24 val. arba 48 val. (žr. 8 pav.). Įvertinus Aneksino V kiekį nebuvo pastebėti ryškūs skirtumai tarp normoksijos ir hipoksijos mėginių. Šis rezultatas paskatino ieškoti griežtesnių hipoksijos – reoksigenacijos sąlygų.



8 pav. HL-1 kardiomiocitų Aneksino V kiekis trečią dieną HL-1 hipoksijos-reoksigenacijos sąlygomis. Ląstelės augintos 1, 2 ir 3 d. normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) ir hipoksijos (1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis Claycomb terpėje su 10% serumo. Įvertintas ląstelių gyvybingumas naudojant Aneksino V kiekio nustatymo metodą. **1-3d. N** - Ląstelės visas 3 dienas augintos normoksijos sąlygomis; **1d. N, 2d. H, 3d. N** - Ląstelės pirmą dieną augintos normoksijos sąlygomis, antrą perkeltos į 1% hipoksiją, trečią – atgal į normoksiją; **1d. H, 2d. H, 3d. N** - Pirmą ir antrą dienomis ląstelės augintos 1% hipoksijos sąlygomis, o trečią normoksijos. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų ± SN

3.2. Hipoksijos - reoksigenacijos tyrimas naudojant 0.1 % O₂

Hipoksija su 1% deguonimi nebuvo pakankamas stimulus sukelti ankstyvą apoptozę, todėl buvo nuspręsta išmėginti griežtesnes hipoksijos – reoksigenacijos sąlygas. Pasirinktas ūmios hipoksijos modelis su 0,1% O₂ koncentracija. HL-1 kardiomiocitai buvo auginami 6 val. 0,1% O₂, o po to vykdoma 16 val. reoksigenacija. Šiame tyrimų etape buvo nuspręsta išmėginti ne tik HL-1 kardiomiocitams skirtą terpę - Claycomb, bet ir kitas terpes, tokias kaip DMEM ir RPMI 1640. Papildomai ląstelės augintos su ir be serumo, norint įvertinti terpių, serumo ir hipoksijos reoksigenacijos įtaką ląstelių gyvybingumui ir apoptozei (žr. 9 pav.).



9 pav. Hipoksijos – reoksigenacijos sąlygų optimizavimo schema. Sąlygų optimizavimo metu buvo naudojamos trys terpės – DMEM, RPMI 1640 ir Claycomb, su arba be papildomai pridėto serumo. Ląstelės pirmas 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, tuomet pakeičiama terpė ir ląstelės 16 val. perkeliamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Tyrimo metu surinktos terpės naudojamos LDH aktyvumo tyrimams, o ląstelės – Aneksino V kiekio tyrimui naudojant tėkmės citometriją.

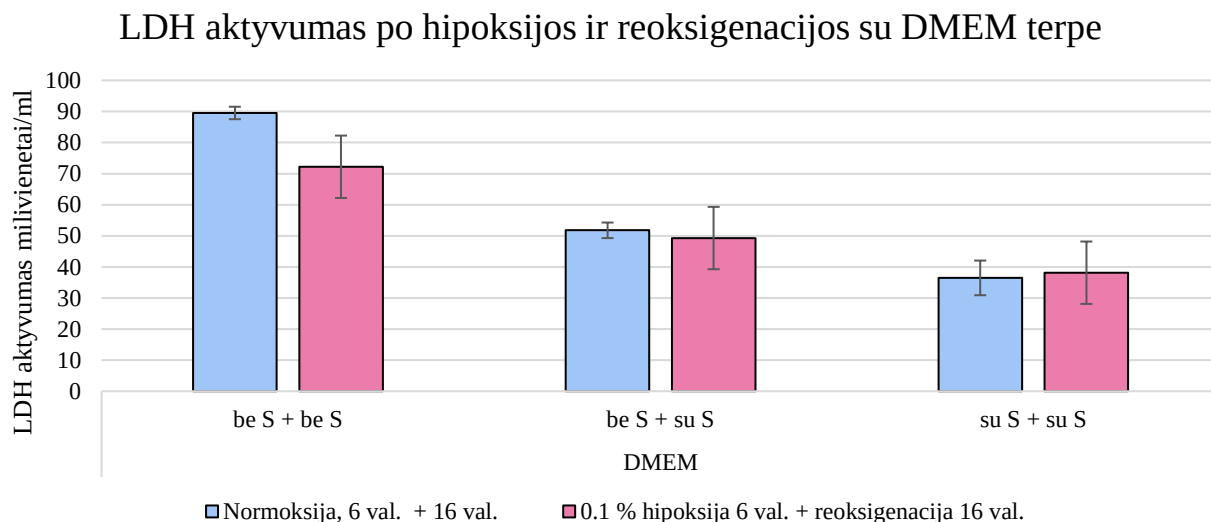
3.2.1. Skirtingų terpių įtaka HL-1 ląstelių LDH aktyvumui po hipoksijos - reoksigenacijos

Skirtingos ląstelių auginimo terpės pasižymi skirtinga sudėtimi ir maistinių medžiagų kiekiu, galinčiu nulemti jų atsakamą į hipoksiją – reoksigenaciją, todėl tyrimas tuo pat metu atliekamas naudojant DMEM, RPMI 1640 ir Claycomb terpes. Norint sukurti ekstremalesnes sąlygas, sumažinamas maistinių medžiagų kiekis, todėl dalyje tyrimo naudojamos terpės be serumo.

Ląstelės pirmas 6 tyrimo valandas lygiagrečiai buvo auginamos normoksijos ir 0,1% hipoksijos sąlygomis terpėje su serumu (su S) ar be (be S) jo. Po to dalyje mėginių terpė iš beseruminės keičiama į atitinkamą beseruminę arba seruminę, šulinėliuose su serumu terpė keičiama į seruminę (žr. 9 pav.). Eksperimento dieną HL-1 kardiomiocitai buvo laikomi 6 val. normoksijoje arba 0.1% hipoksijoje, o po to keičiama terpė ir hipoksijoje esančios ląstelės perkeliamos į normoksiją 16 val. Praėjus 22 val. paimamas mėginys LDH aktyvumo nustatymui. Terpės keitimas po 6 val. turėtų greičiau atstatyti deguonies lygį ląstelės iki normoksinio lygio, bei sukelti atitinkamas pažaidas dėl suaktyvėjusio oksidacinio fosforilinimo (H. Zhang ir kt., 2022).

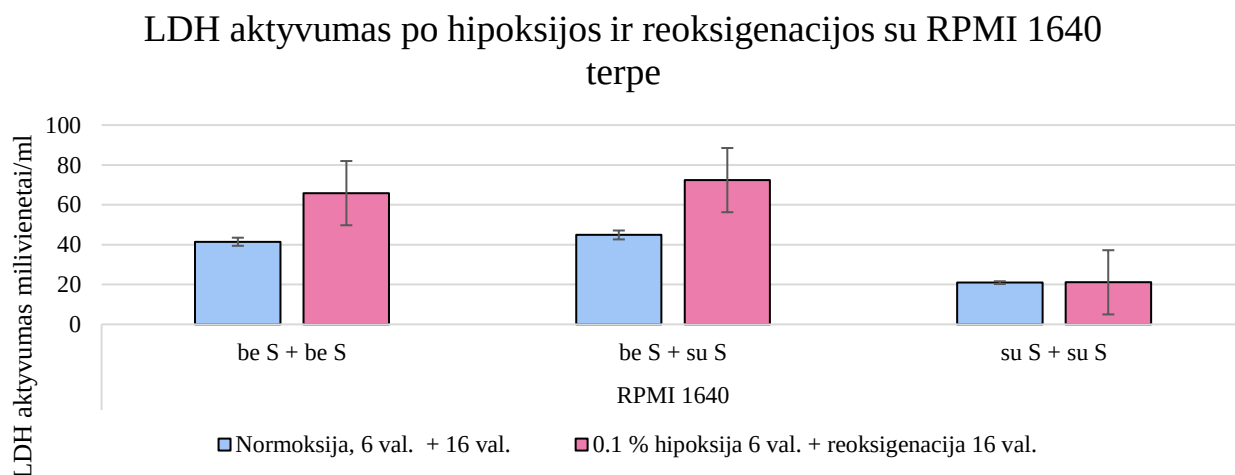
Išskirto LDH aktyvumas DMEM terpėje buvo gana panašus visose eksperimentinėse grupėse lyginant normoksiją ir hipoksiją. Eksperimentinėje grupėje, kur beseruminė terpė buvo keičiama į beseruminę terpę LDH aktyvumas hipoksiniame mėginyje buvo net mažesnis. Antroje grupėje po 6

valandų pakeitus terpę ir papildžius ją serumu, hipoksijos ir normoksijos sąlygomis pastebimas panašus išsiskyrusio LDH kiekis, o trečioje grupėje stebimas panašus rezultatas. Bendrai serumo nebūvimas skatino didesnę LDH išskyrimą į terpę, kas gali būti susiję su plazminės membranos pažeidimais (žr. 10 pav.).



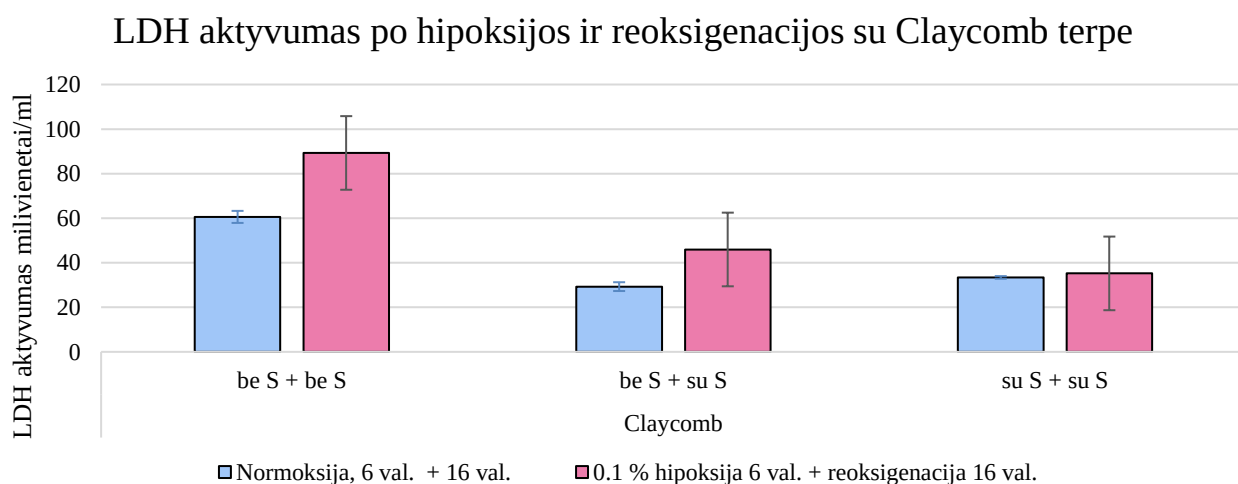
10 pav. LDH aktyvumas po hipoksijos ir reoksigenacijos naudojant DMEM terpę. Tyrimo metu naudota DMEM terpė, su arba be papildomai pridėto serumo. Ląstelės pirmas 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, tuomet pakeičiama terpė ir ląstelės 16 val. perkeliamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas. Terpės keitimo metu dalies mėginių, augintų be serumo terpė buvo papildyta serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų ± SN

Ląstelių auginimui naudojant RPMI 1640 terpę LDH aktyvumo didėjimas po 0,1% hipoksijos buvo stebimas keičiant beseruminę terpę į beseruminę ir beseruminę terpę į seruminę. Terpės keitimas iš seruminės į seruminę neturėjo įtakos LDH aktyvumo kitimui lyginant normoksiją ir hipoksiją. Bendrai serumo nebūvimas skatino didesnę LDH išskyrimą normoksijos ir 0,1% hipoksijos eksperimentinėse grupėse (žr. 11 pav.).



11 pav. LDH aktyvumas po hipoksijos ir reoksigenacijos naudojant RPMI 1640 terpę. Tyrimo metu naudota RPMI 1640 terpė, su arba be papildomai pridėto serumo. Ląstelės pirmas 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, tuomet pakeičiama terpė ir ląstelės 16 val. perkeliamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas. Terpės keitimo metu dalies mėginių, augintų be serumo terpė buvo papildyta serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų ± SN

Claycomb terpėje augintos ląstelės pasižymėjo panašiomis tendencijomis kaip ir augintos RPMI 1640. Tyrimo metu nenaudojant terpės su serumu, hipoksijos sąlygomis išsiskyrusio LDH kiekis po hipoksijos buvo 1,5 karto didesnis nei normoksijoje. Toks pat skirtumas stebimas ir tyrimo metu terpę be serumo pakeičiant terpę su serumu. Viso tyrimo metu naudojant terpę su serumu tiek normoksijos, tiek hipoksijos sąlygomis stebimas panašus LDH kiekio išsiskyrimas (žr. 12 pav.).



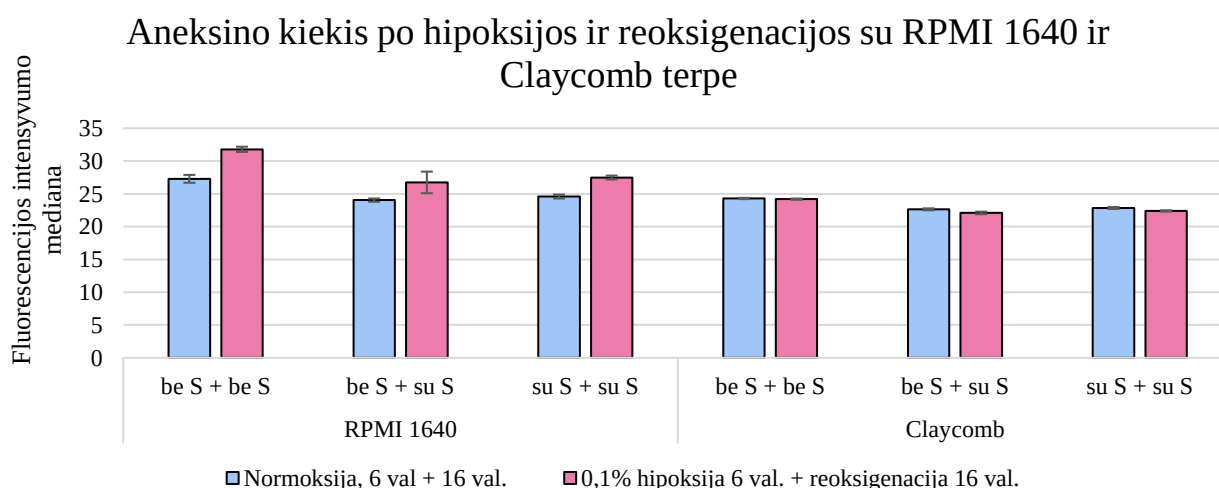
12 pav. LDH aktyvumas po hipoksijos ir reoksigenacijos naudojant Claycomb terpę. Tyrimo metu naudota RPMI 1640 terpė, su arba be papildomai pridėto serumo. Ląstelės pirmas 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, tuomet pakeičiama terpė ir ląstelės 16 val. perkeliamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas. Terpės keitimo metu dalies mėginių, augintų be serumo terpė buvo papildyta serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų ± SN

Tikėtina, kad hipoksijos – reoksigenacijos procesas pažeidžia ląstelių membranas ir skatina jas apoptuoti, išskiriant didesnį kiekį LDH. Serumo įtaka visose terpėse buvo panaši – be jo ląstelės išskiria daugiau LDH, kas gali būti susiję su HL-1 apoptoze. RPMI 1640 ir Claycomb terpėse po hipoksijos - reoksigenacijos buvo stebimas LDH aktyvumas padidėjimas lyginant hipoksiją su normoksija. Šis rezultatas paskatino toliau gilintis į hipoksijos – reoksigenacijos mechanizmus, lyginant RPMI 1640 ir Claycomb terpių poveikį HL-1 kardiomiocitų gyvybingumui. DMEM terpėje nebuvo stebimas padidėjęs LDH kiekis po hipoksijos, todėl tolimesniems tyrimams šios terpės buvo atsisakyta.

3.2.2. Skirtingų terpių įtaka HL-1 ląstelių apoptozei po hipoksijos - reoksigenacijos

Hipoksijos – reoksigenacijos procesas skatina ląsteles apoptuoti, o šiam procesui įvertinti galima pasitelkti tėkmės citometriją. Tyrimui pasirinktas Aneksinas V, kuris geba prisijungti prie išoriniame plazminės membranos sluoksnyje esančio fosfatidilserijo ir taip atpažinti apoptuojančias ląsteles. Metodas ypač jautrus, nes nustato ląstelių apoptozę ankstyvoje stadijoje.

Tyrimo metu pastebėta, kad Aneksino V kiekis auginant ląsteles RPMI 1640 terpėje, nepaisant serumo naudojimo ar nenaudojimo, buvo 1,2 karto didesnis hipoksijos sąlygomis nei tuo pat metu ir tokiomis pačiomis sąlygomis augintų ląstelių normoksijos sąlygomis. Claycomb terpėje augintose ląstelėse skirtumai tarp Aneksino V kiekio terpėje esant ir nesant serumo, auginant normoksijos ar hipoksijos sąlygomis nepastebimi (žr. 13 pav.). Dėl šios priežasties Claycomb terpė tolimesniuose tyrimuose nebenaudota, o pasirinkta RPMI 1640 terpė, kuri turi mažiau maistinių medžiagų.

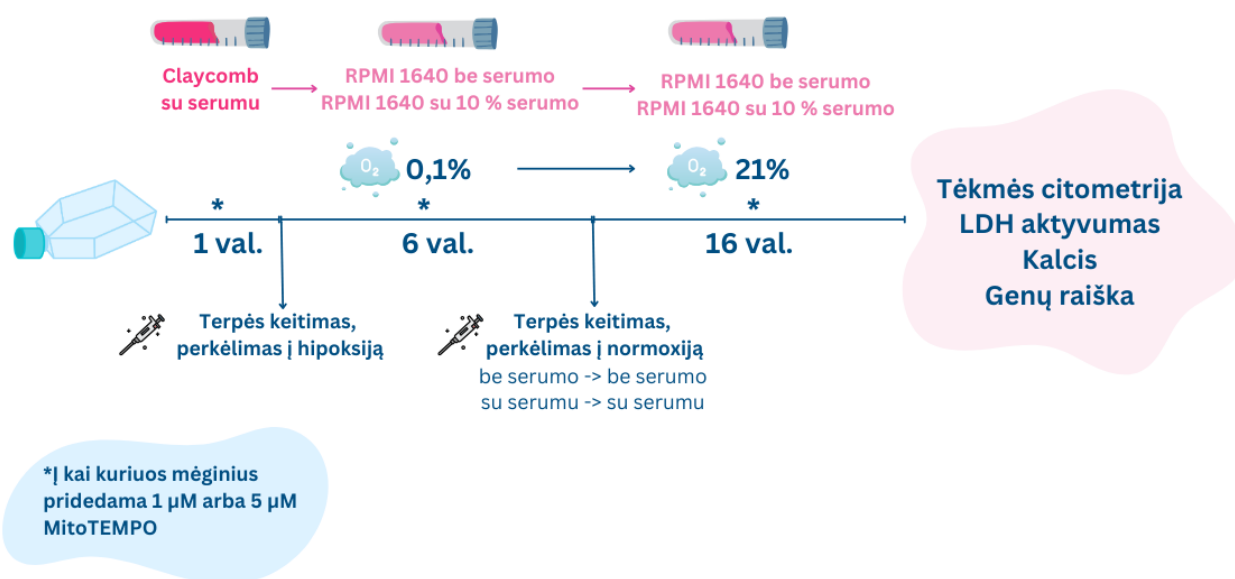


13 pav. Aneksino V kiekis po hipoksijos ir reoksigenacijos naudojant skirtingas terpes. Tyrimo metu naudotos RPMI 1640 ir Claycomb terpės, su arba be papildomai pridėto serumo. Ląstelės pirmas 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, tuomet pakeičiama terpė ir ląstelės 16 val. perkeliamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas. Terpės keitimo metu dalies mėginių, augintų be serumo terpė buvo papildyta serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų ± SN

3.3. MitoTEMPO poveikis HL-1 ląstelėms po hipoksijos - reoksigenacijos

Po hipoksijos – reoksigenacijos ląstelėse yra sukeliamas oksidacinis stresas, kurio pasekmė yra pažeistos organelės bei ląstelių plazminė membrana. Šie pažeidimai lemia laktato dehidrogenazės išskyrimą į tarpląstelinę erdvę, padidėjusią apoptozės riziką, pakitusią kalcio homeostazę ir genų raišką. Manoma, kad į mitochondrijas nukreipti antioksidantai, tokie kaip MitoTEMPO, gali sumažinti oksidacinę žalą po hipoksijos – reoksigenacijos. Šiame tyrimų etape buvo nupręsta įvertinti apsauginį MitoTEMPO poveikį po hipoksijos – reoksigenacijos pažeidimų.

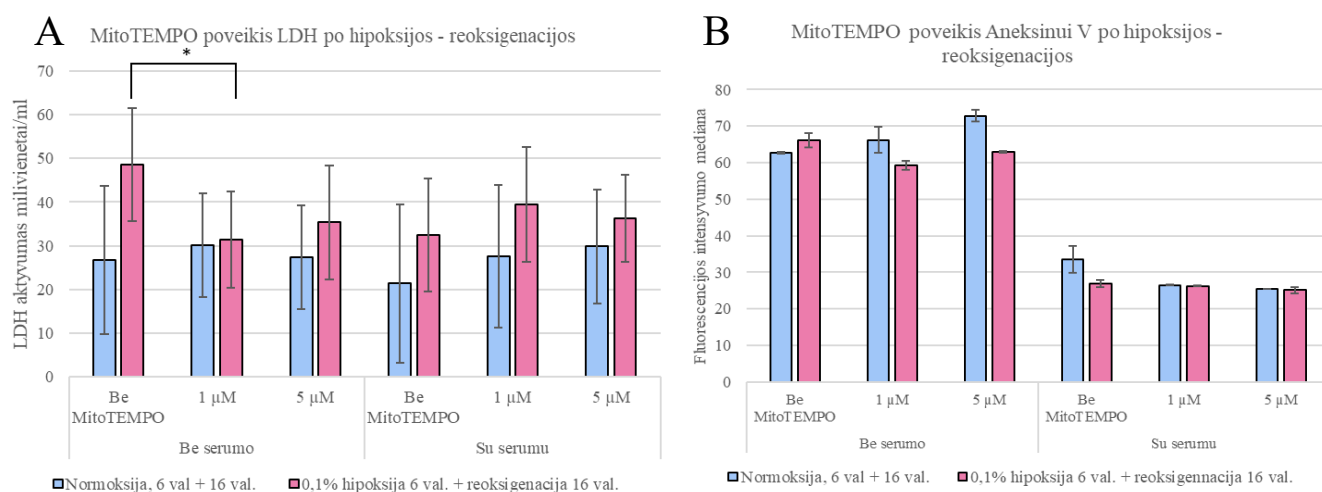
Eksperimento dieną HL-1 kardiomiocitai buvo auginami valandą laiko augintos Claycomb terpėje su 1 μ M arba 5 μ M MitoTEMPO. Po valandos, terpė pakeičiama į RPMI 1640 (su arba be serumo), pridendant antioksidanto, ir ląstelės perkeliama į hipoksijos sąlygas, kur yra laikomos 6 valandas. Dalis ląstelių tą laikotarpį laikomos normoksijos sąlygomis, kad būtų galima palyginti hipoksiją. Po šio laikotarpio ląstelės perkeliama į normoksijos sąlygas, pakeičiama terpė ir laikomos ten 16 valandų. Tyrimo pabaigoje nuo ląstelių surenkamos terpės, kurios bus naudojamos LDH aktyvumo nustatymui, o pačios ląstelės naudojamos tėkmės citometrijos, kalcio ir genų raiškos tyrimams (žr. 14 pav.).



14 pav. MitoTEMPO poveikio tyrimas hipoksijos – reoksigenacijos sąlygų metu. Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O_2 , 5 % CO_2 , 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpė pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0,1 % O_2 , 5 % CO_2 , 37°C) sąlygomis. Tuomet terpė pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkeliama į normoksijos (21 % O_2 , 5 % CO_2 , 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridedama 1 arba 5 μ M MitoTEMPO. Tyrimo metu surinktos terpės naudojamos LDH aktyvumo ir genų raiškos tyrimams, o ląstelės – Aneksino V kiekio tyrimui naudojant tėkmės citometriją ir kalcio tyrimams.

3.3.1. MitoTEMPO poveikis HL-1 LDH aktyvumui ir apoptozei po hipoksijos reoksigenacijos

Norint ištirti MitoTEMPO poveikį reoksigenacijos metu, po 22 tyrimo valandų matuotas LDH aktyvumas ir Aneksino V kiekis. Pastebėta, jog ląsteles auginant terpėje be serumo, normoksijos sąlygomis, MitoTEMPO neturėjo žalingo poveikio, o LDH aktyvumas nebuvo didesnis. Terpėje be serumo, hipoksijos sąlygomis, matomas apsauginis antioksidanto poveikis, kuomet nenaudojant MitoTEMPO LDH kiekis buvo didesnis 1,5 karto, nei naudojant 1 μ M koncentraciją. Naudojant 5 μ M koncentraciją apsauginis poveikis buvo silpnesnis. Terpėje su serumu, tiek normoksijos, tiek hipoksijos sąlygomis MitoTEMPO skatino LDH išsiskyrimą (žr. 15A pav.)



15 pav. MitoTEMPO įtaka LDH aktyvumui ir Aneksino V kiekiui hipoksijos – reoksigenacijos.

Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpė pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis. Tuomet terpė pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkeliama į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridedama 1 arba 5 μ M MitoTEMPO. **A.** MitoTEMPO poveikis LDH aktyvumui po hipoksijos – reoksigenacijos; **B.** MitoTEMPO poveikis Aneksinui V po hipoksijos – reoksigenacijos. Aneksino V duomenys pateikti iš keturių pamatavimų iš dviejų eksperimentų $\pm$ SN, o LDH duomenys pateikti iš trijų pamatavimų iš trijų eksperimentų. (*) Duomenys patikimi lyginant su normoksiją su hipoksiją arba terpę be MitoTEMPO su 1 μ M MitoTEMPO, kai $p \leq 0,05$.

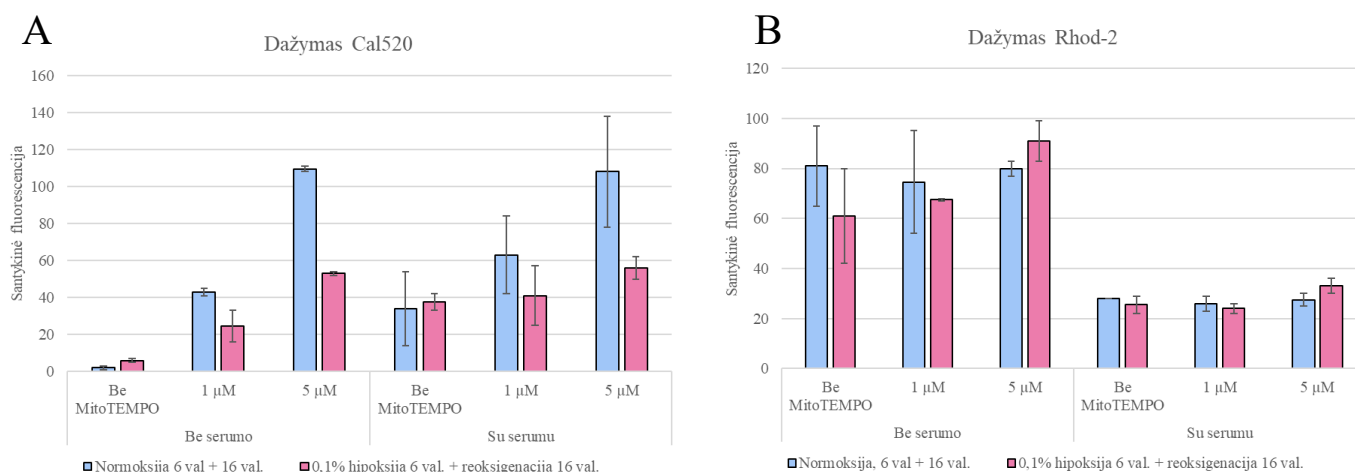
Vertinant antioksidanto poveikį ląstelių apoptozei hipoksijos sąlygomis terpėje be serumo MitoTEMPO nežymiai sumažino Aneksino V kiekį, kas rodo sumažėjusią apoptozės riziką. Vis dėlto, normoksijos sąlygomis pastebėtas priešingas poveikis – neženkliai padidėjęs ląstelių pažeidimas. (žr. 15B pav.).

3.3.2. MitoTEMPO poveikis HL-1 kalcio kiekiui

Kalcis svarbus kardiomiocitų išgyvenamumui ir funkcijos palaikymui. Susitraukimas inicijuojamas, kai užląstelinis kalcis patenka į citoplazmą ir aktyvuoja kalcio išsiskyrimą iš sarkoplazminio tinklo. Šis viduląstelinio kalcio padidėjimas skatina širdies raumens susitraukimą ir

kraujo pumpavimą (Eisner ir kt., 2017). Dėl kalcio sąsajų su susitraukimu ir ląstelių apoptoze buvo nuspręsta ištirti citoplazminio ir mitochondrinio kalcio pokyčiai ir su Cal520 ir Rhod-2 dažais atitinkamai. Cal520 yra jautrus žalios spalvos fluorescencinis kalcio indikatorius, naudojamas viduląstelinio ir citoplazminio kalcio identifikacijai, o Rhod-2 – raudonai fluoresuojantis kalcio indikatorius, tinkamas mitochondrijų kalcio tyrimams (Lock ir kt., 2015).

Nenaudojant MitoTEMPO ir stebint terpę be serumo, matome, kad tiek normoksijos, tiek hipoksijos sąlygomis citoplazminio kalcio kiekis nėra didelis. Naudojant abi MitoTEMPO koncentracijas citoplazminio kalcio kiekis normoksijos sąlygomis išaugo 21 ir 56 kartus (atitinkamai naudojant 1 ir 5 μM koncentracijas). Hipoksijos sąlygomis citoplazminio kalcio augimas buvo mažesnis, kiekis išaugo 5 ir 11 kartų (atitinkamai naudojant 1 ir 5 μM koncentracijas). Terpėje su serumu matomos tos pačios tendencijos, tačiau didesnės variacijos tarp pakartojimų (žr. 16A pav.).



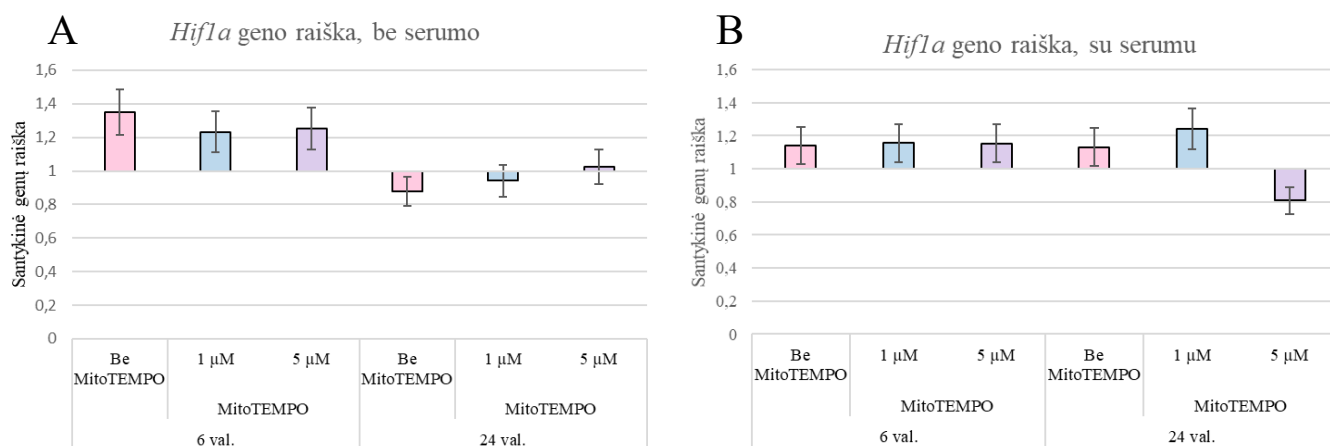
16 pav. MitoTEMPO įtaka ląsteliniam kalciumui po hipoksijos – reoksigenacijos. Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O_2 , 5 % CO_2 , 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpė pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0,1 % O_2 , 5 % CO_2 , 37°C) sąlygomis. Tuomet terpė pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkliamos į normoksijos (21 % O_2 , 5 % CO_2 , 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridedama 1 arba 5 μM MitoTEMPO. **A.** Citoplazminis kalcis dažomas su 3 μM Cal520; **B.** Mitochondrinis kalcis dažomas su 5 μM Rhod-2 5 % CO_2 , 37°C temperatūroje, 30 min. Po dažymo terpė pakeičiama, ląstelės vizualizuojamos su EVOS M7000 fluorescenciniu mikroskopu. Kalcio kiekis nustatomas su ImageJ programa. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų $\pm$ SN

Naudojant Rhod-2 ir stebint mitochondrinį kalcį galima pastebėti, kad terpėje be serumo kalcio yra daugiau, nei terpėje su serumu. Po hipoksijos – reoksigenacijos terpėje be serumo didėjant MitoTEMPO koncentracijai didėja ir kalcio kiekis. Terpėje su serumu kalcio kiekis tarp normoksijos ir hipoksijos nesiskyrė, o MitoTEMPO nesukėlė reikšmingų pokyčių (žr. 16B pav.).

3.3.3. MitoTEMPO poveikis HL-1 genų raiškai

Hipoksijos – reoksigenacijos metu dėl deguonies trūkumo ir staigaus jo atsistatymo, atsirandančių pažaidų gali pasikeisti dalies genų raiška (Pires ir kt., 2010). Kadangi buvo pastebėti kalcio pokyčiai su MitoTEMPO buvo nuspręsta ištirti su kalcio homeostaze susijusių genų raišką. Tyrimui pasirinkome *Serca2a*, *Ncx1*, *Ryr2*, *Cacna1c*, *Slc8a1* genus. Papildomai buvo įvertinta hipoksijoje indukuojamo geno *Hif1a* raiška. Genų raiška matuota po 6 val. ir 22 val.. Kaip namų ruošos genas buvo naudojamas *B2m*, skaičiavimai pateikiami $\Delta\Delta C_T$ metodu, lyginant geno raišką hipoksijos su normoksijos sąlygomis.

Pirma buvo įvertinta hipoksiją indukuojančio 1-alfa faktoriaus *Hif1a* raiška. Šis genas koduoja pagrindinį transkripcijos faktorių indukuojamą hipoksinių sąlygų. Kaip ir buvo tikimasi, po 6 valandų 0,1% hipoksijos *Hif1a* raiška padidėjo visuose mėginiuose lyginant hipoksiją su normoksiją. MitoTEMPO po 6 val. reikšmingo poveikio *Hif1a* raiškai neturėjo. Po 22 valandų *Hif1a* geno raiška buvo didesnė normoksijos sąlygomis terpėje be serumo, o su serumu išliko padidėjusi ląstelėse paveiktose hipoksijos (žr. 17 pav.). Gali būti, kad terpėje su serumu padidėja *Hif1a* mRNR stabilumas.

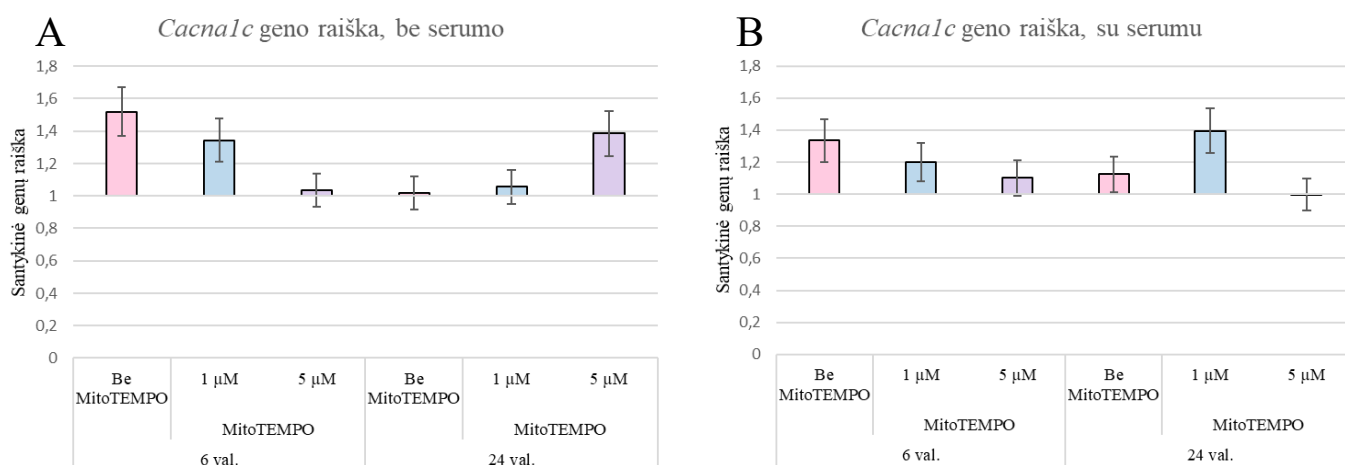


17 pav. MitoTEMPO įtaka *Hif1a* geno raiškai normoksijos ir hipoksijos sąlygomis. *Hif1a* genas koduoja hipoksiją indukuojantį 1-alfa faktorių (HIF-1 α). Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpė pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis. Tuomet terpė pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkeliama į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridedama 1 arba 5 μ M MitoTEMPO. Santykinė geno raiška skaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą, grafike vaizduojamas skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos. **A.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje be serumo; **B.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje su serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų $\pm$ SN

Įvertinus hipoksijos indukuojamo geno pokyčius toliau tirta su kalcio homeostaze susijusių genų raiška. Vienas iš jų yra *Cacna1c* genas, kuris koduoja nuo įtampos valdomų L-tipo kalcio kanalų alfa-1C subvienetą, svarbų kalcio patekimui į ląsteles, kaip atsaką į membranos depoliarizaciją. Po 6 valandų terpėje be serumo nenaudojant antioksidanto geno raiška hipoksijos sąlygomis buvo didesnė

hipoksijos sąlygomis. Antioksidantas mažino geno raišką hipoksijos sąlygomis, o didesnė MitoTEMPO koncentracijose suvienodino geno raišką iki normoksijos sąlygų lygio. Po 22 valandų matoma visiškai priešinga tendencija – nenaudojant antioksidanto geno raiška normoksijos ir hipoksijos sąlygomis nesiskyrė, tačiau didėjanti MitoTEMPO koncentracija skatino *Cacna1c* geno raišką ląstelėse po hipoksijos – reoksigenacijos (žr. 18A pav.).

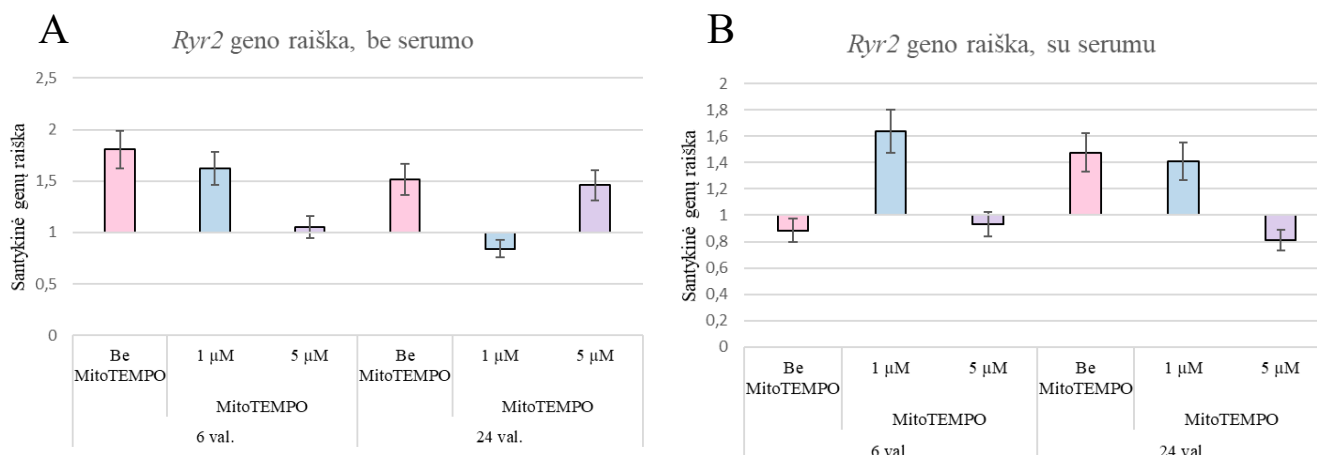
Terpėje su serumu po 6 valandų *Cacna1c* geno raiška buvo didžiausia hipoksijos sąlygomis, nenaudojant MitoTEMPO. Antioksidanto naudojimas mažino raišką, kuo didesnė koncentracija – tuo labiau mažinamas skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos sąlygų. Po 22 valandų konkrečios tendencijos tarp MitoTEMPO koncentracijos ir *Cacna1c* raiškos nebuvo pastebėta. (žr. 18B pav.).



18 pav. MitoTEMPO įtaka *Cacna1c* geno raiškai normoksijos ir hipoksijos sąlygomis. *Cacna1c* genas koduoja L tipo įtampos valdomų kalcio kanalų alfa-1C subvienetą. Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpė pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis. Tuomet terpė pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkeliama į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridėdama 1 arba 5 μ M MitoTEMPO. Santykinė geno raiška skaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą, grafike vaizduojamas skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos. **A.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje be serumo; **B.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje su serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų $\pm$ SN

L-tipo kalcio kanalas leidžia į citoplazmą patekti kalciumui taip aktyvuodamas nuo kalcio priklausomą kalcio išskyrimą, ko pasekoje sarkoplazminiame tinkle esantis kalcis per rianodino receptorių 2 išskiriamas į citoplazmą. *Ryr2* geno raiška po 6 valandų, auginant ląsteles terpėje be serumo buvo aukštesnė hipoksijos sąlygomis. Nenaudojant antioksidanto skirtumas tarp skirtingų sąlygų buvo didžiausias, antioksidanto naudojimas mažino geno raišką hipoksijos sąlygomis, o 5 μ M

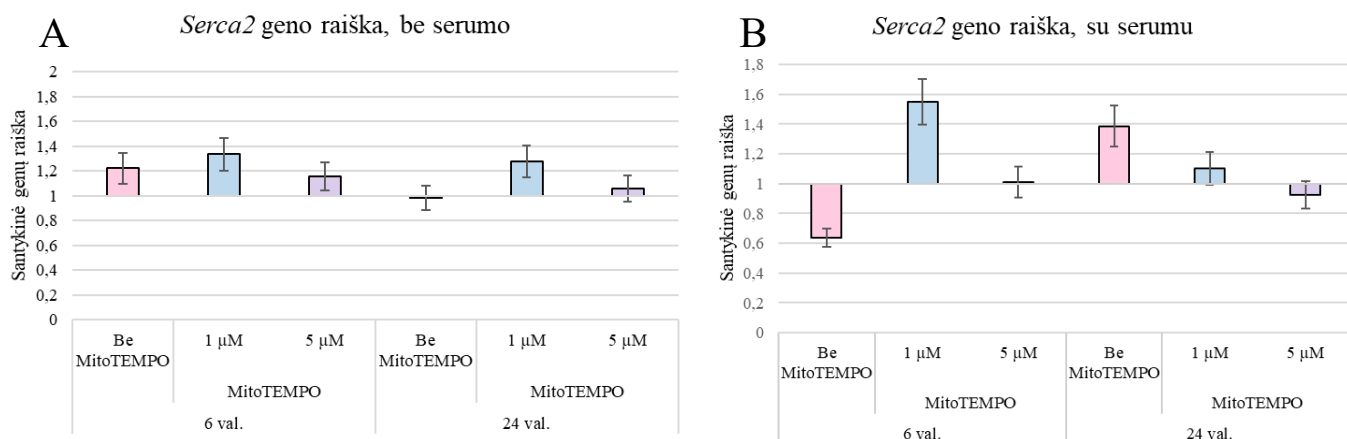
MitoTEMPO koncentracija suvienodino geno raišką iki normoksijos lygio. Po 22 valandų stebima, konkrečios priklausomybės tarp MitoTEMPO ir Ryr2 raiškos nebuvo pastebėta (žr. 19A pav.).



19 pav. MitoTEMPO įtaka Ryr2 geno raiškai normoksijos ir hipoksijos sąlygomis. *Ryr2* genas koduoja rianodino receptorių 2 (RyR2). Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpę pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis. Tuomet terpę pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkeliamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridedama 1 arba 5 μ M MitoTEMPO. Santykinė geno raiška skaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą, grafike vaizduojamas skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos. **A.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje be serumo; **B.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje su serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų $\pm$ SN

Terpėje su serumu po 6 valandų stebimas geno raiškos padidėjimas hipoksijos sąlygomis, naudojant 1 μ M MitoTEMPO koncentraciją, tačiau kitais atvejais geno raiška neženkiai didesnė normoksijos sąlygomis. Po 22 valandų *Ryr2* geno raiška buvo didesnė hipoksijos sąlygomis nenaudojant antioksidanto ar naudojant 1 μ M MitoTEMPO, kol 5 μ M naudojimas didino geno raišką normoksijos sąlygomis (žr. 19B pav.).

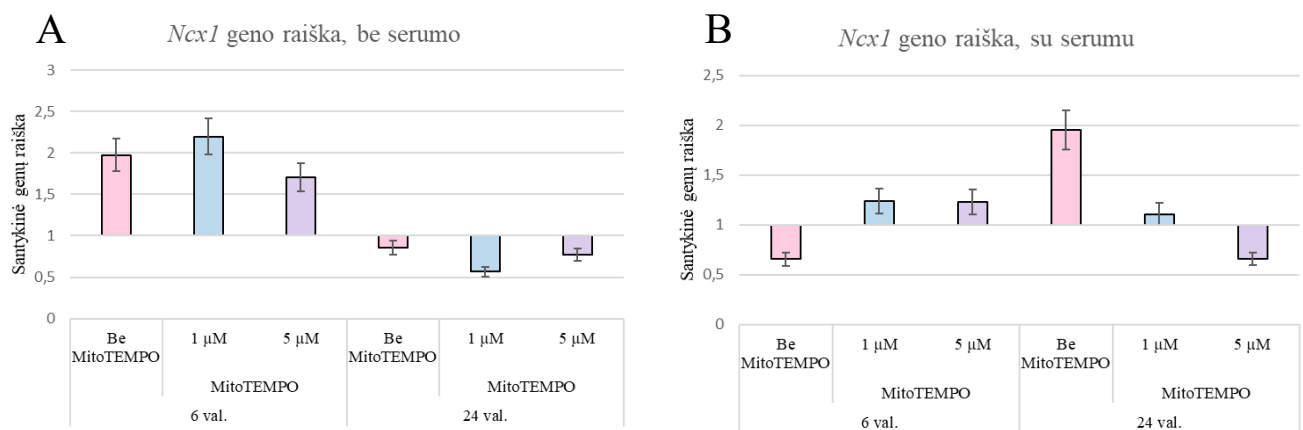
SERCA2 pagrindinė funkcija yra kalcio jonų pernešimas iš citozolio į sarkoplazminį ar endoplazminį tinklus, kas yra svarbu raumenų funkcijos palaikymui ir ląstelių gyvybingumui. Terpėje be serumo po 6 valandų matoma, kad *Serca2a* geno raiška buvo didesnė hipoksijos sąlygomis. Po hipoksijos – reoksigenacijos *Serca2* raiška susivienodino tarp hipoksijos ir normoksijos mėginių išskyrus mėginį su 1 μ M MitoTEMPO. Mėginyje su serumu po 6 val lyginant hipoksiją su normoksiją konkrečios priklausomybės tarp MitoTEMPO ir Ryr2 raiškos nebuvo pastebėta. Po 22 val. mėginyje su serumu galima pastebėti, kad didinant MitoTEMPO koncentraciją *Serca2* raiška mėginyje po hipoksijos – reoksigenacijos mažėja (žr. 20 pav.).



20 pav. MitoTEMPO įtaka *Atp2a2* (*Serca2*) geno raiškai normoksijos ir hipoksijos sąlygomis.

Atp2a2 (*Serca2*) genas koduoja baltymą, vadinamą sarko/endoplazminio tinklo kalcio pernešimo ATPaze 2 (SERCA2). Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpė pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis. Tuomet terpė pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkeliama į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridedama 1 arba 5 μM MitoTEMPO. Santykinė geno raiška skaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą, grafike vaizduojamas skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos. **A.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje be serumo; **B.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje su serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų $\pm$ SN

Ankščiau minėtas SERCA2 kanalas pumpuoja kalcį iš ląstelės citoplazmos į sarkoplazminį tinklą, tuo tarp SLC8A1 kanalas vienu metu pumpuoja kalcį iš citoplazmos ir pumpuoja natrijį į ląstelės vidų. Auginant ląsteles terpėje be serumo *Slc8a1* geno raiška pirmas 6 valandas buvo didesnė hipoksijos sąlygomis. Didžiausias skirtumas stebimas naudojant 1 μM MitoTEMPO koncentraciją, tuomet skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos buvo maždaug 2,3. Po 22 valandų stebimi priešingi rezultatai - *Slc8a1* geno raiška buvo didesnė normoksijos sąlygomis (žr. 21A pav.).



21 pav. MitoTEMPO įtaka *Slc8a1* (*Ncx1*) geno raiškai normoksijos ir hipoksijos sąlygomis. *Slc8a1* (*Ncx1*) genas koduoja natrio ir kalcio mainus 1 (NCX1). Prieš hipoksiją ląstelės valandą laikomos normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis, naudojant Claycomb terpę. Tuomet terpė pakeičiama į RPMI 1640 ir ląstelės 6 val. auginamos hipoksijos (0.1 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygomis. Tuomet terpė pakeičiama dar kartą ir ląstelės 16 val. perkeliamos į normoksijos (21 % O₂, 5 % CO₂, 37°C) sąlygas, imituojant reoksigenacijos laikotarpį. Terpių keitimo metu į dalį mėginių pridedama 1 arba 5 μM MitoTEMPO. Santykinė geno raiška skaičiuota naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą, grafike vaizduojamas skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos. **A.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje be serumo; **B.** MitoTEMPO poveikis auginant ląsteles terpėje su serumu. Duomenys pateikti iš dviejų pamatavimų $\pm$ SN

Auginant ląsteles terpėje su serumu matomos kiek kitokios tendencijos. Po 6 valandų *Slc8a1* raiška buvo didesnė normoksijos sąlygomis, o su MitoTEMPO didesnė hipoksijos sąlygomis. Po 22 valandų nenaudojant antioksidanto stebima priešinga tendencija, kuomet hipoksijos sąlygomis geno raiška yra du kartus didesnė nei normoksijos sąlygomis. 1 μM MitoTEMPO koncentracija smarkiai sumažino geno raišką hipoksijoje, o 5 μM sukėlė didesnę geno raišką normoksijos sąlygomis (žr. 21B pav.).

Bendrai genų raiškos tendencijos buvo aiškiausios po 6 val. terpėje be serumo. Visų tirtų genų raiška buvo padidėjusi lyginant hipoksiją su normoksiją. MitoTEMPO poveikis po 6 val. buvo akivaizdžiausias su *Cacna1c* ir *Ryr2* genais, kur didėjanti koncentracija mažino raišką hipoksijoje. Po 22 val, terpėje be serumo genų raiška hipoksijoje nukrito ar net buvo didesnė normoksijoje. Terpėje su serumu konkrečios tendencijos po 6 val. nebuvo pastebėta, tačiau po 22 val. 5 μM MitoTEMPO beveik visuose mėginiuose didino raišką normoksijos mėginiuose.

Rezultatų aptarimas

Šio tyrimo eigoje naudojome skirtingas sąlygas hipoksijai sukelti HL-1 kardiomiocituose. Iš pradžių pasirinkome švelnesnes hipoksijos sąlygas, kur ląstelės buvo veikiamos 24 arba 48 val. 1% hipoksijos, o po to perkeliamos į normoksiją. Šiame etape buvo tirtas ląstelių gyvybingumas po hipoksijos – reoksigenacijos su nemetaboliniu CyQuant™ ir metaboliniu alamarBlue™ rinkiniais. Rezultatai buvo kiek netikėti - hipoksijoje ląstelių metabolizmas smarkiai išaugo, nors nemetabolinis metodas nerodė tokio staigaus padidėjimo. Padidėjęs jautrumas alamarBlue™ gali būti susijęs su padidėjusiu dažo metabolizmu hipoksijos sąlygomis. Resazurinas, pagrindinė alamarBlue™ sudedamoji dalis, yra metabolizuojamas ląstelių mitochondrijose (Petiti ir kt., 2024). Hipoksijos sąlygomis kinta ROS gamyba, siekiama išvengti ląstelinės anoksijos, kas galbūt turi įtakos ir resazurino metabolizmui (Wheaton & Chandel, 2011). Kadangi hipoksija turi įtakos alamarBlue™ metabolizmui buvo nuspręsta įvertinti gyvybingumą ir nemetaboliniu metodu. Dėl mažo jautrumo CyQuant™ metodas pasirodė irgi netinkamas, todėl buvo nuspręsta įvertinti LDH aktyvumą ir Aneksiną V, kurie ankstesnėse studijose rodė reikšmingą hipoksijos - reoksigenacijos poveikį HL-1 kardiomiocitų gyvybingumui (Huang ir kt., 2022).

Įvertinus LDH aktyvumą po 24 val. arba 48 val. hipoksijos – reoksigenacijos, pastebėtas ryškus LDH aktyvumo padidėjimas po 48 val. bet ne 24 val. poveikio. LDH aktyvumo padidėjimas po hipoksijos – reoksigenacijos buvo stebimas ir kitose studijose. Po 24 valandų 1% hipoksijos ir 3 val. reoksigenacijos auginant HL-1 ląsteles DMEM terpėje be serumo buvo stebimas ženkliai didesnis LDH kiekio išaugimas ląstelėse pažeistose po hipoksijos – reoksigenacijos (Huang ir kt., 2022). LDH kiekio padidėjimas už ląstelės ribų po hipoksijos-reoksigenacijos gali būti susijęs su staigiu deguonies koncentracijos padidėjimu ir po to sekančiu ROS susidarymu. Dėl oksidacinio streso yra pažeidžiamas ląstelės membranos vientisumas ir LDH išskiriamas į tarpląstelinę erdvę (Habener ir kt., 2016). Pastebėjus, kad LDH aktyvumas padidėjo buvo nuspręsta tēkmės citometru įvertinti HL-1 kardiomiocitų ankstyvąją apoptozę. Deja apoptuojančių ląstelių kiekis po 1% hipoksijos nepadidėjo, todėl buvo nuspręsta ieškoti griežtesnių hipoksijos-reoksigenacijos sąlygų.

Norint sukelti ląstelėms dar didesnę stresą ir stipresnę atsaką į hipoksijos sąlygas, tolimesniuose tyrimuose naudota 0,1% hipoksija. HL-1 kardiomiocitai laikyti 6 val. 0,1% hipoksijoje, o po to buvo vykdyta 16 val. reoksigenacija. Tyrimui pasirinktos trys terpės: DMEM, Claycomb ir RPMI 1640. Ląstelės auginamos su ir be serumo norint įvertinti jo įtaką ląstelių gyvybingumui po hipoksijos reoksigenacijos. Literatūroje hipoksijos reoksigenacijos eksperimentams dažniausiai naudojamos DMEM arba Claycomb terpės, o RPMI 1640 rečiau. Ji buvo pasirinkta dėl mažo maistinių medžiagų kiekio ir ląstelių proliferaciją stabdančių savybių (Qiu ir kt., 2021). Palyginus visas tris terpes su ir be serumo pastebėta, kad LDH aktyvumas, t.y. išskyrimas į terpę didžiausias

visose trijose terpėse be serumo. Kitose studijose parodyta, kad ląstelės augintos be serumo yra jautresnės toksiniams poveikiams kaip hipoksiją sukelianti cheminė medžiaga CoCl₂ ar karščio šokas (Wu ir kt., 2012; Alagar Boopathy ir kt., 2022). Serumo buvimas terpėje gali apsaugoti nuo citotoksiškumo, mitochondrijų membranos potencialo sumažėjimo. Serume esantys baltymai geba surišti toksinus, tokiu būdu juos neutralizuojant ir stabdant jų neigiamą poveikį (Wu ir kt., 2012). Ne tik serumas, bet ir terpės sudėtis gali turėti įtakos ląstelių gyvybingumui. Ryškus LDH aktyvumo padidėjimas buvo stebimas po 0,1% hipoksijos tik Claycomb ir RPMI 1640, bet ne DMEM terpėje. Tai gali būti susiję su gliukozės kiekiu terpėje - Claycomb ir RPMI 1640 gliukozės neturi, o DMEM buvo 1 g/mol. Kitose studijose su HL-1 ląstelėmis po 3 val. hipoksijos ir 6 arba 12 valandų reoksigenacijos DMEM terpėje su 4.5 g/mol buvo stebimas kardiomiocitų pažeidimas. Toks neatitikimas tarp mūsų studijos ir kitų mokslininkų tyrimų galėjo atsirasti dėl ne visai identiškų eksperimentinių sąlygų. Kadangi šiame tyrime DMEM terpėje po hipoksijos - reoksigenacijos nebuvo padidėjęs išskirto LDH kiekis, ši terpė tolimesniems tyrimams nebus naudojama.

HL-1 ląstelės po hipoksijos - reoksigenacijos rodė padidėjusį LDH aktyvumą, todėl buvo nuspręsta įvertinti ankstyvosios apoptozės žymens Aneksino V kiekį. Šis dažas pasirinktas dėl savo gebėjimo jungtis prie išoriniame plazminės membranos sluoksnyje esančio fosfatidilserino, kuriuo pasižymi apoptuojančios ląstelės. Rezultatai parodė Aneksino V kiekio padidėjimą po H-R pažeidimo RPMI 1640, bet ne Claycomb terpėje. Tai gali būti susiję su tuo, kad Claycomb terpė yra specialiai subalansuota kardiomiocitų auginimui ir turi daugiau maistinių medžiagų bei augimo faktorių, tokių kaip EGF, IGF, askorbo rūgštis, insulinas ir daugelis kitų, nei RPMI 1640 (White ir kt., 2004). Kituose tyrimuose taip pat buvo stebimas stiprus apoptuojančių ląstelių kiekio išaugimas po hipoksijos – reoksigenacijos pažeidimo, net ir naudojant 1% O₂ hipoksiją (Huang ir kt., 2022; Lv ir kt., 2021). Tolimesniems tyrimams buvo nuspręsta atsisakyti Claycomb ir vykdyti tyrimus tik su RPMI 1640 terpe.

Vienas iš būdų, kurie galėtų mažinti hipoksijos – reoksigenacijos metu sukeltų pažeidimų neigiamus efektus organizmui yra antioksidantai. Tyrimuose su HL-1 kardiomiocitų linija jau buvo naudotas MitoNEET. Manoma, kad šis geležies ir sieros baltymas pasižymi antioksidacinėmis savybėmis ir geba mažinti hipoksijos – reoksigenacijos sukeltą oksidacinį stresą ir jo sukeltą apoptozę (Habener ir kt., 2016). Remiantis tuo, tolimesniuose tyrimuose stebėjome antioksidanto MitoTEMPO ir skirtingų jo koncentracijų (1 μM ir 5 μM) poveikį LDH aktyvumui, Aneksino V kiekiui ir genų raiškai. Skirtingos antioksidanto koncentracijos pasirinktos remiantis ankstesniais medžiagų, pasižyminčių antioksidantinėmis savybėmis, tyrimais, kuomet buvo stebima, jog didesnė medžiagos koncentracija gali veikti ląsteles neigiamai ar keisti LDH kiekį net ne per antioksidantines savybes (Woo ir kt., 2005). Auginant ląsteles terpėje be serumo, normoksijos sąlygomis, MitoTEMPO neturėjo žalingo poveikio ir neskaitino LDH aktyvumo, tačiau hipoksijos sąlygomis abi MitoTEMPO

koncentracijos turėjo apsauginį poveikį ir mažino LDH aktyvumą. Kitų mokslininkų tyrimuose, kuomet buvo naudojama terpė be serumo, apsauginės medžiagos, tokios kaip MitoNEET neturėjo įtakos LDH išsiskyrimui po hipoksijos – reoksigenacijos (Habener ir kt., 2016). Naudojant terpę su serumu, tiek normoksijos, tiek hipoksijos – reoksigenacijos sąlygomis MitoTEMPO neturėjo ryškos įtakos išskiriam LDH kiekiui ir neparodė jokio apsauginio efekto. Šie rezultatai sutapo ir su Aneksino V tyrimu – MitoTEMPO terpėje be serumo mažino apoptuojančių ląstelių kiekį ir rodė apsauginį poveikį. Kiti tyrėjai apoptozės nustatymui naudojo Western Blot ir nustatė, kad auginant ląsteles terpėje be serumo didesnis MitoNEET kiekis ženkliai sumažino apoptozę (Habener ir kt., 2016). Apsauginis MitoTEMPO ir MitoNEET poveikis gali būti susijęs su jų gebėjimu apsaugoti ląstelę nuo oksidacinio streso ir teigiamo poveikio mitochondrijų veiklai (H. Hu & Li, 2016). Kadangi buvo pastebėtas teigiamas MitoTEMPO poveikis nuspręsta toliau gilintis į jo poveikį HL-1 kardiomiocitų funkcionavimui.

Kalcio homeostazė svarbi kardiomiocitų susitraukimo ir sužadinimo bei apoptotiniuose procesuose, todėl dalis šio tyrimo dėmesio buvo skirta citoplazminio ir mitochondrinio kalcio tyrimams. HL-1 kardiomiocitų kalcio koncentracija buvo tirama po 6 valandų hipoksijos ir 16 valandų reoksigenacijos laikotarpio. Tiriant citoplazminį kalcį terpėje be serumo pastebėta, kad po hipoksijos – reoksigenacijos jo buvo daugiau nei normoksijoje. Pridėjus MitoTEMPO kalcio kiekis normoksijoje ir po hipoksijos - reoksigenacijos išaugo. Kituose tyrimuose, kuriuose buvo naudoti žiurkių kardiomiocitai ir Cal-520, stebėta, kad po 2 val. reoksigenacijos kalcio kiekis sparčiai padidėjo ir pasiekė maksimalų (He ir kt., 2015). Laisvo kalcio kiekio padidėjimas pridėjus MitoTEMPO gali būti susijęs su mitochondrijų oksidacinio streso reguliavimu ir jų poveikiu kalcio signaliniams keliams. MitoTEMPO mažindamas oksidacinį stresą gali keisti kalcio išskyrimo iš mitochondrijų kanalų aktyvumą ir taip sukelti kalcio kaupimąsi citoplazmoje (Mukherjee ir kt., 2024). Tiriant mitochondrinį kalcį terpėje su serumu jokie ryškesni pokyčiai nepastebimi, tik kad terpėje su serumu kalcio buvo mažiau bei RPMI 1640 terpėje be serumo.

Kalcio kiekio pokyčiai pridėjus MitoTEMPO paskatino ištirti su kalcio homeostaze susijusių genų raišką. Bendrai genų raiškos tendencijos buvo aiškiausios po 6 val. terpėje be serumo. Visų tirtų genų raiška buvo padidėjusi lyginant hipoksiją su normoksija. Tai gali būti susiję su sumažėjusiu jautrumu kalciui hipoksijos sąlygomis, todėl nes visų kanalų arba pompų raiška buvo didesnė hipoksijoje lyginat su normoksija. MitoTEMPO poveikis po 6 val. terpėje be serumo buvo akivaizdžiausias su *Cacna1c* ir *Ryr2* genais, kur didėjanti koncentracija mažino raišką hipoksijoje. Šių genų raiškos sumažėjimas gali būti susijęs su ląstelės apsauga, siekiant sumažinti kalcio išskyrimą ir patekimą į ląstelę, taip saugant ją nuo kalcio pertekliaus. Konkrečios tendencijos su MitoTEMPO po 22 val. buvo pastebėtos tik terpėje su serumu – 5 μ M MitoTEMPO didino beveik visų genų raišką normoksijoje.

Hipoksijos – reoksigenacijos modelis yra sudėtingas, o poveikis kardiomiocitų funkcionavimui yra daugialypis. Hipoksijos – reoksigenacijos sąlygos su 0,1% deguonies sukėlė ląstelines pažaidas – didėjo išskiriamo LDH kiekis, padidėjo apoptotinių ląstelių kiekis. Stebėtas MitoTEMPO poveikis nevienareikšmis – mažino išskirto LDH ir apoptuojančių ląstelių kiekį po hipoksijos - reoksigenacijos, bet didesnėje 5 μ M koncentracijoje galėjo būti toksiškas. Kalcio kiekis ir genų raiškos tendencijos tik dalinai atskleidė MitoTEMPO poveikį ir labiau iškėlė klausimų, o ne atsakymų. Remiantis LDH, Aneksino V, genų ir kalcio duomenimis MitoTEMPO mažina žalingą hipoksijos – reoksigenacijos poveikį, bet jo įtakai yra kalcio homeostazei įvertinti reikalingi papildomi tyrimai.

Išvados

1. Tinkamiausios sąlygos HL-1 kardiomiocitų hipoksijos – reoksigenacijos tyrimams yra naudojant ūmią 0,1% hipoksiją ir RPMI 1640 terpę be serumo.
2. MitoTEMPO mažino LDH aktyvumą ir apoptuojančių ląstelių kiekį po hipoksijos - reoksigenacijos, tačiau didesnė jo koncentracija gali būti toksiška.
3. MitoTEMPO po 6 valandų terpėje be serumo mažino *Cacna1c* ir *Ryr2* genų raišką, tačiau didino citoplazminio kalcio kiekį.

Autoriaus asmeninis indėlis

Atlikti tyrimai naudojant 0,1% hipoksiją ir tiriant antioksidanto MitoTEMPO poveikį, atlikta gautų rezultatų analizė ir interpretacija. Baigiamojo darbo rengimas ir redagavimas.

Rezultatų sklaida

Rezultatai pristatyti Lietuvos mokslų tarybos organizuojamoje konferencijoje "Naujoji mokslininkų karta", vykusioje 2024 m. gegužės 16 – 17 dienomis. Pristatymo tema - „Mitochondrijas apsaugančių antioksidantų poveikis HL -1 kardiomiocitų gyvybingumui ir kalcio signalams hipoksijos - reoksigenacijos sąlygomis“

Padėka

Dėkoju VMTI Inovatyvios medicinos centrui, Regeneracinės medicinos skyriui už galimybę atlikti praktiką.

Labiausiai dėkoju savo magistro baigiamojo darbo vadovui Dr. Rokui Mikšiūnui už pagalbą, vertingas pamokas ir palaikymą visos praktikos metu, taip pat už konsultacijas rengiant baigiamąjį darbą.

Dr. Eivai Bernotienei už pagalbą ir kuravimą praktikos metu, už galimybę atlikti praktiką Jos vadovaujamame skyriuje.

Už konsultacijas ir palaikymą magistro metu dėkoju Dr. Daivai Bironaitei, Dr. Ilonai Uzielienai, Jolitai Pachalevai bei Ramintai Vaičiulevičiūtei.

Projektas dalinai finansuojamas Horizon 2022 projekto EMAPS-CARDIO (ElectroMechanoActive Polymer-based Scaffolds for Heart-on-Chip) ir Lietuvos mokslo tarybos (Paraiškos reg. Nr. P-ST-23-23).

Paulina Bialaglovytė

Magistro baigiamasis darbas

**Hipoksijos - reoksigenacijos poveikis HL-1 kardiomiocitų gyvybingumui
ir viduląsteliniais mechanizmomis**

SANTRAUKA

Kiekvienais metais nuo širdies išeminės širdies ligos pasaulyje miršta 9,14 mln. žmonių. Ligos eigoje dėl sumažėjusios ar visai nutrūkusios širdies vainikinių arterijų kraujotakos sutrinka deguonies ir maisto medžiagų tiekimas. Užsitęsęs išeminis procesas chirurginiu būdu yra atstatomas kraujo tekėjimas ir įvyksta reperfuzija. Dėl staigaus O₂ kiekio atstatymo kardiomiocituose sukeliamas oksidacinis stresas ir uždegimas, negrįžtami žalingi pokyčiai širdies miokarde. Norint ištirti šį procesą laboratorinėmis sąlygomis gali būti pasitelkiamas hipoksijos – reoksigenacijos modelis, kuriame galima griežtai kontroliuoti eksperimentines sąlygas.

Šio tyrimo metu įvertintas hipoksijos – reoksigenacijos ir mitochondrijų antioksidanto MitoTEMPO poveikis HL-1 kardiomiocitų gyvybingumui, kalcio kiekiui ir genų raiškai. Buvo tirtos hipoksijos – reoksigenacijos sąlygos su 1% ir 0,1% deguonies koncentracija, norint atrasti žalingiausią poveikį HL-1 kardiomiocitams. Tirtas apsauginis mitochondrijų antioksidanto MitoTEMPO poveikis LDH aktyvumui, ankstyvajai apoptozei, kalcio kiekiui ir su hipoksijos sąlygomis (*Hif1a*) ar kalcio homeostaze susijusių genų raiškai (*Cacna1c*, *Atp2a2*, *Scl8a1*, *Ryr2*).

Nustatyta, jog tinkamiausias modelis hipoksijos – reoksigenacijos tyrimams yra naudojant ūmią 0,1% hipoksiją ir maistinių medžiagų gausa nepasižyminčią terpę RPMI 1640 be serumo. Šiomis sąlygomis matytas didžiausias skirtumas tarp hipoksijos ir normoksijos sąlygų, vertinant pagal LDH aktyvumą ir apoptotinių ląstelių kiekį, kas tolimesnių tyrimų metu leido lengviau vertinti papildomų medžiagų poveikį. Į mitochondrijas nukreipto antioksidanto MitoTEMPO poveikis buvo dviprasmiškas. MitoTEMPO mažino LDH kiekį ir apoptuojančių ląstelių skaičių, tačiau pastebėta, kad kai kuriomis sąlygomis, didesnė jo koncentracija gali būti toksiška ir sukelti ląstelių žūtį. Pastebima, kad citoplazminio kalcio kiekis buvo didesnis hipoksijos - reoksigenacijos sąlygomis, tačiau antioksidanto naudojimas jį smarkiau išaugino normoksijoje. Mitochondrinio kalcio tyrimuose ryškūs skirtumai nepastebimi. MitoTEMPO poveikis matomas tik tiriant *Canca1c* ir *Ryr2* genus, kuomet didėjanti antioksidanto koncentracija mažino jų raišką hipoksijos sąlygomis.

Paulina Bialaglovytė

Master's thesis

**Effects of Hypoxia-reoxygenation on HL-1 Cardiomyocyte Viability
and Intracellular Mechanisms**

ABSTRACT

Every year, 9.14 million people worldwide die from ischemic heart disease. During the course of the disease, oxygen and nutrient supply are compromised due to reduced or complete loss of blood flow in the coronary arteries of the heart. When ischemic processes are prolonged, blood flow is restored surgically, and reperfusion takes place. The sudden restoration of O₂ in cardiomyocytes leads to oxidative stress and inflammation and irreversible damaging changes in the myocardium. To study this process under laboratory conditions, the hypoxia-reoxygenation model can be used, where the experimental conditions can be tightly controlled.

The present study evaluated the effects of hypoxia-reoxygenation and the mitochondrial antioxidant MitoTEMPO on HL-1 cardiomyocyte viability, calcium content and gene expression. Hypoxia - reoxygenation conditions with 1% and 0.1% oxygen concentrations were investigated to find the most detrimental effects on HL-1 cardiomyocytes. The protective effect of the mitochondrial antioxidant MitoTEMPO on LDH activity, early apoptosis, calcium levels and the expression of genes related to hypoxia (*Hif1a*) or calcium homeostasis (*Cacna1c*, *Atp2a2*, *Scl8a1*, *Ryr2*) was investigated.

The most appropriate model for hypoxia-reoxygenation studies was found to be using acute 0.1% hypoxia and the nutrient-dense serum-free RPMI 1640 medium. Under these conditions, the greatest difference between hypoxic and normoxic conditions was observed in terms of LDH activity and apoptotic cell counts, which facilitated the assessment of the effects of additional nutrients in further studies. The effect of the mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO was equivocal. MitoTEMPO reduced LDH levels and the number of apoptotic cells, but it was observed that, under some conditions, higher concentrations could be toxic and cause cell death. Cytoplasmic calcium levels were observed to be higher in hypoxia - reoxygenation conditions, but the antioxidant treatment resulted in a greater increase in normoxia. There were no marked differences in mitochondrial calcium. The effect of MitoTEMPO was only evident for the *Canca1c* and *Ryr2* genes, where increasing concentrations of the antioxidant reduced their expression under hypoxia.

Literatūros sąrašas

- Abadi, S. H. M. H., Shirazi, A., Alizadeh, A. M., Changizi, V., Najafi, M., Khalighfard, S., & Nosrati, H. (2018). The Effect of Melatonin on Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Activity, and Malondialdehyde Levels in the Targeted and the Non-targeted Lung and Heart Tissues after Irradiation in Xenograft Mice Colon Cancer. *Current Molecular Pharmacology*, 11(4), 326–335. <https://doi.org/10.2174/1874467211666180830150154>
- AC16 Human Cardiomyocyte Cell Line MSDS - SCC109—Merck. (s.a.). Gauta 2024 m. lapkričio 3 d., https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MM_NF-SCC109
- Ahmad, M., Mehta, P., Reddivari, A. K. R., & Mungee, S. (2024). Percutaneous Coronary Intervention. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556123/>
- Alagar Boopathy, L. R., Jacob-Tomas, S., Alecki, C., & Vera, M. (2022). Mechanisms tailoring the expression of heat shock proteins to proteostasis challenges. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(5), 101796. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101796>
- Bachar, B. J., & Manna, B. (2024). Coronary Artery Bypass Graft. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507836/>
- Badimon, L., Padró, T., & Vilahur, G. (2012). Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. *European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care*, 1(1), 60. <https://doi.org/10.1177/2048872612441582>
- Badura, K., Buławska, D., Dąbek, B., Witkowska, A., Lisińska, W., Radzioch, E., Skwira, S., Młynarska, E., Rysz, J., & Franczyk, B. (2024). Primary Electrical Heart Disease—Principles of Pathophysiology and Genetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms25031826>
- Baig, M. U., & Bodle, J. (2024). Thrombolytic Therapy. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557411/>
- Bernardi, P., Gerle, C., Halestrap, A. P., Jonas, E. A., Karch, J., Mnatsakanyan, N., Pavlov, E., Sheu, S.-S., & Soukas, A. A. (2023). Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: Controversies, consensus, recent advances, and future directions. *Cell Death and Differentiation*, 30(8), 1869. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01187-0>
- Bertero, E., Popoiu, T.-A., & Maack, C. (2024). Mitochondrial calcium in cardiac ischemia/reperfusion injury and cardioprotection. *Basic Research in Cardiology*, 119(4), 569–585. <https://doi.org/10.1007/s00395-024-01060-2>
- Biga, L. M., Bronson, S., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Oja, K., Quick, D., Runyeon, J., Oeru, O., & OpenStax. (2019). 10.2 Skeletal Muscle. <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/10-2-skeletal-muscle/>
- Bo, B., Li, S., Zhou, K., & Wei, J. (2021). The Regulatory Role of Oxygen Metabolism in Exercise-Induced Cardiomyocyte Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664527>
- Boyman, L., Chikando, A. C., Williams, G. S., Khairallah, R. J., Kettlewell, S., Ward, C. W., Smith, G. L., Kao, J. P., & Lederer, W. J. (2014). Calcium Movement in Cardiac Mitochondria. *Biophysical Journal*, 107(6), 1289. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.07.045>

- Bonsu, K. O., Kadirvelu, A., & Reidpath, D. D. (2013). Statins in heart failure: Do we need another trial? *Vascular Health and Risk Management*, 9, 303. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S44499>
- Bouleti, C., Mewton, N., & Germain, S. (2015). The no-reflow phenomenon: State of the art. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2015.09.006>
- Branco, A. F., Pereira, S. P., Gonzalez, S., Gusev, O., Rizvanov, A. A., & Oliveira, P. J. (2015). Gene Expression Profiling of H9c2 Myoblast Differentiation towards a Cardiac-Like Phenotype. *PLoS ONE*, 10(6), e0129303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129303>
- Bravený, P. (2002). Heart, calcium and time. *Experimental & Clinical Cardiology*, 7(1), 3.
- Buja, L. M. (2022). Pathobiology of Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury: Models, Modes, Molecular Mechanisms, Modulation, and Clinical Applications. *Cardiology in Review*, 31(5), 252. <https://doi.org/10.1097/CRD.0000000000000440>
- Burnett, S. D., Blanchette, A. D., Chiu, W. A., & Rusyn, I. (2021). Human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocytes as an in vitro model in toxicology: Strengths and weaknesses for hazard identification and risk characterization. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 17(8), 887. <https://doi.org/10.1080/17425255.2021.1894122>
- Camara, A. K. S., Bienengraeber, M., & Stowe, D. F. (2011). Mitochondrial Approaches to Protect Against Cardiac Ischemia and Reperfusion Injury. *Frontiers in Physiology*, 2, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00013>
- Chakrabarti, A. K., Feeney, K., Abueg, C., Brown, D. A., Czyz, E., Tendera, M., Janosi, A., Giugliano, R. P., Kloner, R. A., Weaver, W. D., Bode, C., Godlewski, J., Merkely, B., & Gibson, C. M. (2013). Rationale and design of the EMBRACE STEMI Study: A phase 2a, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, tolerability and efficacy of intravenous Bendavia on reperfusion injury in patients treated with standard therapy including primary percutaneous coronary intervention and stenting for ST-segment elevation myocardial infarction. *American Heart Journal*, 165(4), 509-514.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2012.12.008>
- Chatfield, K. C., Sparagna, G. C., Chau, S., Phillips, E. K., Ambardekar, A. V., Aftab, M., Mitchell, M. B., Sucharov, C. C., Miyamoto, S. D., & Stauffer, B. L. (2019). Elamipretide Improves Mitochondrial Function in the Failing Human Heart. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(2), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.12.005>
- Chen, Y., Liu, Y., Li, X., & Jin, G. (2024). Intracoronary microcatheter indwelling for continuous pumping of low-dose thrombolytic drugs: A new approach to reperfusion in acute myocardial infarction. *Medicine*, 103(14), e37692. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000037692>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chiong, M., Wang, Z. V., Pedrozo, Z., Cao, D. J., Troncoso, R., Ibacache, M., Criollo, A., Nemchenko, A., Hill, J. A., & Lavandero, S. (2011). Cardiomyocyte death: Mechanisms and translational implications. *Cell Death & Disease*, 2(12), e244–e244. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.130>
- Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., Awosika, A. O., & Ayers, D. (2024). Physiology, Stress Reaction. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541120/>
- Connelly, C. M., Vogel, W. M., Wiegner, A. W., Osmers, E. L., Bing, O. H., Kloner, R. A., Dunn-Lanchantin, D. M., Franzblau, C., & Apstein, C. S. (1985). Effects of reperfusion after

- coronary artery occlusion on post-infarction scar tissue. *Circulation Research*, 57(4), 562–577. <https://doi.org/10.1161/01.res.57.4.562>
- Correia, C., Wang, Q.-D., Linhardt, G., Carlsson, L. G., Ulfenborg, B., Walentinsson, A., Rydén-Markinhutha, K., Behrendt, M., Wikström, J., Sartipy, P., Jennbacken, K., & Synnergren, J. (2021). Unraveling the Metabolic Derangements Occurring in Non-infarcted Areas of Pig Hearts With Chronic Heart Failure. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 753470. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.753470>
- Cowled, P., & Fitridge, R. (2011). Pathophysiology of Reperfusion Injury. R. Fitridge & M. Thompson (Sud.), *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. University of Adelaide Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534267/>
- Criteria, I. of M. (US) C. on S. S. C. D. (2010). Ischemic Heart Disease. *Cardiovascular Disability: Updating the Social Security Listings*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK209964/>
- Dehghani, T., & Panitch, A. (2020). Endothelial cells, neutrophils and platelets: Getting to the bottom of an inflammatory triangle. *Open Biology*, 10(10), 200161. <https://doi.org/10.1098/rsob.200161>
- Dehne, T., Adam, X., Materne, E.-M., Reimann, M. C., Krüger, J. P., Van Linthout, S., Tschöpe, C., Haag, M., Sittlinger, M., & Ringe, J. (2014). A P19 and P19CL6 cell-based complementary approach to determine paracrine effects in cardiac tissue engineering. *Cells, Tissues, Organs*, 199(1), 24–36. <https://doi.org/10.1159/000362540>
- Denniss, A. L., Dashwood, A. M., Molenaar, P., & Beard, N. A. (2020). Sarcoplasmic reticulum calcium mishandling: Central tenet in heart failure? *Biophysical Reviews*, 12(4), 865. <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00736-y>
- Di Cesare, M., Perel, P., Taylor, S., Kabudula, C., Bixby, H., Gaziano, T. A., McGhie, D. V., Mwangi, J., Pervan, B., Narula, J., Pineiro, D., & Pinto, F. J. (s.a.). The Heart of the World. *Global Heart*, 19(1), 11. <https://doi.org/10.5334/gh.1288>
- Eisner, D. A., Caldwell, J. L., Kistamás, K., & Trafford, A. W. (2017). Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circulation Research*, 121(2), 181. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310230>
- Feher, J. (2012). 5.4—The Heart as a Pump. J. Feher (Sud.), *Quantitative Human Physiology* (p. 446–454). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382163-8.00047-5>
- Fernandez Rico, C., Konate, K., Josse, E., Nargeot, J., Barrère-Lemaire, S., & Boisguérin, P. (2022). Therapeutic Peptides to Treat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.792885>
- Fountain, J. H., Kaur, J., & Lappin, S. L. (2024). Physiology, Renin Angiotensin System. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>
- Francisco, J., & Del Re, D. P. (2023). Inflammation in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: Underlying Mechanisms and Therapeutic Potential. *Antioxidants*, 12(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/antiox12111944>
- Frank, A., Bonney, M., Bonney, S., Weitzel, L., Koeppen, M., & Eckle, T. (2012). Myocardial ischemia reperfusion injury—From basic science to clinical bedside. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 16(3), 123. <https://doi.org/10.1177/1089253211436350>
- Gandoy-Fieiras, N., Gonzalez-Juanatey, J. R., & Eiras, S. (2020). Myocardium Metabolism in Physiological and Pathophysiological States: Implications of Epicardial Adipose Tissue and

- Potential Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2641. <https://doi.org/10.3390/ijms21072641>
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2011). 8—Muscle. L. P. Gartner & J. L. Hiatt (Sud.), *Concise Histology* (p. 94–107). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3114-4.00008-7>
- Gash, M. C., Kandle, P. F., Murray, I. V., & Varacallo, M. (2024). Physiology, Muscle Contraction. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537140/>
- Giannino, G., Braia, V., Griffith Brookles, C., Giacobbe, F., D’Ascenzo, F., Angelini, F., Saglietto, A., De Ferrari, G. M., & Dusi, V. (2024). The Intrinsic Cardiac Nervous System: From Pathophysiology to Therapeutic Implications. *Biology*, 13(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/biology13020105>
- Goldhaber, J. I. (1997). 7—Metabolism in Normal and Ischemic Myocardium. G. A. Langer (Sud.), *The Myocardium (Second Edition)* (p. 325–393). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012436570-4/50009-1>
- Goldsmith, E. C., Bradshaw, A. D., Zile, M. R., & Spinale, F. G. (2014). Myocardial Fibroblast-Matrix Interactions and Potential Therapeutic Targets. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 0, 92. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.008>
- Gorabi, A. M., Kiaie, N., Hajighasemi, S., Banach, M., Penson, P. E., Jamialahmadi, T., & Sahebkar, A. (2019). Statin-Induced Nitric Oxide Signaling: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Journal of Clinical Medicine*, 8(12), 2051. <https://doi.org/10.3390/jcm8122051>
- Gordan, R., Gwathmey, J. K., & Xie, L.-H. (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World Journal of Cardiology*, 7(4), 204. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i4.204>
- Granger, D. N., & Kvietys, P. R. (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biology*, 6, 524. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., & Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 8(21), 2003. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009>
- Gusarova, G. A., Trejo, H. E., Dada, L. A., Briva, A., Welch, L. C., Hamanaka, R. B., Mutlu, G. M., Chandel, N. S., Prakriya, M., & Sznajder, J. I. (2011). Hypoxia Leads to Na,K-ATPase Downregulation via Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels and AMPK Activation. *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), 3546. <https://doi.org/10.1128/MCB.05114-11>
- Habener, A., Chowdhury, A., Echtermeyer, F., Lichtinghagen, R., Theilmeier, G., & Herzog, C. (2016). MitoNEET Protects HL-1 Cardiomyocytes from Oxidative Stress Mediated Apoptosis in an In Vitro Model of Hypoxia and Reoxygenation. *PLOS ONE*, 11(5), e0156054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156054>
- Hafen, B. B., Shook, M., & Burns, B. (2024). Anatomy, Smooth Muscle. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532857/>
- Halade, G. V., & Lee, D. H. (2022). Inflammation and resolution signaling in cardiac repair and heart failure. *EBioMedicine*, 79, 103992. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103992>
- Han, B., Trew, M. L., & Zgierski-Johnston, C. M. (2021). Cardiac Conduction Velocity, Remodeling and Arrhythmogenesis. *Cells*, 10(11), 2923. <https://doi.org/10.3390/cells10112923>
- He, X., Bi, X., Lu, X., Zhao, M., Yu, X., Sun, L., Xu, M., Wier, W. G., & Zang, W. (2015). Reduction of Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Interactions by Acetylcholine Protects

-
- Human Umbilical Vein Endothelial Cells From Hypoxia/Reoxygenation Injury. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(7), 1623–1634. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305469>
- Headrick, J. P., & Lasley, R. D. (2009). Adenosine Receptors and Reperfusion Injury of the Heart. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 193, 189. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9_7
- Hirsch, C., & Schildknecht, S. (2019). In Vitro Research Reproducibility: Keeping Up High Standards. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1484. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01484>
- Hoang-Trong, T. M., Ullah, A., & Jafri, M. S. (2015). Calcium Sparks in the Heart: Dynamics and Regulation. *Research and Reports in Biology*, 6, 203. <https://doi.org/10.2147/RRB.S61495>
- Hsueh, Y.-C., Pratt, R. E., Dzau, V. J., & Hodgkinson, C. P. (2023). Novel method of differentiating human induced pluripotent stem cells to mature cardiomyocytes via Sfrp2. *Scientific Reports*, 13(1), 3920. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31144-3>
- Hu, H., & Li, M. (2016). Mitochondria-targeted antioxidant mitotempo protects mitochondrial function against amyloid beta toxicity in primary cultured mouse neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(1), 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.071>
- Hu, Y., Zheng, Y., Liu, C., You, Y., Wu, Y., Wang, P., Wu, Y., Ba, H., Lu, J., Yuan, Y., Liu, P., & Mao, Y. (2024). Mitochondrial MOF regulates energy metabolism in heart failure via ATP5B hyperacetylation. *Cell Reports*, 43(10), 114839. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114839>
- Huang, C., Qu, Y., Feng, F., Zhang, H., Shu, L., Zhu, X., Huang, G., & Xu, J. (2022). Cardioprotective Effect of circ_SMG6 Knockdown against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Correlates with miR-138-5p-Mediated EGR1/TLR4/TRIF Inactivation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1927260. <https://doi.org/10.1155/2022/1927260>
- Yasir, M., Goyal, A., & Sonthalia, S. (2024). Corticosteroid Adverse Effects. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531462/>
- Jafri, M. S. (2012). Models of Excitation–Contraction Coupling in Cardiac Ventricular Myocytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 910, 309. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-965-5_14
- Jewhurst, K., & McLaughlin, K. A. (2016). Beyond the Mammalian Heart: Fish and Amphibians as a Model for Cardiac Repair and Regeneration. *Journal of Developmental Biology*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/jdb4010001>
- Jin, S., & Kang, P. M. (2024). A Systematic Review on Advances in Management of Oxidative Stress-Associated Cardiovascular Diseases. *Antioxidants*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/antiox13080923>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Kar, R., Mukhopadhyay, D., & Angom, R. S. (2024). Progress in Disease Modeling for Myocardial Infarction and Coronary Artery Disease: Bridging In Vivo and In Vitro Approaches. *Hearts*, 5(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/hearts5040031>
- Kashou, A. H., Basit, H., & Chhabra, L. (2024). Physiology, Sinoatrial Node. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459238/>

- King, J., & Lowery, D. R. (2024). Physiology, Cardiac Output. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470455/>
- Koushki, K., Shahbaz, S. K., Mashayekhi, K., Sadeghi, M., Zayeri, Z. D., Taba, M. Y., Banach, M., Al-Rasadi, K., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2020). Anti-inflammatory Action of Statins in Cardiovascular Disease: The Role of Inflammasome and Toll-Like Receptor Pathways. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 60(2), 175. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08791-9>
- Kristián, T. (2004). Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium*, 36(3–4), 221–233. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.02.016>
- Kristián, T., & Siesjö, B. K. (1996). Calcium-related damage in ischemia. *Life Sciences*, 59(5–6), 357–367. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00314-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00314-1)
- Kulek, A. R., Undyala, V. V. R., Anzell, A. R., Raghunayakula, S., MacMillan-Crow, L. A., Sanderson, T. H., & Przyklenk, K. (2022). Does Disruption of Optic Atrophy-1 (OPA1) Contribute to Cell Death in HL-1 Cardiomyocytes Subjected to Lethal Ischemia-Reperfusion Injury? *Cells*, 11(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/cells11193083>
- Kurien, B. T. (2004). Just a minute: Incredible numbers at play at the macro and micro level. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 171(12), 1497. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1040579>
- Kuzmiak-Glancy, S., Glancy, B., & Kay, M. W. (2022). Ischemic damage to every segment of the oxidative phosphorylation cascade elevates ETC driving force and ROS production in cardiac mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 323(3), H499. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00129.2022>
- Lee, F.-Y., Shao, P.-L., Wallace, C. G., Chua, S., Sung, P.-H., Ko, S.-F., Chai, H.-T., Chung, S.-Y., Chen, K.-H., Lu, H.-I., Chen, Y.-L., Huang, T.-H., Sheu, J.-J., & Yip, H.-K. (2018). Combined Therapy with SS31 and Mitochondria Mitigates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms19092782>
- Lee, H., Smith, S. B., & Yoon, Y. (2017). The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(17), 7115–7130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762567>
- Li, H.-S., Zhou, Y.-N., Li, L., Li, S.-F., Long, D., Chen, X.-L., Zhang, J.-B., Feng, L., & Li, Y.-P. (2019). HIF-1 α protects against oxidative stress by directly targeting mitochondria. *Redox Biology*, 25, 101109. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101109>
- Lim, C. C., Zuppinger, C., Guo, X., Kuster, G. M., Helmes, M., Eppenberger, H. M., Suter, T. M., Liao, R., & Sawyer, D. B. (2004). Anthracyclines Induce Calpain-dependent Titin Proteolysis and Necrosis in Cardiomyocytes*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8290–8299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308033200>
- Lippi, M., Stadiotti, I., Pompilio, G., & Sommariva, E. (2020). Human Cell Modeling for Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6388. <https://doi.org/10.3390/ijms21176388>
- Lock, J. T., Parker, I., & Smith, I. F. (2015). A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells. *Cell calcium*, 58(6), 638–648. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.10.003>
- Loftus, I. (2011). Mechanisms of Plaque Rupture. R. Fitridge & M. Thompson (Sud.), *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists*. University of Adelaide Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534259/>

- Loren, P., Sánchez, R., Arias, M.-E., Felmer, R., Risopatrón, J., & Cheuquemán, C. (2017). Melatonin Scavenger Properties against Oxidative and Nitrosative Stress: Impact on Gamete Handling and In Vitro Embryo Production in Humans and Other Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1119. <https://doi.org/10.3390/ijms18061119>
- Lum, J. J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J. D., DeBerardinis, R. J., Covello, K. L., Simon, M. C., & Thompson, C. B. (2007). The transcription factor HIF-1 α plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & Development*, 21(9), 1037. <https://doi.org/10.1101/gad.1529107>
- Luo, X., Chae, M., Krishnakumar, R., Danko, C. G., & Kraus, W. L. (2014). Dynamic reorganization of the AC16 cardiomyocyte transcriptome in response to TNF α signaling revealed by integrated genomic analyses. *BMC Genomics*, 15(1), 155. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-155>
- Lv, X.-W., Wang, M.-J., Qin, Q.-Y., Lu, P., & Qin, G.-W. (2021). 6-Gingerol relieves myocardial ischaemia/reperfusion injury by regulating lncRNA H19/miR-143/ATG7 signaling axis-mediated autophagy. *Laboratory Investigation*, 101(7), 865–877. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00575-9>
- Majka, M., Kleibert, M., & Wojciechowska, M. (2021). Impact of the Main Cardiovascular Risk Factors on Plasma Extracellular Vesicles and Their Influence on the Heart's Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells*, 10(12), 3331. <https://doi.org/10.3390/cells10123331>
- Manjunath, S., & Sakhare, P. M. (2009). Adenosine and adenosine receptors: Newer therapeutic perspective. *Indian Journal of Pharmacology*, 41(3), 97. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.55202>
- Manring, H. R., Dorn, L. E., Ex-Willey, A., Accornero, F., & Ackermann, M. A. (2018). At the heart of inter- and intracellular signaling: The intercalated disc. *Biophysical Reviews*, 10(4), 961. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0430-7>
- Marks, A. R. (2013). Calcium cycling proteins and heart failure: Mechanisms and therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(1), 46–52. <https://doi.org/10.1172/JCI62834>
- Martínez, M. S., García, A., Luzardo, E., Chávez-Castillo, M., Olivar, L. C., Salazar, J., Velasco, M., Quintero, J. J. R., & Bermúdez, V. (2017). Energetic metabolism in cardiomyocytes: Molecular basis of heart ischemia and arrhythmogenesis. *Vessel Plus*, 1(0), 130–141. <https://doi.org/10.20517/2574-1209.2017.34>
- Matienzo, D., & Bordoni, B. (2024). Anatomy, Blood Flow. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554457/>
- Matuz-Mares, D., González-Andrade, M., Araiza-Villanueva, M. G., Vilchis-Landeros, M. M., & Vázquez-Meza, H. (2022). Mitochondrial Calcium: Effects of Its Imbalance in Disease. *Antioxidants*, 11(5), 801. <https://doi.org/10.3390/antiox11050801>
- Mezzano, V., Pellman, J., & Sheikh, F. (2014). Cell Junctions in the Specialized Conduction System of the Heart. *Cell Communication & Adhesion*, 21(3), 149. <https://doi.org/10.3109/15419061.2014.905928>
- Mezzano, V., & Sheikh, F. (2011). Cell–cell junction remodeling in the heart: Possible role in cardiac conduction system function and arrhythmias? *Life Sciences*, 90(9–10), 313. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.009>
- Mishra, J., Davani, A. J., Natarajan, G. K., Kwok, W.-M., Stowe, D. F., & Camara, A. K. (2019). Cyclosporin A Increases Mitochondrial Buffering of Calcium: An Additional Mechanism in Delaying Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. *Cells*, 8(9), 1052. <https://doi.org/10.3390/cells8091052>

- Mukherjee, A., Ghosh, K. K., Chakraborty, S., Gulyás, B., Padmanabhan, P., & Ball, W. B. (2024). Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Infection and Immunity. *Biomolecules*, 14(6), 670. <https://doi.org/10.3390/biom14060670>
- Murphy, E., & Liu, J. C. (2022). Mitochondrial calcium and reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 119(5), 1105. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac134>
- Nguyen, T. T., Wei, S., Nguyen, T. H., Jo, Y., Zhang, Y., Park, W., Gariani, K., Oh, C.-M., Kim, H. H., Ha, K.-T., Park, K. S., Park, R., Lee, I.-K., Shong, M., Houtkooper, R. H., & Ryu, D. (2023). Mitochondria-associated programmed cell death as a therapeutic target for age-related disease. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(8), 1595. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01046-5>
- Nielsen, M. S., Opbergen, C. J. M. van, Veen, T. A. B. van, & Delmar, M. (2023). The intercalated disc: A unique organelle for electromechanical synchrony in cardiomyocytes. *Physiological Reviews*, 103(3), 2271. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2022>
- Novakovic, G. V., Eschenhagen, T., & Mummery, C. (2014). Myocardial Tissue Engineering: In Vitro Models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(3), a014076. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014076>
- Ojha, N., & Dhamoon, A. S. (2024). Myocardial Infarction. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537076/>
- Ong, S.-B., Samanguoi, P., Kalkhoran, S. B., & Hausenloy, D. J. (2015). The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.005>
- Park, S., Ranjbarvaziri, S., Zhao, P., & Ardehali, R. (2020). Cardiac Fibrosis Is Associated With Decreased Circulating Levels of Full-Length CILP in Heart Failure. *JACC: Basic to Translational Science*, 5(5), 432. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.01.016>
- Patra, C., Zhang, X., & Brady, M. F. (2024). Physiology, Bundle of His. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531498/>
- Paz-Artigas, L., Montero-Calle, P., Iglesias-García, O., Mazo, M. M., Ochoa, I., & Ciriza, J. (2023). Current approaches for the recreation of cardiac ischaemic environment *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutics*, 632, 122589. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122589>
- Pedrosa, A. M., & Lemes, R. P. G. (2020). Gene expression of HIF-1 α and VEGF in response to hypoxia in sickle cell anaemia: Influence of hydroxycarbamide. *British Journal of Haematology*, 190(1), e39–e42. <https://doi.org/10.1111/bjh.16693>
- Petiti, J., Revel, L., & Divieto, C. (2024). Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. *Biosensors*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/bios14040156>
- Pickoff, A. S. (2011). 66—Developmental Electrophysiology in the Fetus and Neonate. R. A. Polin, W. W. Fox, & S. H. Abman (Sud.), *Fetal and Neonatal Physiology (Fourth Edition)* (p. 733–756). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3479-7.10066-7>
- Pires, I. M., Bencokova, Z., Milani, M., Folkes, L. K., Li, J.-L., Stratford, M. R., Harris, A. L., & Hammond, E. M. (2010). Effects of acute versus chronic hypoxia on DNA damage responses and genomic instability. *Cancer research*, 70(3), 925–935. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2715>

- Ponce, A., Castillo, A., Hinojosa, L., Martinez-Rendon, J., & Cerejido, M. (2018). The expression of endogenous voltage-gated potassium channels in HEK293 cells is affected by culture conditions. *Physiological Reports*, 6(8), e13663. <https://doi.org/10.14814/phy2.13663>
- Qiu, Q., Shen, T., Yu, X., Jia, N., Zhu, K., Wang, Q., Liu, B., & He, Q. (2021). Cardiac Shock Wave Therapy Alleviates Hypoxia/Reoxygenation-Induced Myocardial Necroptosis by Modulating Autophagy. *BioMed Research International*, 2021(1), 8880179. <https://doi.org/10.1155/2021/8880179>
- Reddy, K., Khaliq, A., & Henning, R. J. (2015). Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction. *World Journal of Cardiology*, 7(5), 243. <https://doi.org/10.4330/wjc.v7.i5.243>
- Rehman, I., & Rehman, A. (2024). Anatomy, Thorax, Heart. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470256/>
- Ripa, R., George, T., Shumway, K. R., & Sattar, Y. (2024). Physiology, Cardiac Muscle. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572070/>
- Rohani, C., Jafarpour, H., Mortazavi, Y., Esbakian, B., & Gholinia, H. (2022). Mortality in patients with myocardial infarction and potential risk factors: A five-year data analysis. *ARYA Atherosclerosis*, 18(3), 1. <https://doi.org/10.48305/arya.v18i0.2427>
- Salaudeen, M. A., Bello, N., Danraka, R. N., & Ammani, M. L. (2024). Understanding the Pathophysiology of Ischemic Stroke: The Basis of Current Therapies and Opportunity for New Ones. *Biomolecules*, 14(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biom14030305>
- Sandoo, A., Zanten, J. J. V. van, Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2010). The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4, 302. <https://doi.org/10.2174/1874192401004010302>
- Saxton, A., Tariq, M. A., & Bordoni, B. (2024). Anatomy, Thorax, Cardiac Muscle. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535355/>
- Schirone, L., Forte, M., Palmerio, S., Yee, D., Nocella, C., Angelini, F., Pagano, F., Schiavon, S., Bordin, A., Carrizzo, A., Vecchione, C., Valenti, V., Chimenti, I., Falco, E. D., Sciarretta, S., & Frati, G. (2017). A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 3920195. <https://doi.org/10.1155/2017/3920195>
- Schwarzwald, C. C., Bonagura, J. D., & Muir, W. W. (2009). Chapter 3—The Cardiovascular System. W. W. Muir & J. A. E. Hubbell (Sud.), *Equine Anesthesia (Second Edition)* (p. 37–100). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2326-5.00003-1>
- Sharov, V. G., Todor, A., Khanal, S., Imai, M., & Sabbah, H. N. (2006). Cyclosporine A Attenuates Mitochondrial Permeability Transition and Improves Mitochondrial Respiratory Function in Cardiomyocytes Isolated from Dogs With Heart Failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(1), 150. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.09.013>
- Shi, L.-B., Huang, J.-H., & Han, B.-S. (2007). Hypoxia inducible factor-1 α mediates protective effects of ischemic preconditioning on ECV-304 endothelial cells. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 13(16), 2369. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i16.2369>
- Silva, K. A. S., & Emter, C. A. (2020). Large Animal Models of Heart Failure: A Translational Bridge to Clinical Success. *JACC: Basic to Translational Science*, 5(8), 840. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2020.04.011>
- Silvis, M. J. M., Kaffka genaamd Dengler, S. E., Odille, C. A., Mishra, M., van der Kaaij, N. P., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P. G., de Kleijn, D. P. V., de Jager, S. C. A., Bosch, L., & van Hout, G. P. J. (2020). Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and

-
- Heart Transplantation: The Road to Translational Success. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599511>
- Soares, R. O. S., Losada, D. M., Jordani, M. C., Évora, P., & Castro-e-Silva, O. (2019). Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20205034>
- Soliman, A. M., & Barreda, D. R. (2023). Acute Inflammation in Tissue Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms24010641>
- Solomon, T., Rajendran, M., Rostovtseva, T., & Hool, L. (2022). How cytoskeletal proteins regulate mitochondrial energetics in cell physiology and diseases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 377(1864), 20210324. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0324>
- Souza-Neto, F. V., Islas, F., Jiménez-González, S., Luaces, M., Ramchandani, B., Romero-Miranda, A., Delgado-Valero, B., Roldan-Molina, E., Saiz-Pardo, M., Cerón-Nieto, M. Á., Ortega-Medina, L., Martínez-Martínez, E., & Cachofeiro, V. (2022). Mitochondrial Oxidative Stress Promotes Cardiac Remodeling in Myocardial Infarction through the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress. *Antioxidants*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/antiox11071232>
- Srinivasan, V., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Brown, G. M., & Cardinali, D. P. (2011). Melatonin in Mitochondrial Dysfunction and Related Disorders. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 326320. <https://doi.org/10.4061/2011/326320>
- Stephenson, R. B. (2020). 19—Electrical Activity of the Heart. B. G. Klein (Sud.), *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology (Sixth Edition)* (p. 186–202). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55227-1.00019-3>
- Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., & Peng, Z.-Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 5080843. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Suo, M., Qi, Y., Liu, L., Zhang, C., Li, J., Yan, X., Zhang, C., Ti, Y., Chen, T., & Bu, P. (2022). SS31 Alleviates Pressure Overload-Induced Heart Failure Caused by Sirt3-Mediated Mitochondrial Fusion. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.858594>
- Taylor, C. T., & Scholz, C. C. (2022). The effect of HIF on metabolism and immunity. *Nature Reviews Nephrology*, 18(9), 573–587. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00587-8>
- Talman, V., & Ruskoaho, H. (2016). Cardiac fibrosis in myocardial infarction—From repair and remodeling to regeneration. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 563. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2431-9>
- Tapia, C., Nessel, T. A., & Zito, P. M. (2024). Cyclosporine. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482450/>
- Tarocco, A., Caroccia, N., Morciano, G., Wieckowski, M. R., Ancora, G., Garani, G., & Pinton, P. (2019). Melatonin as a master regulator of cell death and inflammation: Molecular mechanisms and clinical implications for newborn care. *Cell Death & Disease*, 10(4), 317. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1556-7>
- Tavernarakis, N. (2007). Cardiomyocyte necrosis: Alternative mechanisms, effective interventions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(4), 480–482. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.011>

- Tobeiha, M., Jafari, A., Fadaei, S., Mirazimi, S. M. A., Dashti, F., Amiri, A., Khan, H., Asemi, Z., Reiter, R. J., Hamblin, M. R., & Mirzaei, H. (2022). Evidence for the Benefits of Melatonin in Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 888319. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.888319>
- Trager, L. E., Lyons, M., Kuznetsov, A., Sheffield, C., Roh, K., Freeman, R., Rhee, J., Guseh, J. S., Li, H., & Rosenzweig, A. (2023). Beyond cardiomyocytes: Cellular diversity in the heart's response to exercise. *Journal of Sport and Health Science*, 12(4), 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2022.12.011>
- Tzahor, E., & Poss, K. D. (2017). Cardiac regeneration strategies: Staying young at heart. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6342), 1035. <https://doi.org/10.1126/science.aam5894>
- van Doorn, E. C. H., Amesz, J. H., Sadeghi, A. H., de Groot, N. M. S., Manintveld, O. C., & Taverne, Y. J. H. J. (2024). Preclinical Models of Cardiac Disease: A Comprehensive Overview for Clinical Scientists. *Cardiovascular Engineering and Technology*, 15(2), 232–249. <https://doi.org/10.1007/s13239-023-00707-w>
- Villiers, C. D., & Riley, P. R. (2020). Mouse models of myocardial infarction: Comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion. *Disease Models & Mechanisms*, 13(11), dmm046565. <https://doi.org/10.1242/dmm.046565>
- von Kortzfleisch, V., Karp, N., Palme, R., Kaiser, S., Sachser, N., & Richter, S. (2020). Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several „mini-experiments“. *Scientific Reports*, 10, 16579. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73503-4>
- Walkon, L. L., Strubbe-Rivera, J. O., & Bazil, J. N. (2022). Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism. *Biomolecules*, 12(12), 1891. <https://doi.org/10.3390/biom12121891>
- Wand, A. L., Pavlovic, N., Duvall, C., Rosen, N. S., Chasler, J., Griffin, J. M., Okada, D. R., Jefferson, A., Chrispin, J., Tandri, H., Mathai, S. C., Sharp, M., Chen, E. S., Kasper, E. K., Hays, A. G., & Gilotra, N. A. (2022). Effect of Corticosteroids on Left Ventricular Function in Patients With Cardiac Sarcoidosis. *The American Journal of Cardiology*, 177, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2022.04.051>
- Wang, R., Wang, M., He, S., Sun, G., & Sun, X. (2020). Targeting Calcium Homeostasis in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: An Overview of Regulatory Mechanisms and Therapeutic Reagents. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00872>
- Wei, X., Yohannan, S., & Richards, J. R. (2024). Physiology, Cardiac Repolarization Dispersion and Reserve. *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537194/>
- Wheaton, W. W., & Chandel, N. S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 300(3), C385–C393. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>
- Whitaker, R. H. (2014). Anatomy of the heart. *Medicine*, 42(8), 406–408. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.05.007>
- White, S. M., Constantin, P. E., & Claycomb, W. C. (2004). Cardiac physiology at the cellular level: Use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(3), H823–H829. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00986.2003>
- Woo, A. Y. H., Cheng, C. H. K., & Wayne, M. M. Y. (2005). Baicalein protects rat cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation damage via a prooxidant mechanism. *Cardiovascular Research*, 65(1), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.09.027>

-
- Wu, K., Xu, W., You, Q., Guo, R., Feng, J., Zhang, C., & Wu, W. (2012). Increased expression of heat shock protein 90 under chemical hypoxic conditions protects cardiomyocytes against injury induced by serum and glucose deprivation. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(5), 1138–1144. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1099>
- Xiang, M., Lu, Y., Xin, L., Gao, J., Shang, C., Jiang, Z., Lin, H., Fang, X., Qu, Y., Wang, Y., Shen, Z., Zhao, M., & Cui, X. (2021). Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 6614009. <https://doi.org/10.1155/2021/6614009>
- Xu, H., & Remmen, H. V. (2021). The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: A potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skeletal Muscle*, 11, 25. <https://doi.org/10.1186/s13395-021-00280-7>
- Zacharioudakis, E., Agianian, B., Mv, V. K., Biris, N., Garner, T. P., Rabinovich-Nikitin, I., Ouchida, A. T., Margulets, V., Nordstrøm, L. U., Riley, J. S., Dolgalev, I., Chen, Y., Wittig, A. J. H., Pekson, R., Mathew, C., Wei, P., Tsigirgos, A., Tait, S. W. G., Kirshenbaum, L. A., ... Gavathiotis, E. (2022). Modulating mitofusins to control mitochondrial function and signaling. *Nature Communications*, 13, 3775. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31324-1>
- Zhang, H., Wang, Y., Wu, K., Liu, R., Wang, H., Yao, Y., Kvietys, P., & Rui, T. (2022). miR-141 impairs mitochondrial function in cardiomyocytes subjected to hypoxia/reoxygenation by targeting Sirt1 and MFN2. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 24(6), 1–12. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11699>
- Zhang, M., Liu, Q., Meng, H., Duan, H., Liu, X., Wu, J., Gao, F., Wang, S., Tan, R., & Yuan, J. (2024). Ischemia-reperfusion injury: Molecular mechanisms and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1–39. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01688-x>
- Zhang, W., Hu, X., Shen, Q., & Xing, D. (2019). Mitochondria-specific drug release and reactive oxygen species burst induced by polyprodrug nanoreactors can enhance chemotherapy. *Nature Communications*, 10(1), 1704. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09566-3>
- Zhou, T., Prather, E. R., Garrison, D. E., & Zuo, L. (2018). Interplay between ROS and Antioxidants during Ischemia-Reperfusion Injuries in Cardiac and Skeletal Muscle. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms19020417>
- Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(2), 51.
- Zong, Y., Li, H., Liao, P., Chen, L., Pan, Y., Zheng, Y., Zhang, C., Liu, D., Zheng, M., & Gao, J. (2024). Mitochondrial dysfunction: Mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1–29. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01839-8>