

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

Arvydas Strazdauskas

**INKSTŲ IŠEMIJOS/REPERFUZIJOS
REIKŠMĖ MITOCHONDRIJŲ
KARDIOLIPINO OKSIDACIJAI
IR RESINTEZEI: MOLEKULINIŲ
MECHANIZMŲ TYRIMAS**

Daktaro disertacija
Gamtos mokslai,
biologija (N 010)

Kaunas, 2025

Disertacija rengta 2020–2024 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijoje.

Mokslinė vadovė

prof. dr. Rasa Baniienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Konsultantė

prof. dr. Sonata Trumbeckaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Jurgita Skiecevičienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

dr. Paulina Vaitkienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

doc. dr. Povilas Ignatavičius (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001);

prof. dr. Rimantas Daugelavičius (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010);

prof. dr. Nicola Bernabò (Teramo universitetas (Italija), gamtos mokslai, biologija – N 010).

Disertacija bus ginama viešajame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2025 m. birželio 25 d. 11 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro A-203 auditorijoje. Disertacijos gynimo vietos adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162 Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES

Arvydas Strazdauskas

**THE EFFECT OF RENAL ISCHEMIA/
REPERFUSION ON MITOCHONDRIAL
CARDIOLIPIN OXIDATION AND
RESYNTHESIS: INVESTIGATION OF
MOLECULAR MECHANISMS**

Doctoral Dissertation
Natural Sciences,
Biology (N 010)

Kaunas, 2025

Dissertation has been prepared at the Laboratory of Biochemistry of Neuroscience Institute of the Medical Academy of the Lithuanian University of Health Sciences during the period of 2020–2024 year.

Scientific supervisor

Prof. Dr. Rasa Baniienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Consultant

Prof. Dr. Sonata Trumbeckaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

The dissertation is defended at the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences.

Chairperson

Prof. Dr. Jurgita Skiecevičienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Dr. Paulina Vaitkienė (Lithuanian University of Health Sciences, Natural Sciences, Biology – N 010);

Assoc. Prof. Dr. Povilas Ignatavičius (Lithuanian University of Health Sciences, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001);

Prof. Dr. Rimantas Daugelavičius (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biology – N 010);

Prof. Dr. Nicola Bernabò (University of Teramo (Italy), Natural Sciences, Biology – N 010).

Dissertation will be defended at the open session of the Biology Research Council of the Lithuanian University of Health Sciences at 11 a.m. on the 25th of June 2025 in the auditorium A-203 of the Centre for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies of the Lithuanian University of Health Sciences.

Address: Sukilėlių 13, LT-50162 Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Kardiolino struktūra, savybės ir paplitimas	13
1.2. Kardiolino sintezė ir remodeliavimas	15
1.3. Kardiolino funkcijos.....	20
1.3.1. Kardiolino vaidmuo mitochondrijų struktūroje.....	20
1.3.2. Kardiolino sąveika su mitochondrijų oksidacinio fosforilimo sistema.....	21
1.3.3. Kardiolino vaidmuo apoptozės ir mitofagijos metu	24
1.3.4. Kardiolino sąveika su kitais baltymais	27
1.4. Kardiolino pažaidos molekuliniai mechanizmai	28
1.4.1. Kardiolino oksidacijos mechanizmai	28
1.4.2. Kardiolino hidrolizės mechanizmai.....	31
1.4.3. Išemija ir reperfuzija bei kardiolino pažaida	32
2. TYRIMO METODAI.....	36
2.1. Inkstų išemijos/reperfuzijos <i>in vivo</i> modelis	36
2.2. Inkstų mitochondrijų izoliavimas	37
2.3. Ląstelių kultūra.....	37
2.4. <i>In vitro</i> hipoksijos/reoksigenacijos modelis	38
2.5. Baltymo kiekio nustatymas mitochondrijų suspensijoje ir ląstelių lizatuose.....	38
2.6. Ląstelių gyvybingumo ir proliferacijos vertinimas	39
2.7. Mitochondrijų kvėpavimo greičio registravimas	40
2.8. Vandens peroksido susidarymo greičio vertinimas RPTEC ląstelėse.....	43
2.9. Kardiolino kiekio analizė RPTEC ląstelėse fluorimetriu metodu.....	43
2.10. Lipidų išskyrimas	43
2.11. Kardiolino standarto oksidacija.....	44
2.12. Kardiolino kokybinė ir kiekybinė analizė chromatografijos-masių spektrometrijos metodu	44
2.13. Visuminės RNR išgryninimas iš RPTEC ląstelių ir žiurkės inkstų.....	46
2.14. Kopijinės DNR sintezė.....	46
2.15. Genų raiškos analizė realaus laiko polimerazės grandininė reakcija	47
2.16. Kardiolino sintezės/remodeliavimo fermentų ir HIF-1 α veiksnio kiekio analizė RPTEC ląstelėse.....	48
2.17. Fosfolipazės A γ kiekio analizė RPTEC ląstelėse	48
2.18. Malondialdehido nustatymas RPTEC ląstelėse.....	49
2.19. Statistinė duomenų analizė.....	49
3. REZULTATAI.....	50
3.1. Kardiolino ir jo oksidacijos produktų identifikavimas chromatografijos- masių spektrometrijos metodu.....	50
3.1.1. Kardiolino standarto analizė.....	50
3.1.2. Kardiolino kokybinė analizė žiurkės inkstų mitochondrijose ir žmogaus inkstų ląstelėse	56

3.2. Išemijos/reperfuzijos <i>in vivo</i> poveikis žiurkės inkstų mitochondrijų kardiolipinui.....	63
3.2.1. Išemijos <i>in vivo</i> poveikis žiurkės inkstų kardiolipino ir TLCL oksidacijos produktų kiekiui	63
3.2.2. Išemijos/reperfuzijos <i>in vivo</i> poveikis žiurkės inkstų kardiolipino ir TLCL oksidacijos produktų kiekiui	68
3.2.3. Išemijos/reperfuzijos <i>in vivo</i> poveikis žiurkės inkstų kardiolipino sintezės ir remodeliavimo fermentų genų raiškai.....	73
3.3. Hipoksijos/reoksigenacijos <i>in vitro</i> poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių gyvybingumui, mitochondrijų funkcijoms, kardiolipino kiekybiniam pokyčiams ir jų mechanizms	75
3.3.1. Hipoksijos/reoksigenacijos <i>in vitro</i> poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių gyvybingumui ir mitochondrijų funkcijoms	76
3.3.2. Hipoksijos/reoksigenacijos <i>in vitro</i> poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipino kiekiui.....	80
3.3.3. Hipoksijos/reoksigenacijos <i>in vitro</i> poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipino sintezės ir remodeliavimo fermentų kiekiui, jų genų raiškai bei HIF-1 α veiksnio kiekiui	84
3.3.4. Hipoksijos/reoksigenacijos <i>in vitro</i> poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių lipidų peroksidacijai ir hidrolizei.....	86
3.3.5. Hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-deoksi-D-gliukozės <i>in vitro</i> poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipino metabolizmui	88
4. REZULTATŲ APTARIMAS	96
4.1. Žiurkės inkstų mitochondrijų ir žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipino įvairovė	97
4.2. Išemijos/reperfuzijos <i>in vivo</i> poveikis kardiolipino kiekybiniam/ kokybiniam pokyčiams	100
4.3. Hipoksijos/reoksigenacijos <i>in vitro</i> poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių gyvybingumui, mitochondrijų funkcijoms, oksidaciniam stresui	105
4.4. Hipoksijos/reoksigenacijos <i>in vitro</i> poveikio žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipinui molekuliniai mechanizmai	108
IŠVADOS.....	115
SUMMARY	116
LITERATŪROS SĄRAŠAS	172
MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS.....	190
CURRICULUM VITAE	193
PADĖKA	194

SANTRUMPOS

2-dG	– 2-deoksi-D-gliukozė
4-HNE	– 4-hidroksi-2-nonenalis
ACTB	– aktinas beta (angl. <i>Actin beta</i>)
ADP	– adenozino difosfatas (angl. <i>adenosine diphosphate</i>)
ALCAT1	– acil-KoA:lizokardiolipino aciltransferazė 1 (angl. <i>acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase 1</i>)
APAF-1	– apoptotines proteazės aktyvuojantis veiksnys (angl. <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>)
ATP	– adenozino trifosfatas (angl. <i>adenosine triphosphate</i>)
CDP-DAG	– citidino difosfato-diacilglicerolis (angl. <i>cytidine diphosphate-diacylglycerol</i>)
CL	– kardiolipinas (angl. <i>cardiolipin</i>)
CRLS1	– kardiolipino sintazė
C_T	– slenkstinio ciklo vertė (angl. <i>cycle of threshold</i>)
DAMP	– su pažeidimu susiję molekuliniai veiksniai (angl. <i>damage-associated molecular patterns</i>)
DMEM	– ląstelių mitybinė terpė (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
dNTP	– deoksinukleotidų trifosfatai
Drp1	– su dinaminu susijęs baltymas 1 (angl. <i>Dynamamin-related protein 1</i>)
EDTA	– etilendiamintetraacto rūgštis
EGTA	– etilenglikolio tetraacto rūgštis
FADD	– su Fas susietas mirties domenas (angl. <i>Fas-associated death domain</i>)
FAD	– flavino adenino dinukleotidas, oksiduota forma
FADH₂	– flavino adenino dinukleotidas, redukuota forma
HBSS	– Hanko subalansuotas druskos tirpalas (angl. <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HEK	– žmogaus inkstų embrioninės ląstelės (angl. <i>Human embryonic kidney cells</i>)
HEPES	– 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinoetanosulfoninė rūgštis
HIF-1α	– hipoksijos indukuojamas veiksnys 1 α
iPLA₂γ	– nuo kalcio nepriklausoma fosfolipazė A ₂ γ (angl. <i>calcium-independent phospholipase A₂γ</i>)

LC3	– su mikrovamzdeliais susieto baltymo lengvoji grandinė 3 (angl. <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>)
LCLAT1	– lizokardiolipino aciltransferazė 1 (angl. <i>lysocardiolipin acyltransferase 1</i>)
m/z	– masės/krūvio santykis
MICOS	– mitochondrijų kontakto sričių ir kristų organizavimo sistema (angl. <i>mitochondrial contact site and cristae organizing system</i>)
MLCLAT1	– monolizokardiolipino aciltransferazė 1 (angl. <i>monolysocardiolipin acyltransferase 1</i>)
MRM	– daugybinių reakcijų stebėjimas (angl. <i>multiple reaction monitoring</i>)
NAD⁺	– nikotinamido dinukleotidas, oksiduota forma
NADH	– nikotinamido dinukleotidas, redukuota forma
NAO	– 10-N-nonil-akridino oranžas
Opa1	– mitochondrinė į dinaminą panaši GTPazė (angl. <i>mitochondrial dynamin like GTPase, Optic atrophy 1</i>)
PGS	– fosfatidilglicerolio sintazė (angl. <i>phosphatidylglycerol synthase</i>)
PNPLA8	– nuo kalcio nepriklausomos fosfolipazės A ₂ γ domenas (angl. <i>Patatin like phospholipase domain containing 8</i>)
PTPMT1	– mitochondrinė baltymų tirozino fosfatazė (angl. <i>Protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1</i>)
PVDF	– polivinilideno fluoridas
RNR	– ribonukleorūgštis
ROS	– aktyvūs deguonies junginiai (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPTEC	– inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinės ląstelės (angl. <i>renal proximal tubule epithelial cells</i>)
RT-PCR	– realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (angl. <i>Real-time polymerase chain reaction</i>)
TAZ	– tafazinas
TLCL	– tetralinoleil-kardiolipinas (angl. <i>tetra-linoleoyl cardiolipin</i>)
UPLC-MS/MS	– ultraefektyvioji skysčių chromatografija-tandeminė masių spektrometrija (angl. <i>Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>)

IVADAS

Kardiolipinas yra unikalios struktūros fosfolipidas, kurio daugiausiai randama eukariotinių ląstelių mitochondrijų membranose. Kardiolipino dimerinę molekulę sudaro centrinis glicerolio fragmentas, kuris jungia dvi fosfatidinės rūgšties liekanas, turinčias po dvi riebalų rūgštis. Tokia sudėtinga kardiolipino struktūra nulemia funkcijai specifines savybes – kardiolipino gebėjimą sudaryti nedvisluoksnes heksagonines struktūras membranose, įgyti neigiamą krūvį bei sąveikauti su baltymais [1,2]. Išskirtinę kardiolipino struktūrą suformuoja jo *de novo* sintezės mechanizmas, o kardiolipino riebalų rūgščių sudėtį lemia remodeliavimo procesas, kuris suformuoja audiniu/organui specifinį kardiolipiną [3]. Remodeliavimo proceso metu į kardiolipiną įjungiamos įvairios mono- ir polinesočiosios riebalų rūgštys, todėl kardiolipino struktūrinė įvairovė yra labai didelė. Tačiau, yra nustatyta, jog dominuojanti riebalų rūgštis žinduolių kardiolipine yra linolo, o dominuojanti kardiolipino forma žinduolių mitochondrijose yra tetralinoleil-kardiolipinas (kardiolipinas su keturiomis linolo riebalų rūgštimis) [4]. Dėl ypatingų molekulinų savybių, kardiolipinas turi reikšmingą vaidmenį mitochondrijų ir ląstelės homeostazėje. Kardiolipinas yra ypač svarbus formuojant vidinės mitochondrijų membranos išlinkius-kristas, taip pat yra reikalingas mitochondrijų membranų dinamikos procesuose – dalinantis ir susiliejančioms mitochondrijų membranoms [5,6]. Kardiolipinas taip pat būtinas mitochondrijų oksidacinės fosforilinimo sistemos kompleksų stabilumui palaikyti bei optimaliai veiklai užtikrinti [7]. Kardiolipinas turi svarbų vaidmenį mitochondrijų autofagijos procese, taip pat yra reikšmingas ląstelės apoptozės molekulinuose mechanizmuose [8,9]. Kardiolipino struktūriniai ar kiekio pokyčiai mitochondrijose lemia mitochondrijų funkcijų sutrikimus, dėl kurių pažeidžiamos ir pačios ląstelės, audiniai ir organai [10]. Dėl kardiolipino lokalizacijos ties mitochondrijų elektronų pernašos grandinės kompleksais, kuriuose susidaro aktyvūs deguonies junginiai, bei dėl kardiolipino molekulėje esančių polinesočiųjų riebalų rūgščių, kardiolipinas gali tapti tiesioginiu taikiniu oksidacijai esant patologinėmis sąlygomis. Vykstant kardiolipino oksidacijai pakinta jo struktūra, savybės ir sąveika su baltymais, todėl sutrinka ir mitochondrijų funkcijos [11,12]. Kardiolipino oksidacijos metu susidaro didelė oksidacijos produktų įvairovė, tarp kurių ir oksiduoto kardiolipino fragmentacijos produktai, kurie gali dalyvauti tolimesnėje mitochondrijų ir ląstelės pažeidoje [13]. Kardiolipino oksidacija suintensyvėja oksidacinio streso metu, kuomet vyksta intensyvus aktyvių deguonies junginių susidarymas mitochondrijose. Oksidacinio streso pažeida ypač pasireiškia išemijos/reperfuzijos metu [14]. Išemijos metu sutrikus arterinei kraujotakai, nutrūkęs deguonies ir maisto medžiagų tiekimas į ląsteles

lemia struktūrinės ir funkcinės mitochondrijų pažaidas, kurios, priklausomai nuo išemijos trukmės, gal būti negrįžtamos. Atstačius kraujotaką, reperfuzijos metu vyksta dar didesnis oksidacinis pažeidimas, kuris gali vesti į ląstelės žūtį [15]. Inkstai, kaip ir širdis, yra metaboliškai aktyvūs organai, kurių funkcijos priklauso nuo efektyvaus energijos metabolizmo aerobinėmis sąlygomis. Todėl sutrikusi arterinė kraujotaka ir deguonies tiekimas į inkstus išemijos/reperfuzijos metu gali sukelti ilgalaikę pažaidą. Inkstų proksimaliniai kanalėliai yra ypač jautrūs deguonies koncentracijos pokyčiams, nes turi ribotas galimybes generuoti energiją be deguonies [16,17]. Inkstų išemijos/reperfuzijos pažaida pasireiškia ne tik esant patologinėms sąlygoms, pavyzdžiui, esant širdies darbo sutrikimams, šokui, sepsiui, traumai, bet yra sukeliamą ir operacijų metu, tokių, kaip inkstų transplantacija. Išemijos/reperfuzijos pažaida inkstuose gali lemti ląstelių žūtį, inksto struktūrų atrofiją, audinių fibrozę, ilgalaikius inkstų funkcijos sutrikimus ir net mirtį. Ūminis inkstų pažeidimas dėl išemijos/reperfuzijos išlieka didelė problema su mažai efektyvių gydymo ar prevencijos būdų [18,19]. Literatūroje beveik nėra duomenų apie pažaidą kardiolipinui inkstų išemijos/reperfuzijos metu. Yra atlikta tyrimų, kuriuose analizuota kardiolipino pažaida kituose organuose, pavyzdžiui, širdyje ir smegenyse, tačiau trūksta informacijos apie kardiolipinus, jų kokybinius ir kiekybinius pokyčius inkstų išemijos/reperfuzijos metu. Taip pat yra tyrimų, rodančių, jog bendras kardiolipino kiekis išemijos/reperfuzijos metu nekin-ta, nepaisant didėjančio oksidacijos produktų kiekio [20–23]. Tai parodo, jog išemijos/reperfuzijos metu gali būti aktyvinami molekuliniai mechanizmai, siekiant išlaikyti kardiolipino kiekį mitochondrijose bei apsaugoti kardiolipiną ir mitochondrijas nuo išemijos/reperfuzijos pažaidos. Tačiau informacijos apie kardiolipino resintezės mechanizmus išemijos/reperfuzijos metu nėra. Reikalingi išsamūs tyrimai, kurie atskleistų inkstų išemijos/reperfuzijos metu sukeliamą kardiolipino pažaidą ir poveikį kardiolipino kiekybinių bei kokybi-nių pokyčių molekuliniams mechanizms inkstų mitochondrijose.

Šiame darbe nagrinėjamas išemijos/reperfuzijos *in vivo* bei *in vitro* povei-kis inkstų kardiolipino kokybiniais ir kiekybiniais pokyčiams bei molekuliniams mechanizms, susijusiems su kardiolipino pažaida ir resinteze. Tyrimas atliktas naudojant žiurkės inkstų išemijos/reperfuzijos *in vivo* modelį bei žmogaus inkstų ląstelių hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* modelį, kurie taip pat leido palyginti kardiolipino pažaidos mechanizmus skirtingų organizmų inkstų mitochondrijose.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas

Ištirti išemijos bei išemijos/reperfuzijos poveikio kardiolipino kiekybiniam ir kokybiniam pokyčiams inkstų mitochondrijose molekulinis mechanizmas.

Darbo uždaviniai:

1. Ištirti išemijos ir išemijos/reperfuzijos *in vitro* bei *in vivo* poveikį kardiolipino kiekybiniam pokyčiams.
2. Įvertinti išemijos ir išemijos/reperfuzijos poveikį kardiolipino oksidacijai, nustatyti galimus oksidacijos produktus.
3. Įvertinti išemijos bei išemijos/reperfuzijos poveikį kardiolipino resin-tezei.

Darbo naujumas ir mokslinis aktualumas

Išemijos/reperfuzijos poveikis kardiolipino kokybiniam ir kiekybiniam pokyčiams yra toliau tyrinėjamas širdies ar smegenų mitochondrijose, tačiau yra žinoma, jog įvairiuose organuose pažaidos lygmuo išemijos/reperfuzijos metu gali būti skirtingas, todėl ir kardiolipino pažaidos mechanizmai gali būti nevienodi skirtinguose organuose [20,24,25]. Molekuliniai kardiolipino pažaidos mechanizmai inkstų mitochondrijose išemijos/reperfuzijos metu nėra pakankamai ištirti. Šiame darbe mes pirmą kartą parodėme, jog jau išemijos *in vivo* metu žiurkės inkstuose tetralinoleil-kardiolipinas buvo oksiduojamas ir susiformavo kardiolipino oksidacijos produktai, papildomai prisijungę nuo vieno iki aštuonių deguonies atomų. Taip pat parodėme, jog inkstų išemijos *in vivo* metu kardiolipino oksidacijos produktų kiekiai reikšmingai padidėjo. Mūsų tyrimų metu nustatyta, jog tiek dominuojančio tetralinoleil-kardiolipino, tiek kitų kardiolipinų kiekiai inkstų išemijos *in vivo* metu reikšmingai sumažėjo, tačiau po išemijos/reperfuzijos *in vivo* žiurkės inkstų mitochondrijose dominuojančio tetralinoleil-kardiolipino kiekis reikšmingai didėjo. Taip pat šiame darbe pirmą kartą parodyta, jog inkstų išemijos ir išemijos/reperfuzijos *in vivo* metu didėjo kardiolipino remodeliavimo fermento tafazino geno raiška. Tiriant hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikį žmogaus inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėms ląstelėms (RPTEC/TERT1) buvo pirmą kartą nustatyta šios ląstelių linijos kardiolipinų struktūra ir įvairovė bei palyginta su žiurkės inkstų kardiolipinais. Šiame darbe pirmą kartą parodyta,

jog *in vitro* hipoksijos/reoksigenacijos metu žmogaus inkstų ląstelių kardiolipinų kiekiai reikšmingai padidėjo. Analizuojant molekulinis kardiolipino kiekybinių pokyčių mechanizmus, buvo pirmą kartą nustatyta, kad hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* metu žmogaus inkstų ląstelėse didėjo kardiolipino sintazės ir kardiolipino remodeliavimo fermento lizokardiolipino aciltransferazės 1 kiekis ir genų raišką. Buvo taip pat parodyta, kad hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* metu žmogaus inkstų ląstelėse didėjo aktyvių deguonies junginių kiekis, kurie sukėlė lipidų peroksidaciją. Mūsų tyrimai atskleidžia, jog nepaisant išemijos/reperfuzijos *in vivo* ir hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* metu vykstančio oksidacinio streso inkstuose, yra aktyvinami kardiolipino sintezės ir remodeliavimo mechanizmai.

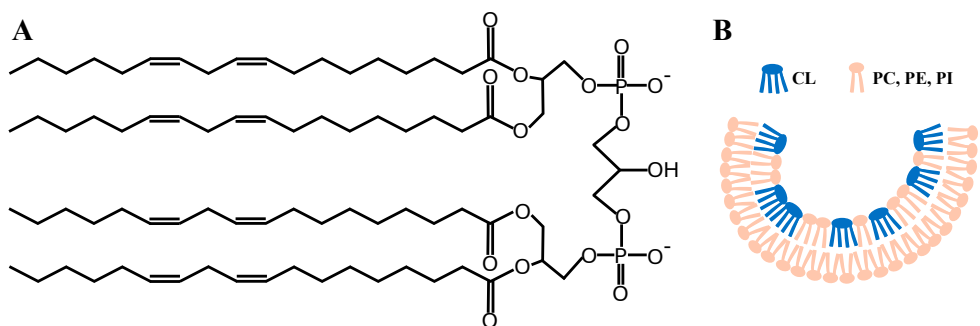
Darbo praktinė reikšmė

Gauti duomenys apie kardiolipino kiekybinius ir kokybinius pokyčius bei šiuos pokyčius lemiančius molekulinis mechanizmus inkstų išemijos/reperfuzijos metu suteikia naujų žinių apie išemijos/reperfuzijos pažaidos patofiziologiją. Duomenys apie kardiolipino sintezės ir remodeliavimo aktyvinimą inkstuose išemijos/reperfuzijos metu gali prisidėti prie naujų molekulinis taikinių paieškos bei naujų biologiškai aktyvių preparatų paieškos ir/ar kūrimo, siekiant apsaugoti inkstų mitochondrijas ir kardiolipiną nuo pažaidos, sukeltos išemijos/reperfuzijos metu.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kardiolipino struktūra, savybės ir paplitimas

Kardiolipinas yra unikalios struktūros fosfolipidas, kuris pirmą kartą buvo izoliuotas 1941 m. amerikiečių mokslininkės Mary C. Pangborn, ji kardiolipiną izoliavo iš jaučio širdies ir būtent dėl to šis lipidas įgavo tokį pavadinimą [26,27]. Kardiolipinas yra siejamas su bioenergetinėmis membranomis (susiėjusiomis su ATP sinteze) ir yra randamas eukariotinių ląstelių mitochondrijų membranose bei bakterijų plazminėje membranoje, tačiau taip pat yra duomenų, jog kardiolipino mažais kiekiais galima rasti ir peroksisomų membranoje [28–30]. Mitochondrijų membranose kardiolipinas sudaro iki 20 proc. visų lipidų kiekio, nors didžiausia jo dalis yra vidinėje mitochondrijų membranoje, kardiolipino taip pat yra ir išorinėje membranoje bei mitochondrijų-endoplazminio tinklo kontakto vietose [31–35]. Kardiolipinas yra glicerofosfolipidas (1,3-*bis(sn-3'-fosfatidil)-sn-glicerolis*), sudarytas iš centrinio glicerolio fragmento, kuris jungia dvi fosfatidinės rūgšties molekules, abi turinčias po dvi riebalų rūgštis (1.1.1 pav. A). Taigi, iš viso kardiolipino dimerinę struktūrą sudaro trys glicerolio fragmentai, dvi fosforo rūgšties liekanos ir keturios riebalų rūgštys. Fosforo rūgšties liekanos, esančios kardiolipino struktūroje leidžia kardiolipino molekulei įgauti dvigubą neigiamą krūvį fiziologiniame pH ir parodo, kad kardiolipinas pasižymi rūgštinėmis savybėmis [36–38]. Dėl šios polinės hidrofilinės grupės kardiolipinas gali sąveikauti su įvairiais membraniniais baltymais joniniais, elektrostatiniais ryšiais. Kardiolipino riebalų rūgštys gali dalyvauti hidrofobinėje sąveikoje su baltymais [39,40]. Dėl sąlyginai mažos hidrofilinės ir didelės hidrofobinės dalies, kardiolipinas erdvėje įgauna kūgio formą, dėl kurios dvisluoksnėse membranose sukelia jų deformacijas, neigiamus išlinkimus bei formuoja lipidų domenų (1.1.1 pav. B), o vandeninėse terpėse kardiolipinas formuoja išvirkščias heksagonines micelines struktūras [37,41,42].



1.1.1 pav. Kardiopolino, su keturiomis linolo riebalų rūgštimis, struktūra (A), kardiopolino molekulių išsidėstymo mitochondrijų vidinės fosfolipidų membranos fragmente schema (B)

CL – kardiopolinas; PC – fosfatidilcholinai; PE – fosfatidiletanolaminai;
PI – fosfatidilinozitolis.

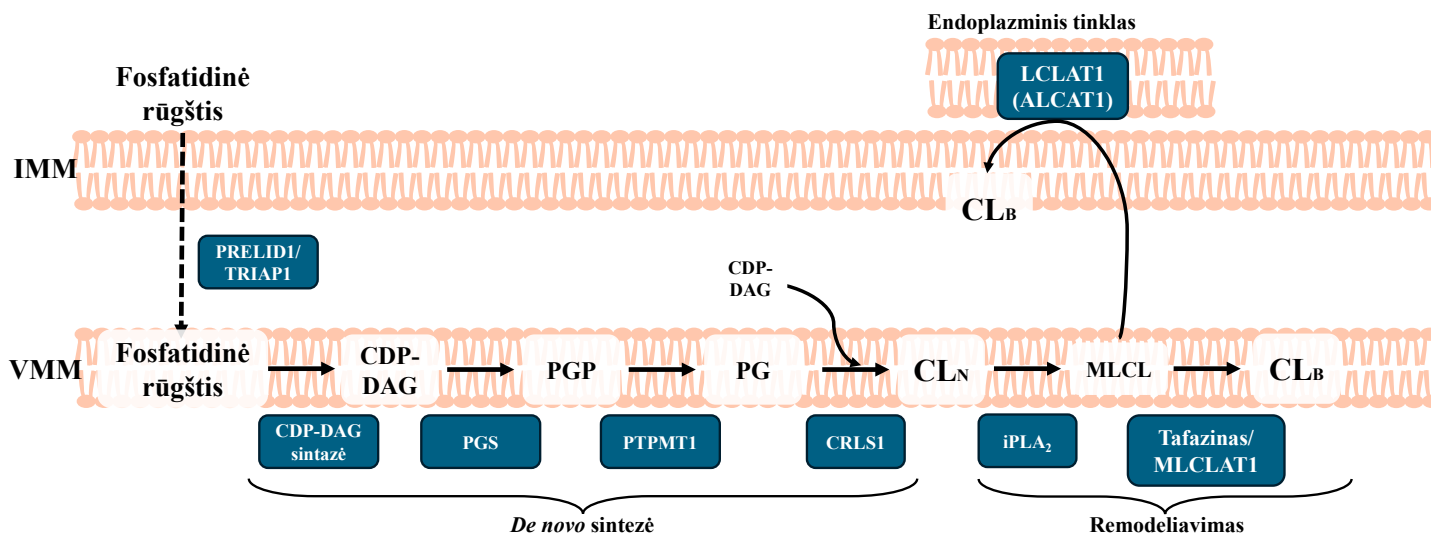
Kadangi kardiopolinas yra siejamas bioenergetinėmis membranomis, kardiopolino kiekis įvairiuose audiniuose ir organuose skiriasi priklausomai nuo jų energetinio poreikio ar oksidacinio metabolizmo aktyvumo, kas paprastai atspindi ir pačių mitochondrijų kiekį. Audiniuose, kuriuose oksidacinis energijos metabolizmas yra intensyvus, pavyzdžiui, širdyje ar inkstuose, kardiopolino yra daugiausiai, o mažiau energijos reikalaujančiuose organuose, tokiuose kaip kepenys, kardiopolino yra mažiau [43–46]. Ne tik paties kardiopolino kiekis skiriasi priklausomai nuo organo, tačiau ir jo riebalų rūgščių sudėtis įvairovė yra skirtinga įvairiuose organuose. 1947 m. buvo pirmą kartą nustatyta jaučio širdies kardiopolino struktūra ir dominuojančios riebalų rūgštys – linolo (C18:2; aštuoniolika anglies atomų ir dvi dvigubosios jungtys) ir oleino (C18:1; aštuoniolika anglies atomų ir viena dviguba jungtis) [47]. Vėliau buvo nustatyta, jog jaučio širdies kardiopolino sudėtyje galima rasti ir C18:3, C16:1, C20:3 riebalų rūgščių bei buvo parodyta, jog dominuoja kardiopolinas turintis keturias linolo riebalų rūgštis – CL (18:2)₄ arba tetralinoleil-kardiopolinas (TLCL). Taip pat buvo nustatyti mažiau dominuojantys kardiopolinai CL (18:2)₃(18:3), CL (18:2)₃(18:1), CL (18:2)₂(18:3)₂ ir kiti [48]. Analizuojant riebalų rūgščių paplitimą kardiopoline buvo nustatyta, kad žinduoliuose, daugelio organų kardiopoline taip pat dominuoja linolo riebalų rūgštis, ne mažą dalį sudaro ir oleino rūgštis [10,49,50]. Nustatyta, kad žiurkės širdies, kepenų, inkstų, skeleto raumenų, riebalinio audinio, odos, blužnies, žarnyno (plonosios, storosios žarnų ir skrandžio), plaučių kardiopoline dominuoja linolo rūgštis ir kiek mažiau yra oleino rūgštis. Taip pat visų šių organų kardiopoline buvo identifikuota eikozapentanoinė rūgštis (C20:5). Blužnies, žarnų, skeleto raumenų, plaučių, kepenų inkstų ir širdies kardiopoli-

ne nustatyta arachidono rūgštis (C20:4). Plaučių, kepenų, inkstų kardioline nustatyta C16:1 (palmitoleino) riebalų rūgštis [45]. Pelės ir kiaulės širdies ir kepenų kardioline didžiausią dalį sudaro C18:2 ir C18:1 riebalų rūgštys [49]. Analizuojant skirtingus kardiolipinus, pagal jų riebalų rūgščių sudėtį, buvo nustatyta, jog žiurkės širdies mitochondrijose dominuoja TLCL, kiek mažiau yra CL (18:2)₃(18:1) ir CL (18:2)₃(22:6), o skeleto raumenų mitochondrijose kardiolino profilis beveik identiškas [50,51]. Žmogaus širdies mitochondrijose dominuojantis kardiolipinas taip pat yra TLCL, kiek mažiau CL (18:2)₃(18:1), o limfoblastuose – CL (18:1)₃(16:1) bei CL (18:1)₄ [52]. Labiausiai išskirtinė yra smegenų kardiolino riebalų rūgščių sudėtis. Žiurkės smegenų mitochondrijose kardiolino sudėtyje vyrauja C18:1 riebalų rūgštis, antroji pagal kiekį yra C20:4, taip pat sutinkama C18:2, C16:1, C22:6 bei C16:0 [45]. Pelės ir kiaulės smegenų kardioline taip pat dominuoja C18:1, kiek mažiau C20:4, C22:6 ir C16:1 [49]. Kiebish ir kt. parodė, kad C57BL/6J ir VM/Dk veislių pelių smegenyse dominuoja kardiolipinai CL (18:1)₄ ir CL (18:1)₃(18:2), tačiau trečias ir ketvirtas pagal kiekį kardiolipinai skyrėsi – C57BL/6J pelių smegenyse tai buvo CL (18:1)₂(20:4)₂ ir CL (18:1)₂(20:4)(22:6), o VM/Dk pelių smegenyse CL (18:1)₃(20:4) ir CL (18:1)₂(18:2)(20:4) [53]. Kaip matoma iš pateiktų pavyzdžių kardiolino struktūra išlieka panaši tuose pačiuose organuose net ir tarp žinduolių, taip pat matoma, jog kardiolino sudėtyje dominuoja nesočiosios riebalų rūgštys. Tačiau yra nustatyta kardiolino ir su sočiosiomis riebalų rūgštimis – labiausiai prisotinto kardiolino CL (16:0)₄ randama žiurkės, pelės ir žmogaus sėklidėse [50,54]. Yra duomenų, kad kardiolino riebalų rūgščių sudėtis gali keistis priklausomai nuo mitybos ar net amžiaus [4,55]. Nepaisant to, tokį kardiolino paplitimą ir struktūrinę įvairovę lemia ypatingas kardiolino sintezės mechanizmas, kuris yra reikalingas tam, kad būtų suformuotas audiniams specifiskas ir funkcionalus kardiolipinas [56].

1.2. Kardiolino sintezė ir remodeliavimas

Kardiolino sintezė susideda iš dviejų etapų – sintezė *de novo* ir remodeliavimas. Kardiolino sintezė *de novo* vyksta vidinėje mitochondrijų membranoje, kurioje išsidėstę visi kardiolino sintezės fermentai. Kardiolino *de novo* sintezės substratas – fosfatidinė rūgštis – yra susintetinama endoplazminiame tinkle, pernešama į mitochondrijas per nešiklius endoplazminio tinklo ir mitochondrijų kontakto zonose bei įterpiama į mitochondrijų vidinę membraną padedant PRELID1/TRIAP1 baltymų kompleksui [57–59]. Pirmoji kardiolino sintezės *de novo* reakcija yra citidino difosfato-diacilglicerolio (CDP-DAG, angl. *cytidinediphosphate-diacylglycerol*) sintezė iš fosfatidinės rūgšties ir citidino trifosfato veikiant mitochondrijų CDP-DAG

sintazei (TAM41) (1.2.1 pav.). Egzistuoja ir endoplazminio tinklo CDP-DAG sintazė, kuri dalyvauja fosfatidilinozitolio sintezėje, tačiau manoma, jog endoplazminiame tinkle susintetintas CDP-DAG taip pat gali būti pernešamas į mitochondrijas kardiopolipino sintezei [60,61]. Kitą reakciją katalizuoja fosfatidilglicerolio fosfato sintazė (PGS), kuri perkelia diacilglicerolio fragmentą ant glicerolio fosfato ir pašalina citidino monofosfatą taip suformuojant fosfatidilglicerolio fosfatą, kurį defosforilina mitochondrijų fosfatazė PTPMT1 (angl. *Protein-tyrosine phosphatase mitochondrial 1*) [31,56]. Fermentas PGS yra kardiopolipino biosintezės kelio mielėse reguliacinis fermentas, kurio aktyvumas sumažėja, kai fermentas yra fosforilinamas [62,63]. Suformavus fosfatidilglicerolį, vykdoma paskutinė kardiopolipino sintezės *de novo* reakcija – veikiant kardiopolipino sintazei (CRLS1) fosfatidilglicerolis jungiamas kartu su dar viena CDP-DAG molekule, pašalinama citidino monofosfato liekana ir suformuojamas „nebrandus“ kardiopolipinas [31,64]. *De novo* sintezės metu susintetinto kardiopolipino riebalų rūgštys dažniausiai būna sočiosios, jų sudėtis yra atsitiktinė ir nespecifiška audiniui, nes kardiopolipino sintezės fermentai neturi jokio specifiškumo konkrečioms riebalų rūgštims, todėl kitas etapas yra kardiopolipino remodeliavimas. Kardiopolipino remodeliavimo metu vyksta kardiopolipino hidrolizė veikiant nuo kalcio nepriklausomoms mitochondrijų fosfolipazėms ir riebalų rūgščių pernaša nuo gretimų fosfolipidų arba acil-KoA ant kardiopolipino veikiant aciltransferazėms [65].



1.2.1 pav. Kardiolino de novo sintezės ir remodeliavimo schema

IMM – išorinė mitochondrijų membrana; VMM – vidinė mitochondrijų membrana; PRELID/TRIAP1 – lipidus pernešantis baltymų kompleksas; CDP-DAG – citidino difosfato-diacilglicerolis; PGS – fosfatidilglicerolio fosfato sintazė; PGP – fosfatidilglicerolio fosfatas; PTPMT1 – mitochondrijų fosfatazė; PG – fosfatidilglicerolis; CRLS1 – kardiolino sintazė; CL_N – „nebrandus“ kardiolipinas; iPLA₂ – nuo kalcio nepriklausoma fosfolipazė A₂; MLCL – monolizokardiolipinas; MLCLAT1 – monolizokardiolino aciltransferazė 1; LCLAT1 – lizokardiolino aciltransferazė 1; ALCAT1 – acil-KoA:lizokardiolino aciltransferazė 1; CL_B – „brandus“ kardiolipinas.

Vienas iš labiausiai išanalizuotų kardiolipino remodeliavimo fermentų yra tafazinas – tai fosfolipidų-lizofosfolipidų aciltransferazė, kuri randama mitochondrijų tarpmembraninėje erdmėje [10]. Tafazinas katalizuoja nesočiųjų riebalų rūgščių pernašą nuo gretimų fosfolipidų, pavyzdžiui, fosfatidilcholino, fosfatidiletanolamino ar fosfatidinės rūgšties, monolizokardiolipinui. Tafazinas gali pernešti acilo grupes, turinčias 7–19 anglies atomus ir iki trijų dvigubųjų jungčių. Tafazinas taip pat gali katalizuoti riebalų rūgščių apsikeitimą tarp įvairių fosfolipidų, nebūtinai dalyvaujant kardiolipinui [66]. Kitas kardiolipino remodeliavime dalyvaujantis fermentas yra acil-KoA:lizokardiolipino aciltransferazė 1 (ALCAT1, angl. *Acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase 1*), dar kitaip vadinama lizokardiolipino aciltransferazė 1 (LCLAT1, angl. *Lysocardiolipin acyltransferase 1*), kuri katalizuoja laisvos aktyvios riebalų rūgšties (acil-KoA) prijungimą prie monolizokardiolipino arba dilizokardiolipino. Parodyta, kad šis fermentas yra lokalizuotas endoplazminio tinklo-mitochondrijų membranų kontakto srityse [67,68]. Paskutinis fermentas, dalyvaujantis kardiolipino remodeliavime yra monolizokardiolipino aciltransferazė 1 (MLCLAT1, angl. *Monolysocardiolipin acyltransferase 1*), kuri lokalizuota mitochondrijose ir taip pat naudoja laisvas aktyvintas riebalų rūgštis remodeliuojant monolizokardiolipiną [69]. Tiesa, yra duomenų, kad MLCLAT1 yra mitochondrijų trifunkcinio baltymo, dalyvaujančio ilgos grandinės riebalų rūgščių oksidacijoje, dalis. Mitochondrijų trifunkcinis baltymas yra sudarytas iš dviejų α ir dviejų β subvienetų ir būtent α subvienetas pasižymi monolizokardiolipino aciltransferaziniu aktyvumu. Išgryninta MLCLAT1 struktūra yra identiška mitochondrijų trifunkcinio baltymo α subvieneto struktūrai tik be pirmųjų N-galo 227 aminorūgščių. Atskiras MLCLAT1 fermentas gali būti trifunkcinio baltymo α subvieneto splaisingo rezultatas [70–72]. Parodyta, jog trifunkcinio baltymo α subvieneto geno mutacijos lemia sutrikusį kardiolipino remodeliavimą bei mitochondrijų pažaidas [73,74]. Naujausi tyrimai rodo, jog galimai egzistuoja dar vienas kardiolipino remodeliavimo fermentas - fosfolipazė A ir aciltransferazė 1 (PLAAT1, angl. *Phospholipase A and Acyltransferase 1*). Bradley ir kt. 2022 m. pirmą kartą pademonstravo šio fermento gebą remodeliuoti monolizokardiolipiną panaudojant fosfatidilcholiną kaip riebalų rūgščių donorą [75]. Visgi yra laikoma, jog pagrindiniai kardiolipino remodeliavimo fermentai yra tafazinas, LCLAT1 ir MLCLAT1, kurie užtikrina, jog kardiolipino riebalų rūgščių sudėtis būtų specifiška audiniui/organui, tačiau mokslinėje literatūroje yra prieštaringų duomenų apie kardiolipino remodeliavimo fermentų specifiskumą riebalų rūgštims. Yra duomenų, kad mielių tafazinas turi didžiausią specifiskumą linolo riebalų rūgščiai, mažėjančią specifiskumą atitinkamai oleino, palmitoleino ir palmitino riebalų rūgštims. Tačiau toks specifiskumas riebalų rūgštims buvo parodytas *in vitro* sąlygomis su liposomomis, naudojant monolizokardioli-

piną kaip riebalų rūgščių akceptorių ir fosfatidilcholiną kaip riebalų rūgščių donorą [76]. Kiti mokslininkai parodė, jog tafazino aktyvumas buvo didžiausias *in vitro* modeliuose, kuriuose buvo naudojamos nedvisluoksnės lipidų struktūros (pavyzdžiui, išvirkščios heksagoninės lipidų struktūros). Būtent tokiose struktūrose bei esant Ca^{2+} kardiolipinas buvo remodeliuojamas suformuojant TLCL. Tai parodo, jog tafazino specifiskumas riebalų rūgštims gali priklausyti nuo fizikinių fosfolipidinės membranos savybių [77]. Vėliau parodyta, jog tafazinas katalizuoja nuolatinį kardiolipino remodeliavimą tol, kol aplinkinių fosfolipidų ir kardiolipino riebalų rūgščių pasiskirstymas pasiekia pusiausvyrą [78]. Šie duomenys parodo, jog tafazino aktyvumui ir tikslingam kardiolipino remodeliavimui reikalingas tam tikras membranos išsidėstymas, kuris yra būdingas mitochondrijų membranoms. Tafazino svarba kardiolipino remodeliavimui buvo atskleista išaiškinus Barto sindromo (angl. *Barth syndrome*) patofiziologinius molekulinis mechanizmus. Barto sindromas yra paveldima liga, išsivystanti dėl X chromosomoje įvykusios tafazino geno mutacijos, dėl kurios išsivysto dilatacinė kardiomiopatija, neutropenija, skeleto raumenų miopatijos ir kitos patologijos. Barto sindromo atvejais mitochondrijose ženkliai sumažėja kardiolipino ir didėja monolizokardiolipino kiekis, taip pat sumažėja linolo riebalų rūgšties įjungimas į kardiolipino struktūrą [79–81]. ALCAT1 specifiskumas riebalų rūgštims ir vaidmuo kardiolipino remodeliavime yra kontraversiškas. Mokslinėje literatūroje yra duomenų, kad fermentas ALCAT1 pasižymi dideliu specifiskumu linolo ir oleino riebalų rūgštims [67]. Tačiau yra nemažai duomenų rodančių, jog ALCAT1 yra susijęs su oksidaciniu stresu ir patologiniu kardiolipino remodeliavimu įvairių ligų metu, kuomet į kardiolipiną remodeliavimo metu yra įjungiamos nebūdingos, dažniausiai ilgos grandinės polinesočiosios riebalų rūgštys. Taip pat nustatyta, jog patologijų metu ALCAT1 fermento slopinimas arba jo geno delecija lemia sumažėjusį audiniui nebūdingo kardiolipino suformavimą bei mitochondrijų funkcijų atsistatymą [68,82–85]. Literatūroje yra mažai duomenų apie MLCLAT1 specifiskumą riebalų rūgštims, tačiau yra parodyta, jog žmogaus ir kiaulės mitochondrijų MLCLAT1 pasižymi didžiausiu specifiskumu linolo riebalų rūgščiai bei yra mažiau specifiškas oleino bei palmitino riebalų rūgštims. Taip pat nustatyta, kad šis fermentas dalyvauja tik kardiolipino, bet ne kitų fosfolipidų remodeliavime [69,70]. Remodeliavimą gali lemti ir aplinkinių baltyminių kompleksų aktyvumas ar išsidėstymas. Buvo parodyta, jog kardiolipino remodeliavimą slopino IV mitochondrijų kvėpavimo grandinės komplekso COX6 subvieneto delecija. Baltymo OXA1, atsakingo už oksidacinio fosforilavimo sistemos kompleksų taisyklingą įterpimą į mitochondrijų membranas, geno delecija lėmė kardiolipino riebalų rūgščių sudėties pokytį. Tai gali rodyti, jog specifinis oksidacinio fosforilavimo sistemos kompleksų išsidėstymas membranoje lemia specifinę membranos įtampą, kurią atpalai-

duoja tikslingas kardiopolino remodeliavimas ir tankiai išsidėsčiusių baltymų-lipidų kompleksų susiformavimas [86]. Kardiopolino sintezė ir remodeliavimas yra sudėtingas procesas, kurio tikslas yra suformuoti funkcionalų ir audiniams specifinį kardiopoliną, galintį dalyvauti daugelyje svarbių procesų mitochondrijose ir ląstelėje.

1.3. Kardiopolino funkcijos

Dėl savo unikalios struktūros ir išskirtinių savybių kardiopolinas dalyvauja daugelyje procesų mitochondrijose: nuo mitochondrijų struktūros stabilizavimo, įvairių baltymų struktūros palaikymo ir funkcijos užtikrinimo iki dalyvavimo mitochondrijų autofagijos ir ląstelės apoptozės procesuose [59]. Šiame poskyryje bus apžvelgtos svarbiausios kardiopolino funkcijos.

1.3.1. Kardiopolino vaidmuo mitochondrijų struktūroje

Anksčiau buvo minėta, kad kardiopolino molekulė erdvėje įgauna kūginę formą, todėl dvisluoksnėse membranose sukelia deformacijas. Ši kardiopolino savybė ypač naudinga mitochondrijose, nes padeda formuoti mitochondrijų vidinės membranos išlinkimus – kristas [42]. Mitochondrijų vidinė membrana yra susilanksčiusi ir tai ženkliai padidina jos paviršiaus plotą, kuriame gali išsidėstyti oksidacinės fosforilinimo sistemos ir kiti baltymų kompleksai. Kristų morfologija taip pat gali kisti priklausomai nuo ląstelės energijos poreikio/oksidacinio fosforilinimo intensyvumo [87,88]. Kristų morfologija gali būti įvairi – maišelio, cisternos, vamzdelio pavidalo bei su įvairiais susijungimais tarpusavyje, o tokias struktūras stabilizuoja kardiopolinas, kuris dėstosi specifinėse vietose. Kardiopolino molekulės išsidėsto vidiniame membranos/kristos išlinkime, kitaip tariant, membranos neigiamo išlinkimo vietose, kuriose kardiopolinas atpalaiduoja membranos linkyje susidarančią įtampą. Kardiopolinas, beje, nėra vienas toks fosfolipidas galintis formuoti išlinkimus membranoje, su juo kartu šią funkciją atlieka ir fosfatidiletanolaminas [89]. Nepaisant to, yra parodyta, jog kardiopolinas sukelia didesnę neigiamą membranos išlinkimą, lyginant su fosfatidiletanolaminu [42]. Mokslinėje literatūroje yra įrodymų, kad kardiopolinas yra reikalingas kristų susiformavimui ir, kad kardiopolino trūkumas sukelia kristų kiekio mažėjimą mitochondrijose [90,91], taip pat parodyta, kad kardiopolino trūkumas sumažina ATP (adenozino trifosfato) sintazės F1 subvieneto tankį kristų viršūnėse, dėl sumažėjusio kristų viršūnių išlinkimo [92]. Mitochondrijų kristas taip pat formuoja mitochondrijų kontakto sričių ir kristų organizavimo sistema (MICOS, angl. *mitochondrial contact site and cristae organizing system*). Ši baltyminių kompleksų sudaro devyni subvienetai, iš kurių MIC27 tiesiogiai

sąveikauja su kardiolipinu bei yra būtinas pilno MICOS komplekso susiformavimui [31,93].

Mitochondrijos yra dinamiškos organelės ir geba pasidalinti bei susilieti tam kad palaikytų savo formą, dydį ir pasiskirstymą ląstelėje. Toks mitochondrijų prisitaikymas yra svarbus imuniniuose procesuose, ląstelės gyvavimo cikle ir apoptozėje. Susiliedamos mitochondrijos gali sudaryti tinklus ir yra manoma, kad tai joms leidžia efektyviau paskirstyti matrikso komponentus bei vykdyti efektyvesnę oksidacinę fosforilinimą [94]. Kardiolipinas dalyvauja mitochondrijų susiliejimo ir dalinimosi procesuose sąveikaudamas su specifiniais baltymais. Vienas iš jų yra su dinaminiu susijęs baltymas Opa1 (angl. *Optic atrophy 1*), kuris yra svarbus komponentas vidinės mitochondrijų membranos suliejimo molekuliniame mechanizme. Opa1 yra aktyvinamas tik po dimerizacijos, kuri priklauso nuo sąveikos su kardiolipinu. Tuo tarpu baltymas Drp1 (angl. *Dynamin-related protein 1*) skatina mitochondrijų membranos pasidalinimą, o šio baltymo prijungimui prie membranos paviršiaus ir aktyvavimui taip pat reikalingas kardiolipinas [95–98]. Tačiau sąveikai su Drp1 kardiolipinas turi būti perkeliamas į mitochondrijų išorę, kas gali įvykti apoptozės metu ar kaip signalas mitofagijai. O tokia kardiolipino perkėlimo iš mitochondrijų vidinės į išorinę membraną dalyvauja fosfolipidų skramblazės. Kardiolipinas gali dalyvauti mitochondrijų susiliejime ir netiesiogiai – fosfolipazė D (MitoPLD) membranų susijungimo metu gali hidrolizuoti kardiolipiną ir atskirti fosfatidinę rūgtį, kuri suformuoja mikrodomekus, skatina membranų išlinkimus ir padeda suartinti mitochondrijų išorines membranas. Tuo tarpu, padidėjęs fosfatidinės rūgšties kiekis gali slopinti Drp1 baltymą bei mitochondrijų pasidalinimą [99,100]. Taigi, kardiolipino vaidmuo mitochondrijų membranų susiformavime ir dinamikoje yra įvairiapusis ir išties reikšmingas.

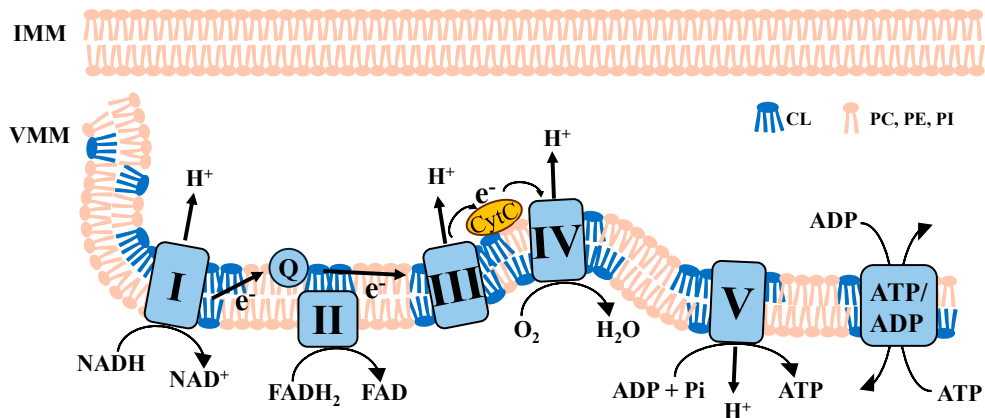
1.3.2. Kardiolipino sąveika su mitochondrijų oksidacinio fosforilinimo sistema

Viena iš svarbiausių mitochondrijų funkcijų yra ATP sintezė oksidacinio fosforilinimo metu. Šį procesą atlieka penki fermentiniai kompleksai išsidėstę vidinėje mitochondrijų membranoje, kurie sudaro oksidacinio fosforilinimo sistemą. Keturi iš jų – NADH dehidrogenazė (redukuoto nikotinamido dinukleotido dehidrogenazė, I kompleksas), sukcinato dehidrogenazė (II kompleksas), kofermento Q-citochromo C reduktazė (III kompleksas) ir citochromo C oksidazė (IV kompleksas) – priklauso elektronų pernašos grandinei. Šios grandinės substratai yra redukuoti kofermentai NADH ir FADH₂ (flavino adenino dinukleotidas, redukuota forma), kurie yra oksiduojami atitinkamai I ir II kompleksuose. Tuomet mobilus nešiklis kofermentas Q perneša elek-

tronus nuo I ir II komplekso į III kompleksą. Galiausiai per dar vieną mobilių nešiklių citochromą C elektronai pernešami IV kompleksui, kuris katalizuoja molekulinio deguonies redukciją iki vandens. Šios elektronų pernašos metu susidaro energija, kuri panaudojama protonų pernešimui ir koncentravimui tarpmembraninėje ertmėje. ATP sintazė, V kompleksas, kuris katalizuoja ATP sintezę iš ADP ir neorganinio fosfato, yra varomas elektrocheminio protonų gradiento, kurį sukuria elektronų pernašos grandinė [101–103].

Mokslinėje literatūroje yra nemažai duomenų apie kardiopolipino sąveiką su šiais oksidacinio fosforilinimo sistemos kompleksais (1.3.2.1 pav.). Tokių duomenų buvo jau ir 1980 m., kai Fry ir Green parodė, jog kardiopolipinas yra reikalingas I, III ir IV kompleksų fermentiniam aktyvumui [104,105]. Vėliau tobulėjant technologijoms buvo nustatyta ir struktūrinė sąveika tarp šių kompleksų ir kardiopolipinų. Mokslininkai parodė, jog didžiausias elektronų pernašos grandinės kompleksas I sudaro stiprias sąveikas su kardiopolipino molekulėmis. Sharpley ir kt. nustatė, kad 10 kardiopolipino molekulių sąveikauja su jaučio širdies mitochondrijų I kompleksu [106]. Panašius rezultatus gavo mokslininkai analizavę I komplekso struktūrą išskirtą iš pelės ir avies širdies mitochondrijų [107,108]. Vėliau, taikant molekulinį modeliavimą ir panaudojant iš bakterijų išskirtą mitochondrijų kvėpavimo grandinės I kompleksą buvo nustatyta, jog dar daugiau kardiopolipino molekulių sąveikauja su įvairiais I komplekso subvienetais. Pavyzdžiui, prie Nqo8 subvieneto, jungiančio I komplekso hidrofilinį ir membraninį domeną, prisijungia iki 15 kardiopolipino molekulių. Kardiopolipinas taip pat sąveikauja ir su protonus pernešančiais subvienetais. Buvo parodyta, jog I komplekso sąveika su kardiopolipino molekulėmis yra ženkliai stipresnė nei su fosfatidiletanolamino ar fosfatidilcholino bei nustatyta, kad kardiopolipinas stabilizuoja kofermento Q tinkamą prisijungimą prie I komplekso [109]. Kiti rezultatai parodė, jog mitochondrijose su pažeistu I kompleksu, kardiopolipinas padeda efektyviau pernešti elektronus kofermentui Q nuo pirmo komplekso [110]. *In vitro* tyrimuose parodyta, jog kardiopolipinas yra reikalingas II komplekso optimaliam aktyvumui, sąveikai tarp katalitinio dimero ir subvienetų, prijungtų prie fosfolipidų membranos [111]. Pritaikę molekulinį modeliavimą kiti mokslininkai nustatė kad šešios kardiopolipino molekulės sąveikauja su III kompleksu jaučio širdies mitochondrijose, taip pat parodė, jog šios sąveikų vietos yra identiškos mielių mitochondrijose [112]. Petrosillo ir kt. parodė, jog išemijos/reperfuzijos metu nuslopintas III komplekso aktyvumas atsistato, kai mitochondrijos inkubuojamos terpėje esant liposomų su kardiopolipinu [113]. Toks pat efektas pasiektas vertinant ir I komplekso aktyvumą po išemijos/reperfuzijos, kai mitochondrijų inkubacijos terpėje buvo liposomų su kardiopolipinu [114]. Molekulinio modeliavimo pagalba parodyta, jog kardiopolipinas gali sąveikauti ir su IV kompleksu ties

protonus pernešančiais subvienetais septyniose vietose, tačiau tik dviejose iš jų sudaroma stipri sąveika, o kitose gali prisijungti ir kiti fosfolipidai [115].



1.3.2.1 pav. Mitochondrijų oksidacinio fosforilavimo sistemos komponentų sąveika su kardioliipinu

IMM – išorinė mitochondrijų membrana; VMM – vidinė mitochondrijų membrana; I–V – oksidacinio fosforilavimo sistemos kompleksai; Q – kofermentas Q; CytC – citochromas C; ATP/ADP – ATP/ADP nešiklis; CL – kardioliipinas; PC – fosfatidilcholinai; PE – fosfatidiletanolaminai; PI – fosfatidilinozitolis.

Yra žinoma, jog mitochondrijų elektronų pernašos grandinės kompleksai vidinėje mitochondrijų membranoje gali išsidėstyti tam tikromis grupėmis, vadinamomis superkompleksais arba respirasomomis. Dažniausiai šiuos superkompleksus sudaro įvairios I, III ir IV kompleksų kombinacijos, o jų susigrupavimas gali vykti dėl pagreitetų energijos apykaitos ir lemia efektyvesnę elektronų pernašą [116,117]. Tyrimai su mielių mitochondrijomis parodė, jog kardioliipinas sąveikauja su III ir IV kompleksų bazinėmis aminorūgštimis elektrostatiniais ir joniniais ryšiais. Kardioliipino sąveika su III/IV superkompleksais juos stabilizuoja, o kardioliipino pakeitimas fosfatidilgliceroliu lemia sumažėjusį superkompleksų kiekį [118–120]. Kiti mokslininkai molekulinio modeliavimo metu su III/IV superkompleksais parodė, jog monolizokardioliipino sąveika su III kompleksu yra panaši, tačiau IV kompleksas sudaro daugiau ryšių su kardioliipinu nei su monolizokardioliipinu [121]. Nors ATP sintazė nedalyvauja superkompleksų susidaryme, šis fermentas mitochondrijose išsidėsto dimerais [116]. ATP sintazės dimerai išsidėsto ilgomis eilėmis kristų viršūnėse, o šiam išsidėstymui būtinas kardioliipinas. Mokslininkai nustatė, jog kardioliipino sintazės delecija vaisinėse muselėse (drozofilose) lemia ATP sintazės persiskirstymą, mitochondrijų struktūrinius pokyčius, bei sumažino muselių išgyvenamumą. Tafazino geno delecija turė-

jo panašų poveikį ATP sintazės išsidėstymui bei mitochondrijų morfologijai [92,122]. Kiti mokslininkai nustatė, jog maždaug 3–4 kardiolipino molekulės sąveikauja su ATP sintazės c žiedu. Taip pat parodyta, jog tokia sąveika yra protarpinė, kadangi ATP sintazės c žiedas nuolatos sukasi, todėl manoma, kad kardiolipinas stabilizuoja žiedą ir palengvina sukimąsi [123]. Buvo manoma, jog kardiolipinas gali prisidėti prie protonų pernešimo į ATP sintazės F₀ subvienetą. Kardiolipino neigiamai įkrautos fosforo rūgšties liekanos gali sąveikauti su protonais tarpmembraninėje ertmėje ir koncentruoti juos ties ATP sintaze ir taip protonus nukreipti į F₀ subvieneto c žiedą [124]. Naujausi tyrimai su kardiolipino liposomomis parodo, jog kardiolipinas koncentruodamas protonus gali tiesiogiai dalyvauti protonų nutekėjime pro mitochondrijų membraną [125]. ATP sintazei reikalingas substratas ADP (adenozino difosfatas) į mitochondrijų matricą patenka per ATP/ADP nešiklį, per kurį susintetintas ATP yra išnešamas iš mitochondrijų. Parodyta, jog kardiolipinas yra reikalingas ATP/ADP nešiklio tretinės ir ketvirtinės struktūros palaikymui, stabiliai konformacijai bei sąveikai su šalia esančiais baltymais (pavyzdžiui, kvėpavimo grandinės superkompleksais) [126,127].

Vienas iš mobilių elektronų pernašos grandinės komponentų yra citochromas C, kurio sąveika su kardiolipinu yra labai įdomi ir dviprasmė. Citochromas C dalyvauja pernešant elektronus nuo III komplekso IV kompleksui [102,103]. Kadangi citochromas C turi teigiamą krūvį fiziologinėmis sąlygomis, jis gali sąveikauti su neigiamai įkrautais lipidais, tokiais, kaip kardiolipinas. Citochromo C teigiamai įkrautos aminorūgščių liekanos sąveikauja su kardiolipino neigiamai įkrautomis fosforo rūgšties liekanomis [128]. Tačiau yra įrodymų, kad kardiolipino elektrostatinė ir hidrofobinė sąveika su citochromu C sužadina citochromo C peroksidazinį aktyvumą ir lemia kardiolipino oksidaciją. Toks peroksidazinis citochromo C aktyvumas yra sužadinamas, kai viena iš kardiolipino riebalų rūgščių grandinių patenka į citochromo C molekulės vidinę hidrofobinę sritį, kurioje lokalizuojasi hemo grupė. Manoma, jog tai nutinka dėl citochromo C konformacinių pokyčių, kurie gali įvykti esant aplinkos pH ar mitochondrijų membranos struktūriniais pokyčiais. Dėl kardiolipino oksidacijos, citochromas C yra išlaisvinamas, o patekęs į citoplazmą inicijuoja ląstelių apoptozės molekulinis mechanizmas [129–132]. Matoma, kad kardiolipinas yra reikalingas individualių oksidacinės fosforilinimo sistemos komponentų stabilumui bei optimaliam veikimui palaikyti, tačiau kardiolipinas turi tam tikrą vaidmenį ir ląstelių žūties procesuose.

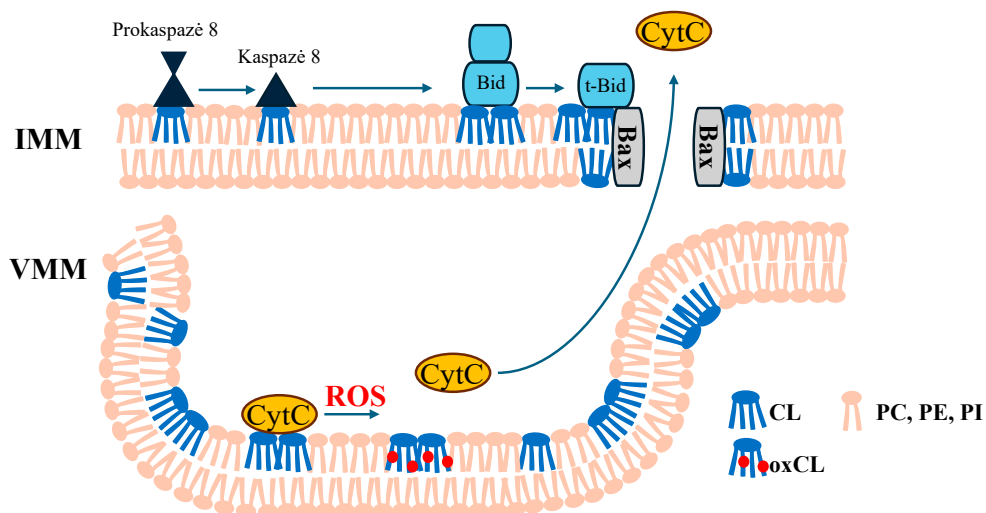
1.3.3. Kardiolipino vaidmuo apoptozės ir mitofagijos metu

Dėl savo unikalių savybių kardiolipinas gali sąveikauti su daugybe baltymų, juos stabilizuoti bei užtikrinti jų optimalią funkciją. Tokia kardiolipi-

no sąveika vyksta ir su tam tikrais baltymais, kurie dalyvauja ląstelių žūties (apoptozės) bei mitofagijos procesuose.

Apoptozė yra programuota ląstelių žūties forma, kuri gali vykti keliais būdais. Pavyzdžiui, apoptozei vykstant išoriniu keliu, FasL ligandas prisijungia prie savo receptoriaus FasR ir pritraukia adaptorinę molekulę FADD (angl. *Fas-associated death domain*), kuri inicijuoja prokaspazės-8 suaktyvinimą [133,134]. Kaspazė-8 aktyvina efektorines kaspazes (3, 6 ir 7), kurios skaido įvairias ląstelės molekules, įskaitant branduolio struktūrinius baltymus, nukleorūgščių taisymo fermentus, endonukleazų slopiklius. Galiausiai ląstelė skyla į smulkias, membrana aptrauktas dalis, vadinamas apoptotiniais kūneliais, kurie yra fagocituojami [135,136]. Apoptozei vykstant vidiniu keliu, padidėjus mitochondrijų membranų pralaidumui, iš mitochondrijų išlaisvinami proapoptotiniai veiksniai, o vienas iš svarbiausių – citochromas C [134]. Atsidūręs citoplazmoje citochromas C jungiasi su adaptorine molekule APAF-1 (angl. *Apoptotic protease activating factor-1*), suformuojama apoptosoma, pritraukiama ir aktyvinama prokaspazė-9, kuri toliau aktyvina efektorines kaspazes [137]. Mitochondrijų membranų pralaidumą gali didinti Bak ir Bax veiksniai, kurie yra aktyvuojami ir oligomerizuodamiesi mitochondrijų išorinėje membranoje suformuoja poras, per kurias citochromas C ir kiti proapoptotiniai veiksniai gali patekti į citoplazmą [138]. Abu apoptotiniai keliai gali susikirsti ties kaspaze-8, kuri apoptozės metu skaido citozolinį baltymą Bid, verčia jį į aktyvią tBid formą, kuris jungiasi prie mitochondrijų išorinės membranos ir aktyvuoja Bak/Bax oligomerizaciją [139,140]. Kardiolipinas turi keletą vaidmenų apoptozės procesuose. Vienas iš jų jau buvo paminėtas anksčiau – kardiolipino sąveika su citochromu C gali sužadinti citochromo C peroksidazinį aktyvumą, kuris lemia kardiolipino oksidaciją ir citochromo C išlaisvinimą iš mitochondrijų, taip inicijuojant apoptozę [131]. Kardiolipinas taip pat dalyvauja sąveikoje su kai kuriais proapoptotiniais veiksniais. Prokaspazė-8 yra citozolyje, bet jos aktyvi forma gali jungtis prie išorinės mitochondrijų membranos, tam kad įvyktų efektyvus procesingas ir aktyvinimas (1.3.3.1 pav.). Toks kaspazės prisijungimas prie išorinės mitochondrijų membranos priklauso nuo kardiolipino, kuris yra pernešamas į išorinę membraną veikiant fosfolipidų skramblazei 3 [141,142]. Citozolyje kaspazei-8 suskaidžius ir suaktyvinus tBid, jo prisijungimas prie mitochondrijų išorinės membranos taip pat priklauso nuo kardiolipino. Buvo parodyta, kad tBid aminorūgščių sritys H4, H5 ir H6 selektyviai jungiasi su mitochondrijų membranos sritimi, kurioje gausu kardiolipino. Mokslininkai mano, jog tokia sąveika gali vykti ir dėl kardiolipino gebos suformuoti unikalią mitochondrijų membranos struktūrą [143]. Nustatyta, kad Bax dimerų sąveika tarpusavyje bei jų oligomerizacija mitochondrijų membranoje priklauso nuo kardiolipino. Parodyta, kad kiti fosfolipidai (fosfatidilglicerolis, fosfatidiletanolaminas) ne-

turėjo tokio poveikio susidaryti pakankamai didelėms Bax poroms, kokį turėjo kardiopolinas [144]. Taip pat *in vitro* tyrimai su liposomomis parodė, jog Bax gebėjimas permeabilizuoti membraną priklauso nuo fosfolipidų riebalų rūgščių nesotumo – liposomose, kuriose buvo jaučio širdies kardiopolinų (su nesočiosiomis riebalų rūgščių grandinėmis), Bax parodė didesnę aktyvumą permeabilizuojant membranas [145].



1.3.3.1 pav. Kardiopolino vaidmuo apoptozės molekulinuose mechanizmuose

IMM – išorinė mitochondrijų membrana; VMM – vidinė mitochondrijų membrana; CytC – citochromas C; ROS – aktyvūs deguonies junginiai; CL – kardiopolinas; oxCL – oksiduotas kardiopolinas; PC – fosfatidilcholino; PE – fosfatidiletanolaminas; PI – fosfatidilinozitolis.

Esant mitochondrijų pažeidimams, ląstelėje suaktyvinami mitochondrijų autofagijos (mitofagijos) mechanizmai, kuomet pažeistos mitochondrijos yra fagocituojamos. Tačiau ir fiziologinėmis sąlygomis, pavyzdžiui, bręstant eritrocitams, mitochondrijos gali būti pašalinamos mitofagijos būdu [146]. Mitofagijos metu mitochondrijos yra apgaubiamos membranine struktūra (fagoforu), kuri suformuoja autofagosomą ir susilieja su lizosomomis, kuriose esantys fermentai katalizuoja mitochondrijų suardymą. Formuojantis autofagosomai, dalyvauja keletas veiksnių, iš kurių Beclin-1 ir LC3 (angl. *microtubule associated protein 1 light chain 3*) sąveikauja su kardiopolinu [31,147]. Beclin-1 yra vienas iš baltymų, dalyvaujančių sudėtingų molekulinų kompleksų formavime, kurie reguliuoja autofagiją. Buvo parodyta, jog Beclin-1 labiausiai sąveikauja su liposomomis, kuriose yra gausu kardiopolino [148]. Kiti mokslininkai nustatė, jog kardiopolinas taip pat sąveikauja su kitu veiksnio AMBRA1, kuris autofagijos metu susijungia su Beclin-1

kompleksu [149]. LC3 lokalizuojasi autofagosomos membranoje ir gali sąveikauti su fosfolipidais. LC3 gali sąveikauti su kardiolipinu, kuris autofagijos metu yra pernešamas į išorinę mitochondrijų membraną. Nustatyta, kad net keletas LC3 homologų gali sąveikauti su liposomomis, kuriose yra kardiolipino. LC3A ir LC3B sąveikauja su kardiolipinu labiau nei su kitais neigiamą krūvį turinčiais fosfolipidais [99,150,151]. Kiti tyrimai rodo, jog smegenų pažeidimo metu, vykstant mitofagijai, kardiolipino pernešimas į išorinę mitochondrijų membraną yra būtinas, o esant kardiolipino trūkumui, autofagosomų formavimasis yra nuslopinamas [152].

Kardiolipino pernešimas į išorinę mitochondrijų membraną gali veikti kaip mitofagijos signalas, bet taip pat ir dalyvauti apoptozės procese. Toks kardiolipino vaidmuo pasireiškia per sąveiką su įvairiais apoptozėje ir mitofagijoje dalyvaujančiais baltymais. Yra dar daugybė kitų baltymų su kuriais kardiolipinas gali sąveikauti ir juos stabilizuoti.

1.3.4. Kardiolipino sąveika su kitais baltymais

Anksčiau aprašytuose pavyzdžiuose matoma, jog kardiolipino vaidmuo yra platus ir apima daugelį ląstelės funkcijų. Kardiolipinas taip pat yra reikalingas kai kurių kitų mitochondrijų fermentų struktūrai palaikyti. Dar 1989 m. buvo nustatyta, kad kardiolipinas yra reikalingas optimaliam mitochondrijų L-glicerolio-3-fosfato dehidrogenazės (su FAD susijusios) aktyvumui [153]. Kiek vėliau, 1985 m. parodyta, kad mitochondrijų fermentas kreatino fosfokinazė jungiasi su kardiolipinu mitochondrijų ir liposomų membranose, bet neprisijungia prie liposomų su fosfatidilcholinu [154,155]. Buvo parodyta, kad mitochondrijų karbamido ciklo fermentas karbamoilfosfato sintetazė I taip pat gali sąveikauti su kardiolipinu. Nustatyta, kad sąveika su kardiolipinu *in vitro* turėjo įtakos šio fermento aktyvumui – didelės kardiolipino koncentracijos be kitų priedų terpėje slopino karbamoilfosfato sintetazės I aktyvumą, tačiau terpėje esant N-acetilglutamato, Mg^{2+} ir ATP, fermento aktyvumas pilnai atsistatė [156]. Taip pat buvo nustatyta, jog kardiolipinas reikalingas mitochondrijų karnitino-acilkarnitino translokazės, piruvato nešiklio bei citochromo P-450_{sc} (dalyvaujančio cholesterolio metabolizme) optimaliam aktyvumui [157–160]. Ryan ir kt. parodė, jog α -sinukleinas, baltymas, kuris dalyvauja Parkinsono ligos patogenezėje, sąveikauja su kardiolipinu praturtintomis liposomomis, o ši sąveika taip pat prisideda prie taisyklingo α -sinukleino monomerų susilankstymo. Mokslininkai taip pat parodė, jog α -sinukleino kaupimasis mitochondrijose koreliavo su kardiolipino pernaša į išorinę membraną [161]. Malhotra ir kt. parodė, jog kardiolipinas sąveikauja su TIM50, mitochondrijų vidinės membranos pernašos sistemos komplekso TIM23 receptoriumi, bei palaiko jų tarpusavio sąveiką [162]. Ghosh

ir kt. nustatė, jog kardiolipinas yra reikalingas mitochondrijų Ca^{2+} nešiklio stabilizavimui membranoje ir jo aktyvumui palaikyti [163]. Kardiolipinas yra būtinas netgi pačių baltymų sintezės procesui mitochondrijose. Nustatyta, jog trūkstant kardiolipino sutrinka mitochondrinės DNR koduojamų baltymų transliacija ir parodyta, kad kardiolipinas yra reikalingas ribosomų formavimuisi ir prisijungimui prie mitochondrijų membranos, kad būtų vykdoma baltymų sintezė [164]. Nors kai kurie tyrimai atlikti su kardiolipino turinčiomis liposomomis *in vitro*, rezultatai rodo potencialias kardiolipino sąveikas bei funkcinius vaidmenis ir *in vivo*.

Yra kitų baltymų, kurie sąveikauja su kardiolipinu [40,165] ir tai parodo kardiolipino svarbą mitochondrijoms ir ląstelėi. Anksčiau aprašytos kardiolipino funkcijos rodo, jog kardiolipinas yra nepakeičiama daugelio mitochondrijose ir ląstelėje vykstančių procesų dalis. Kardiolipino pažaida – struktūriniai ir/ar kiekybiniai pokyčiai – gali lemti mitochondrijų ir ląstelės funkcijų pažeidimus, kurie gali nuvesti link ląstelės žūties, audinių ir organų disfunkcijos.

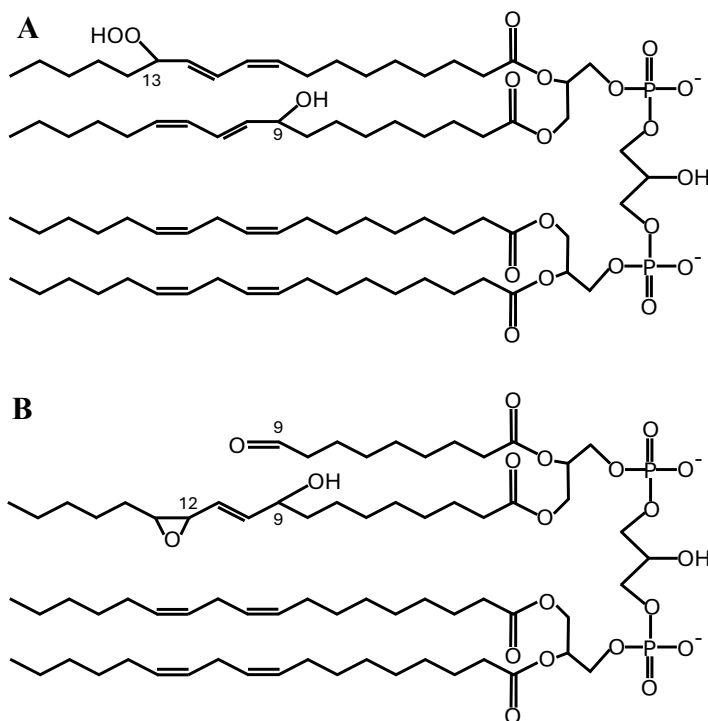
1.4. Kardiolipino pažaidos molekuliniai mechanizmai

Kardiolipinas turi svarbų vaidmenį mitochondrijų ir ląstelės homeostazėje, todėl kardiolipino kiekio trūkumas gali lemti mitochondrijų struktūros pažeidimą bei funkcijų sutrikimus. Kardiolipino sintezės metu vyksta intensyvus jo remodeliavimas, siekiant suformuoti specifinės struktūros kardiolipiną, todėl sutrikęs remodeliavimas ar netinkamai suformuotas kardiolipinas, jo oksidacija ar hidrolizė taip pat gali pažeisti mitochondrijas [166]. Kardiolipino pažaidos stebimos įvairių patologijų metu, pavyzdžiui sergant diabetu [167–170], esant nutukimui [68,171–174], kardiomiopatijoms [79,175–178], neurodegeneracinių ligų atvejais [179,180], išemijos reperfuzijos metu [21,181,182], vėžio ir kitų patologijų metu [53,183–186]. Kadangi kardiolipinas turi keturias polinesočiąsias riebalų rūgštis ir lokalizuojasi vidinėje mitochondrijų membranoje ties elektronų pernašos grandine, kuri yra vienas iš ROS šaltinių, kardiolipinas yra tiesioginis taikinyss oksidacijai. Kardiolipino oksidacijos metu gali būti generuojami įvairūs produktai dalyvaujantys tolimesniuose mitochondrijų ir ląstelės pažaidos molekuliniuose mechanizmuose [187].

1.4.1. Kardiolipino oksidacijos mechanizmai

Oksidacinio streso metu ląstelėje yra sutrikdyta pusiausvyra tarp ROS susidarymo greičio ir ląstelės galimybių šiuos junginius neutralizuoti. Normaliomis sąlygomis nedideli kiekiai ROS dalyvauja ląstelės signaliniuose keliuose, tačiau esant aplinkos streso veiksniams (ksenobiotikams, jonizuo-

jančiai radiacijai) ar patologinėms sąlygoms (uždegimas, infekcija, išemija/reperfuzija), ROS susidarymas suintensyvėja [188]. Tarp šių aktyvių deguonies formų svarbiausios yra deguonies laisvieji radikalai – superoksido anijono radikalas $O_2^{\cdot-}$ (superoksidas) ir hidroksilo radikalas $\cdot OH$, taip pat ir neradikalinės formos – vandenilio peroksidas H_2O_2 bei singletinis deguonis 1O_2 [189]. Mitochondrijose elektronų pernašos grandinė yra vienas svarbiausių ROS susidarymo šaltinių. Fiziologinėmis sąlygomis mitochondrijose tik iki 2 proc. deguonies gali būti iš dalies redukuojama vienu ar dviem elektronais, susidarant superoksidui. Tai įvyksta dėl elektronų nutekėjimo, kuris vyksta daugiausiai ties I ir III kompleksu [190]. Veikiant mitochondrijų superoksido dismutazei (MnSOD), superoksidas yra verčiamas į H_2O_2 , kuris netrukus neutralizuojamas į H_2O , veikiant glutathiono peroksidazei. Esant suintensyvėjusiam superoksido ir H_2O_2 susidarymui, jie gali tarpusavyje reaguoti ir sudaryti O_2 , OH^- ir $\cdot OH$ (Fe^{3+} katalizuojama Haber-Weiss reakcijos metu) arba H_2O_2 gali reaguoti su Fe^{2+} (Fentono reakcija) ir sudaryti OH^- ir $\cdot OH$ [191]. Hidroksilo radikalas $\cdot OH$ yra ypač aktyvus ir gali reaguoti su daugeliu molekulių, tame tarpe ir su kardiolipinu. Kardiolipino oksidacija vyksta grandininės reakcijos būdu ir tai gali vykti prijungiant deguonį, perkeliant vandenilio atomą, suformuojant hidroperoksidą, kuris gali būti modifikuojamas į ciklinę struktūrą (epoksidą), taip pat gali vykti vidumolekulinis radikalų pasikeitimas tarp kardiolipino riebalų rūgščių. Susiformuoja kardiolipino hidroperoksida, hidroksida, epoksida, ketonai, aldehydai ir kitos formos (1.4.1.1 pav.) [13]. Oksiduotas kardiolipinas gali tapti nestabilus, todėl nuo kardiolipino riebalų rūgščių gali atsikilti įvairūs tarpiniai produktai. Zhong ir kt. parodė, jog pelių kepenyse, esant aterosklerozei, aptinkami TLCL oksidacijos produktai epoksialkoholio-aldehido-TLCL (kardiolipinas, kurio riebalų rūgštyse yra hidroksi-, epoksi- bei aldehido grupės), taip pat hidroksi-TLCL, jo dehidratuota forma keto-TLCL bei skilimo produktas 4-hidroksi-2-nonenalis (4-HNE). Epoksialkoholio-aldehido-TLCL gali reaguoti su šalia esančiais baltymais, tuo tarpu kiti susidarantys aktyvūs aldehydai, tokie kaip 4-HNE ar 4-okso-2-nonenalis yra elektrofili, gebantys pereiti membranas, todėl jie gali reaguoti su baltymais, esančiais toli nuo jų susidarymo vietos, ir juos modifikuoti [192]. Yra žinoma, kad lipidų peroksidacijos metu susidaro įvairių tarpinių produktų, iš kurių pagrindiniai yra omega-6 ir omega-3 riebalų rūgščių skilimo produktai malondialdehidas ir 4-HNE. Abu šie produktai yra laikomi lipidų peroksidacijos žymenimis. Malondialdehidas yra labiau chemiškai stabilus ir mažiau toksiškas, lyginant su 4-HNE. Nors abu gali reaguoti su įvairiais baltymais bei DNR ir juos modifikuoti, 4-HNE yra laikomas labiausiai citotoksišku [193,194].



1.4.1.1 pav. Tetralinoleil-kardiolipino oksidacijos produktų pavyzdinės schemos

A – tetralinoleil-kardiolipinas su hidroperoksilo ir hidroksilo grupėmis ties 13 ir 9 anglies atomais pirmoje ir antroje linolo riebalų rūgštyse, atitinkamai; B – tetralinoleil-kardiolipinas su aldehido grupe ties 9 anglies atomu sutrumpėjusioje linolo riebalų rūgštyje bei hidroksilo ir epoksidine grupėmis atitinkamai ties 9 ir 12 anglies atomais antroje linolo riebalų rūgštyje.

Nemažai mokslininkų, analizuojančių kardiolipino oksidacijos mechanizmus, pasitelkia modelius, artimus fiziologinėms sąlygoms. Pavyzdžiui, Miyamoto ir kt. analizavo kardiolipino sąveiką su citochromu C ir jos poveikį kardiolipino oksidacijai. Mokslininkai nustatė, jog šios sąveikos metu liposomose susidaro singletinis deguonis. Buvo taip pat parodyta, jog singletinis deguonis susidarė tik tuomet, kai kardiolipino sudėtyje vyraavo polinesočiosios riebalų rūgštys. Sąveikos metu kardiolipinas buvo oksiduojamas ir kardiolipino hidroperoksido kiekis ženkliai didėjo [129]. Helmer ir kt. sukėlė jaučio širdies kardiolipino oksidaciją Fentono reakcijos būdu. Šios reakcijos metu susidarantys $\cdot\text{OH}$ radikalai oksidavo TLCL ir buvo nustatyti TLCL hidroksidai ir hidroperoksidai. Mokslininkai pastebėjo, kad TLCL oksidacijos produktai buvo papildomai prisijungę netgi iki aštuonių deguonies atomų, kurie galėjo suformuoti keturias hidroperoksilo grupes ant kardiolipino riebalų rūgščių grandinių [195]. Panašų metodą panaudoję Maciel ir kt. nustatė

TLCL oksidacijos produktų su sutrumpėjusiomis riebalų rūgštimis, tai buvo linolo rūgštys, nuo kurių atskilo penkių ar devynių anglies atomų fragmentai. TLCL buvo papildomai prisijungęs iki keturių deguonies atomų, o sutrumpėjusių riebalų rūgščių galuose buvo nustatytos aldehido arba karboksilo grupės. Panašūs sutrumpėję TLCL oksidacijos produktai buvo nustatyti žiurkių inkstų mitochondrijose esant nefrotoksiam inkstų pažeidimui po antibiotiko gentamicino suleidimo [196]. Kardiopolipino oksidacijos metu vyksta jo struktūros pokyčiai, kurie lemia kardiopolipino funkcijos sutrikimus. Parodyta, kad kardiopolipino oksidacija lemia konformacinius riebalų rūgščių pokyčius. Net vienos riebalų rūgšties oksidacija pakeitė visos kardiopolipino struktūros konformaciją, kardiopolipinas prarado struktūrinę simetriją, erdvėje kardiopolipinas užėmė didesnę plotą, o fosfolipidų membrana su tokiomis kardiopolipino molekulėmis suplonėjo [12]. Manoma, kad oksiduotas kardiopolipinas gali padėti formuoti poras mitochondrijų membranoje, taip pat būti perkeliamas į išorinę mitochondrijų membraną ir dalyvauti mitofagijoje [9]. Nors oksiduotas kardiopolipinas iš esmės praranda savo funkciją, yra keliamos hipotezės, kad vidutinė kardiopolipino oksidacija gali sukelti jo oksidacinę polimerizaciją, kuri leidžia tokiam kardiopolipinui išlaikyti savo funkciją mitochondrijose [197]. Nepaisant to, visi šie tyrimai parodo, jog kardiopolipino oksidacijos produktų įvairovė gali būti didelė. Žinant, kad kardiopolipino riebalų rūgščių sudėtis yra skirtinga įvairiuose organuose, daugelio patologijų metu kardiopolipino oksidacija gali generuoti įvairiausių oksidacijos produktų, kurie sukelia tolimesnes pažeidas mitochondrijose ir ląstelėje.

1.4.2. Kardiopolipino hidrolizės mechanizmai

Oksidacinio streso ir kitų patologijų metu kardiopolipinas gali būti ne tik oksiduojamas bet ir hidrolizuojamas, generuojant laisvas ir oksiduotas riebalų rūgštis. Vienas iš fermentų dalyvaujančių kardiopolipino hidrolizėje yra nuo kalcio nepriklausoma mitochondrijų fosfolipazė $A_2\gamma$ (iPLA $_2\gamma$). Buvo parodyta, jog iPLA $_2\gamma$ gali hidrolizuoti kardiopolipiną liposomose. Taip pat parodyta, jog iPLA $_2\gamma$ aktyvumas buvo tiesiogiai proporcingas kardiopolipino kiekiui liposomose. *In vivo* tyrimuose su pelėmis buvo nustatyta, jog iPLA $_2\gamma$ yra atsakinga už kardiopolipino oksiduotų riebalų rūgščių hidrolizę miokardo mitochondrijose, o iPLA $_2\gamma$ trūkumas lėmė padidėjusį oksiduoto kardiopolipino kiekį [198]. Ji ir kt. nustatė, jog smegenų išemijos/reperfuzijos metu oksiduojamas smegenų kardiopolipinas, nuo kurio atskeliamos oksiduotos riebalų rūgštys, dėl to daugėjo lizokardiopolipino formų. Kardiopolipino oksidacija buvo nuslopinta esant antioksidantui XJB-5-131, taip pat lizokardiopolipino ir laisvų oksiduotų riebalų rūgščių kiekis sumažėjo. Tai parodė, jog kardiopolipino hidrolizė buvo aktyvesnė, kai kardiopolipinas buvo oksiduotas [21]. Buland ir kt. nustatė, jog

oksiduotas kardiolipinas gali būti hidrolizuojamas ir veikiant su lipoproteinais susijusiai fosfolipazei A_2 . Mokslininkai taip pat parodė, jog egzogeninis oksiduotas kardiolipinas lėmė jaučio plaučių arterijos endoteliocitų nekrozę, kuri suintensyvėjo į terpę pridėjus su lipoproteinais susijusios fosfolipazės A_2 . *In vivo* tyrimuose pelių, infekuotų su *P. aeruginosa*, plazmoje buvo identifikuotas oksiduotas kardiolipinas ir monolizokardiolipinas, kas parodo, jog oksiduotas kardiolipinas gali būti išlaisvinamas iš mitochondrijų ir ląstelių, kaip vienas iš su mitochondrijų pažeidimu susijusių molekulinį veiksnį (DAMP angl. *mitochondrial damage-associated molecular patterns*) bei hidrolizuojamas su lipoproteinais susijusios fosfolipazės A_2 [199]. Visi šie tyrimai rodo, jog kardiolipino oksidacijos metu gali vykti ir jo hidrolizė, kurios metu susidaro lizokardiolipino ir laisvų oksiduotų riebalų rūgščių. Šie molekuliniai mechanizmai lemia tolimesnius mitochondrijų ir ląstelės pažeidimus.

1.4.3. Išemija ir reperfuzija bei kardiolipino pažeida

Oksidacinis stresas, kuris lemia kardiolipino pažeidą oksidacijos ir hidrolizės būdais, yra pagrindinis išemijos/reperfuzijos patofiziologinis veiksnys [14]. Išemija/reperfuzija vyksta tuomet, kai arterinė kraujotaka sustoja (ar dirbtinai sustabdoma) dėl arterijų okliuzijos ar užspaudimo, o po to atstatoma. Vienas iš tokių pavyzdžių yra miokardo infarkto metu vykstanti išemija/reperfuzija – vainikinėse arterijose susidariusi okliuzija sutrikdo arterinę kraujotaką į tam tikrą miokardo sritį, todėl sustabdomas deguonies bei maisto medžiagų tiekimas išeminėje srityje; kraujotakos atstatymas į išeminę sritį lemia audinio reperfuziją, kuri kaip tik gali padidinti miokardo pažeidimą [200]. Išemijos metu, dėl sutrikusio deguonies tiekimo, ląstelėse susidaro hipoksinės sąlygos, kurios lemia mitochondrijų elektronų pernašos grandinės funkcijos sutrikimus ir sulėtėjusią ATP sintezę. Dėl sutrikusio oksidacinio fosforilavimo, įsivyroja anaerobinis metabolizmas, daugėja laktato, kuris lemia terpės rūgštėjimą ir metabolinę acidozę. Dėl ATP trūkumo sutrinka nuo ATP priklausoma Na^+/K^+ bei Ca^{2+} kanalų veikla, todėl ląstelėse daugėja Na^+ ir Ca^{2+} jonų, kurie lemia ląstelių brinkimą ir fermentų funkcijų sutrikimą [201,202]. Išemijos metu, dėl deguonies trūkumo yra slopinamos prolil-hidroksilazės, todėl aktyvuojamas hipoksijos indukuojamas veiksnys HIF-1 α (angl. *hypoxia-inducible factor 1 α*), lemiantis daugelio genų raiškos moduliavimą bei ląstelės prisitaikymą prie hipoksinių sąlygų. Reperfuzijos metu vienas ryškiausių procesų yra oksidacinis pliūpsnis – esant mitochondrijų pažeidai, reoksigenacijos metu didėjanti deguonies koncentracija lemia intensyvių ROS susidarymą. Ląstelėje ROS susidaro įvairiose vietose – mitochondrijų elektronų pernašos grandinėje, taip pat veikiant ksantino oksidazei, nikotinamido adenino dinukleotido fosfato oksidazei, ciklooksigenazei ir kitiems fermentams

[203]. Taip pat aktyvuojamos matrikso metaloproteinazės ir kitos proteazės, kurios katalizuoja įvairių baltymų ir receptorių hidrolizę [190]. Reperfuzijos pažaidos mastas priklauso nuo išemijos trukmės, o ląstelių jautrumas išemijai ir hipoksijai priklauso nuo ląstelės tipo. Trumpa išemija, ar vidutinis išemijos/reperfuzijos pažeidimas gali sukelti ląstelių funkcijų sutrikimus bei inicijuoti apsauginius atsistatymo mechanizmus, tačiau ilga išemijos trukmė ir negrįžtamos ląstelių pažaidos veda į ląstelių žūtį [15,201]. Taip pat išemijos metu aktyvuojami ir uždegiminiai mechanizmai, kurių metu sužadinamas imuninis atsakas, išskiriami pro-uždegiminiai veiksniai, aktyvuojamas žuvusių ląstelių pašalinimas. Tačiau nekontroliuojamas uždegiminis/imuninis atsakas gali sukelti dar didesnes audinių pažaidas išemijos/reperfuzijos metu [204].

Mitochondrijų vaidmuo išemijos/reperfuzijos metu yra ryškus ypač dėl jų dalyvavimo ROS susidaryme. Net ir išemijos metu, trūkstant deguonies, mitochondrijose gali susidaryti ROS, kuomet sulėtėjusi elektronų pernaša lemia padidėjusį NADH/NAD^+ santykį, elektronų užsilaikymą I komplekse bei superoksido susidarymą. Išemijos metu iš mitochondrijų gali išsilaisvinti citochromas C, todėl likęs citochromas C tampa labiau redukuotas. Dėl šių priežasčių citochromas C nebegali neutralizuoti susidariusio superoksido, kuris veikiant superoksido dismutazei verčiamas į H_2O_2 [202]. Reperfuzijos metu, jau esant elektronų pernašos grandinės kompleksų pažeidimui, sąlyginai didelis kiekis deguonies dar labiau padidina elektronų nutekėjimą ir ROS susidarymą. Toliau vyksta grandininė reakcija – ROS toliau skatina ROS susidarymą, mitochondrijų membranų pralaidumo didėjimą ir tolimesnes pažaidas. ROS aktyviai oksiduoja ir modifikuoja mitochondrijų membranų lipidus, DNR ir baltymus [190]. Kardiopolipinas yra vienas artimiausių taikinių ROS oksidacijai. Kardiopolipino oksidacija, jo kiekybiniai ir kokybiniai pokyčiai išemijos metu buvo nustatyti įvairių mokslininkų. Smegenų išemijos/reperfuzijos metu nustatyta, jog kardiopolipino kiekis mitochondrijose mažėja, taip pat intensyvėja jų oksidacija ir hidrolizė – nustatytas padidėjęs lizokardiopolipino kiekis [21,181]. Širdies išemijos ir reperfuzijos metu matomi tie patys pokyčiai – kardiopolipino kiekis mažėja, taip pat nuslopinamas mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų aktyvumas [90,113,114,205]. Lesnefsky ir kt. nustatė, kad jau išemijos metu kardiopolipinai gali būti oksiduojami žiurkės širdies mitochondrijose. Jų rezultatai parodė, kad TLCL kiekio mažėja ir daugėja TLCL oksidacijos produktų [206]. Kardiopolipino kiekio sumažėjimas išemijos/reperfuzijos metu buvo nustatytas ir kepenyse [207]. Heerdt ir kt. vertino žmogaus širdies kardiopolipinų pokyčius esant širdies nepakankamumui dėl išeminės kardiomiopatijos ir nustatė, jog širdyse su išemine kardiomiopatija kardiopolipino kiekis sumažėja, tačiau santykis tarp TLCL ir kitų kardiopolipinų padidėja [208]. Toks rezultatas gali rodyti, jog išemijos metu įsijungia ir kompensaciniai mechanizmai kardiopolipino kiekiui palaikyti, tačiau tyrimų

apie kardiolipino resintezę ar remodeliavimą išemijos/reperfuzijos metu beveik nėra.

Išemijos/reperfuzijos poveikis kardiolipino kokybiniams ir kiekybiniams pokyčiams yra toliau analizuojamas, tačiau trūksta informacijos apie kardiolipino pažeidimą inkstų išemijos/reperfuzijos metu, o ypač apie poveikį kardiolipino resinzei. Inkstai yra metaboliškai aktyvūs organai, sunaudojantys daug deguonies, kuriuose yra gausu mitochondrijų. Dėl šių priežasčių deguonies koncentracijos pokyčiai inkstuose gali turėti rimtų pasekmių [209]. Inkstų išemija/reperfuzija sukelia rimtus inkstų pažeidimus – inkstų kanalėlių ir glomerulų, kraujagyslių pažeidimą – kurie gali lemti ūminį inkstų nepakankamumą, sukelti lėtinės inkstų ligas ir net tapti mirties priežastimi. Išemija/reperfuzija inkstuose gali įvykti įvairių patologijų atvejais, tokiais kaip infarktas, sepsis, tačiau inkstų operacijų metu, tokių kaip transplantacija, taip pat sukelia išemija/reperfuzija [210–212]. Yra nustatyta, kad po 45 minučių *in vivo* išemijos žiurkės inkstuose kraujagyslių endotelio mitochondrijos pabrinko, o jų kristų kiekis sumažėjo. Taip pat buvo stebima eritrocitų ekstravazacija ir intersticinė edema. Inkstų kanalėlių ląstelės po 45 minučių išemijos buvo pabrinkusios ir neatsistatė po valandos reperfuzijos. Netgi po keturių savaičių reperfuzijos inkstų peritubulinių kapiliarų pažeidimas išliko ir neatsistatė. Nors inkstų funkcija atsistatė po savaitės reperfuzijos, inkstų kanalėliai vis dar išliko išsiplėtę, buvo stebima ląstelių atrofija ir bazinės membranos sustorėjimas glomeruluose ir kanalėliuose [91]. Panašiam eksperimente su pelėmis mokslininkai nustatė, kad *in vivo* išemija/reperfuzija taip pat lėmė nefrono kanalėlių pažeidimą, intersticijaus fibrozę ir padidino proapoptotinių ir prouždegiminių veiksnių kiekį [213]. Ryškūs inkstų mitochondrijų pokyčiai jau gali būti matomi po 20 minučių *ex vivo* išemijos. Buvo nustatyta, kad mitochondrijų kristos po 20 minučių išemijos išbrinko, o po 40 minučių išemijos mitochondrijų vidinė membrana atsiskyrė nuo išorinės. Taip pat buvo nustatytas reikšmingas oksidacinės fosforilavimo sistemos aktyvumo sumažėjimas, kuris mažėjo toliau ilginant išemiją iki 60 minučių [214]. Buvo parodyta, kad po 20 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos *in vivo* inkstų mitochondrijų kvėpavimo grandinės I komplekso aktyvumas reikšmingai sumažėja, tačiau mitochondrijų kvėpavimas esant I komplekso substratams (glutamatui ir malatui) nepakinta, o mitochondrijų kvėpavimas fosforilavimo būsenoje esant II komplekso substratui sukcinatui reikšmingai sumažėja [215]. Šie duomenys rodo, kad net ir subląstelinio lygmeniu inkstų struktūra ir funkcijos yra pažeidžiamos išemijos/reperfuzijos metu. Tačiau trūksta duomenų apie kardiolipino kiekybinius ir/ar kokybinius pokyčius. Yra duomenų, kad kardiolipinui specifinis tetrapeptidas SS-31 atstato mitochondrijų morfologinius pokyčius, sukeltus išemijos/reperfuzijos inkstuose [91,216]. Taip pat parodyta, jog šis junginys apsaugo mitochondrijų struktūrą išemijos/

reperfuzijos metu žiurkės širdyje, tačiau neatstato prarasto kardiolipino kiekio [90]. Aktualu analizuoti išemijos/reperfuzijos poveikį kardiolipino kiekybiniais ir kokybiniais pokyčiams inkstuose. Tokie tyrimai gali atskleisti kardiolipino pažaidos molekulinis mechanizmus inkstuose išemijos/reperfuzijos metu, bet taip pat parodyti potencialius farmakologinius taikinius, siekiant apsaugoti kardiolipiną nuo oksidacijos, hidrolizės ir tolimesnės inkstų mitochondrijų pažaidos.

2. TYRIMO METODAI

Disertacinio darbo metu eksperimentiniai tyrimai su gyvūnais buvo vykdomi remiantis Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus įsakyму Nr. B1-866 „Dėl mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“. Tyrimams su bandomaisiais gyvūnais vykdyti buvo gautas leidimas iš Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos (leidimo Nr. G2-170).

Eksperimentams buvo naudojami 2–3 mėn. amžiaus Wistar veislės žiurkių patinėliai (~250 g svorio). Tiriamųjų gyvūnų skaičius ir suskirstymas į grupes aprašytas skiltyje „2.1. Inkstų išemijos/reperfuzijos *in vivo* modelis“. Gyvūnai buvo veisiami ir laikomi Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos vivariume, o eksperimentiniai tyrimai su gyvūnais buvo atliekami LSMU Neuromokslų instituto Molekulinės neurobiologijos laboratorijoje.

Ląstelių kultivavimo reagentai buvo įsigyti iš Thermo Fisher Scientific (JAV). Visi kiti reagentai iš Sigma-Aldrich (JAV), jeigu nenurodyta kitaip.

2.1. Inkstų išemijos/reperfuzijos *in vivo* modelis

Wistar veislės 2–3 mėn. žiurkių patinėliams buvo atliekama bendrinė anestezija intraperitonealiai suleidžiant 90 mg/kg ketamino ir 12 mg/kg ksilazino. Anestezijos poveikis patikrinamas spustelint užpakalinę letenėlę, jeigu gyvūnas netraukia letenos, laikoma, kad anestezija veikia ir pradedama chirurginė procedūra. Pirmiausia atveriamas gyvūno pilvo ertmė darant pjūvį per pilvo raumenų baltąją liniją, tuomet nuo aplinkinių audinių atskiriamos inkstų arterijos ir užspaudžiamos mikrovaskuliniais gnybtais sukeliant išemiją. Inkstų išemija patvirtinama kai stebimas inkstų spalvos pasikeitimas (inkstai ima šviesėti išemijos pradžioje, vėliau patamsėja). Išemija taikoma 30, 40 arba 60 minučių. Po išemijos mikrovaskuliniai gnybtai yra pašalinami nuo inkstų arterijų ir sukeliamas reperfuzija, trunkanti 30 min. Reperfuzija patvirtinama stebint inkstų spalvos pokytį (jau po 30 minučių išemijos inkstų spalva pasidaro tamsiai raudona, o sukeliant reperfuziją, inkstų spalva ima šviesėti). Kontrolinei grupei taikomos visos tos pačios procedūros išskyrus inkstų arterijų užspaudimą, tačiau nuo pilvo ertmės atvėrimo iki inkstų išėmimo žiurkės laikomos 90 min. Išemijos ar išemijos/reperfuzijos metu, bei kontrolinės grupės žiurkės yra laikomos ant šildomos pagalvėlės, o pilvo ertmė yra uždengiama marle, sudrėkinta fiziologiniu vandeniu. Pasibaigus išemijai arba išemijai/reperfuzijai gyvūnams atliekama cervikalinė dislokacija ir išimami inkstai, kurie toliau iškart naudojami mitochondrijų izoliavimui arba RNR

išskyrimui. Iš viso gyvūnai suskirstyti į septynias grupes – kontrolė, išemija 30 min., išemija 40 min., išemija 60 min., išemija 30 min. ir reperfuzija 30 min., išemija 40 min. ir reperfuzija 30 min., išemija 60 min. ir reperfuzija 30 min. Kiekvienoje grupėje buvo naudojami 3–7 gyvūnai.

2.2. Inkstų mitochondrijų izoliavimas

Žiurkės inkstai plaunami 4 °C KCl tirpalu nuo kraujo ir dedami į petri lėkštelę ant ledo. Nuo inkstų nuimama kapsulė, inkstai perkerpami pusiau išilgai ir pašalinama geldelė bei jungiamieji audiniai. Inkstai smulkiai sukarpo- mi, surenkami į mėgintuvėlį, užpilama 4 °C mitochondrijų izoliavimo terpė (250 mM sacharozės, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl, pH 7,4) ir homoge- nizuojama 4–5 sekundes elektriniu homogenizatoriumi IKA T25 digital Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Vokietija), $20,6 \times 10^3$ aps./min. greičiu. Homogenatas praskiedžiamas su izoliavimo terpe iki 15 ml ir cen- trifuguojamas $750 \times g$, 5 min. 4 °C temperatūroje Heraeus Megafuge 16R centrifugoje (Thermo Scientific, JAV). Po centrifugavimo supernatantas atskiriamas ir vėl centrifuguojamas $6800 \times g$, 10 min. 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas, o prie mėgintuvėlio dugno prili- pusios mitochondrijos atsargiai surenkamos automatine pipete su 150 µl izo- liavimo terpės. Mitochondrijų suspensija gerai sumaišoma, dalis atidedama mitochondrijų baltymo kiekio nustatymui, o likusi dalis saugoma –80 °C iki lipidų išskyrimo.

2.3. Ląstelių kultūra

Eksperimentiniams tyrimams su ląstelių kultūra buvo naudojama imor- talizuota žmogaus inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių linija (RPTEC/TERT1, toliau RPTEC ląstelės; Evercyte GmbH, Viena, Austrija). Ląstelės buvo kultivuojamos remiantis tiekėjo pateiktomis rekomendacijomis sterilioje aplinkoje Herasafe KS laminare (Thermo Scientific, JAV). Ląste- lės auginamos 25–75 cm² flakonuose mitybinėje terpėje DMEM/F12 (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* su Ham's F12 terpės priedu santykiu 1:1), kuri buvo papildyta 2 mM Glutamax modifikuotu glutaminu, 10 µg/ml žmogaus epiderminiu augimo veiksnium, 25 µg/ml hidrokortizonu, 6,7 µg/ml natrio selenitu, 5 µg/ml transferinu, 10 µg/ml insulinu, 100 µg/ml geneticinu (G418) ir 4 proc. fetaliniu veršelio serumu. Ląstelių kultūros buvo laikomos Heracell 150i inkubatoriuje (Thermo Scientific, JAV), 37 °C temperatūroje, 5 proc. CO₂. Ląstelių persėjimo metu sena mitybinė terpė išpilama, ląstelės nuplaunamos steriliu fosfatinu buferiniu tirpalu, ant ląstelių pilamas mo- difikuoto tripsino TrypLe reagentas 25 µl/cm² ir inkubuojama 4–6 minutes

inkubatoriuje. Ląstelių atkibimas nuo flakono dugno įvertinamas šviesiniu mikroskopu, ląstelės surenkamos ir suspenduojamos su mitybine terpe bei centrifuguojamos $170 \times g$ greičiu 5 minutes kambario temperatūroje Eppendorf 5810 R centrifugoje (Eppendorf, Vokietija). Po centrifugavimo ląstelės suspenduojamos 1 ml šviežioje mitybinėje terpėje bei suskaičiuojamos naudojant 0,4 proc. tripano mėlio dažus, kurių imama 20 μ l ir skiedžiama su 20 μ l ląstelių suspensijos ir paskleidžiama po dengiamuoju stikleliu ant Fuchs-Rosenthal hemocitometro kameros (Marienfeld, Vokietija), tuomet ląstelės skaičiuojamos naudojant šviesinį mikroskopą. Ląstelės į flakonus persėjamos $6-8 \times 10^4$ ląstelių/cm² tankiu šviežioje mitybinėje terpėje, kurios galutinis tūris 240 μ l/cm².

2.4. *In vitro* hipoksijos/reoksigenacijos modelis

Hipoksija/reoksigenacija ląstelių kultūroms buvo sukeliaama panaudojant hipoksinę kamerą Baker Ruskinn InVivo2 (Baker Co., Bridgend, JK). Kameros atmosferoje buvo palaikoma 2 proc. O₂ bei 5 proc. CO₂ koncentracija, palaikoma 37 °C temperatūra ir 70 proc. drėgmė. Prieš sukeliant hipoksiją, šviežia mitybinė terpė buvo laikoma hipoksinėje kameroje per naktį (toliau – hipoksinė terpė). Ląstelių kultūroms hipoksija sukeliaama jas perkeliant į hipoksinę kamerą, pašalinant seną mitybinę terpę ir užpilant hipoksinės terpės. Taip ląstelės laikomos 24 val. Po to ląstelės surenkamos, suskaičiuojamos ir atliekami tyrimai arba ląstelės užšaldomos –80 °C tolimesnei analizei. Siekiant sukelti reoksigenaciją, po hipoksijos ląstelės išimamos iš hipoksinės kameros, sena hipoksinė terpė pašalinama, užpilama šviežia mitybinė terpė ir ląstelės laikomos įprastomis sąlygomis inkubatoriuje dar 24 val. Tuomet ląstelės surenkamos, suskaičiuojamos ir atliekami kiti tyrimai arba ląstelės užšaldomos –80 °C tolimesnei analizei.

Hipoksijos/reoksigenacijos modeliui su glikolizės inhibitoriumi buvo naudojama 2-deoksi-D-gliukozė (2-dG). Hipoksija/reoksigenacija buvo sukeliaama kaip aprašyta anksčiau, tačiau į hipoksinę terpę buvo dedama 17,53 mM 2-dG (koncentracija, atitinkanti gliukozės koncentraciją auginimo terpėje).

2.5. Baltymo kiekio nustatymas mitochondrijų suspensijoje ir ląstelių lizatuose

Baltymo kiekio nustatymas inkstų mitochondrijų suspensijoje buvo atliekamas Biureto metodu [217]. Mėgintuvėlyje sumaišoma 25 μ l mitochondrijų suspensijos, 975 μ l 0,33 proc. deoksicholato tirpalo ir 4 ml Biureto reagento (0,15 proc. CuSO₄, 0,6 proc. natrio kalio tartrato ir 0,75M NaOH). Kontroliniame mėgintuvėlyje sumaišoma 1000 μ l 0,33 proc. deoksicholato tirpalo

su 4 ml Biureto reagento. Mėginiai uždengiami ir inkubuojami 37 °C temperatūros vandens vonelėje 30 min. Po inkubacijos mėginių šviesos absorbcija matuojama esant 536 nm bangos ilgiui spektrofotometru Nanophotometer Pearl (Implen, Vokietija). Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal kalibracinę kreivę, sudarytą naudojant standartinių koncentracijų jaučio serumo albumino (BSA, angl. *Bovine serum albumin*) tirpalus.

Baltymo kiekio nustatymas RPTEC ląstelių lizatuose buvo atliekamas naudojant Bradfordo reagentą pagal gamintojo rekomendacijas. Ląstelių lizavimas buvo atliekamas jas užšaldant –80 °C temperatūroje ir atšildant kambario temperatūroje bei sumaišant vortex tipo maišykle, taip kartojama tris kartus. Po lizavimo ląstelių suspensija centrifuguojama 8000 × g, 10 min. 4 °C temperatūroje. Supernatantas išsaugomas, kuriame toliau išmatuojamas baltymo kiekis. Baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal kalibracinę kreivę.

2.6. Ląstelių gyvybingumo ir proliferacijos vertinimas

Ląstelių gyvybingumas buvo vertinamas fluorescencinės mikroskopijos metodu, nudažant ląstelių branduolius fluorescenciniais dažais bisbenzimidu H 33342 trichloridu (Hoechst 33342) ir propidžio jodidu (PJ), kurie jungiasi prie deoksiribonukleorūgščių. Ląstelių membrana yra pralaidi Hoechst 33342, todėl nusidažo gyvybingų ir apoptotinių ląstelių branduoliai (švyti mėlynai). Gyvybingos ląstelės nuo apoptotinių atskiriamos pagal nudažyto branduolio morfologiją – gyvybingų ląstelių branduoliai nusidažę tolygiai su lygiais pakraščiais, apoptotinių ląstelių branduoliai yra kondensuoti ir fragmentuoti, švyti intensyvia mėlyna spalva. Ląstelių membrana nėra pralaidi PJ, todėl nusidažo tik nekrotinių ląstelių branduoliai (švyti raudonai). Atliekant dažymą, ląstelių kultūros buvo inkubuojamos su 4 µg/ml Hoechst 33342 ir 7 µM PJ 15 min., 37 °C temperatūroje. Vaizdinimas buvo atliekamas naudojant fluorescencinę Olympus IX71S1F-3 (Japonija) mikroskopą. Ląstelių gyvybingumas vertinamas naudojant 200x padidinimą ir skaičiuojant ląsteles penkiuose atsitiktiniuose mikroskopavimo laukeliuose. Ląstelių skaičiavimai buvo atliekami naudojant ImageJ 1.53k programinę įrangą. Apdorojant rezultatus, buvo apskaičiuojamas penkių laukelių ląstelių skaičiaus vidurkis, gyvybingumas išreiškiamas procentais gyvybingų, apoptotinių ir nekrotinių ląstelių nuo viso ląstelių skaičiaus.

Ląstelių proliferacija buvo vertinama skaičiuojant ląsteles prieš pasėjimą ir po hipoksijos/reoksigenacijos, lygiagrečiai naudojant tokios pačios kultivavimo trukmės kontrolines grupes. Ląstelių skaičiavimas buvo atliekamas naudojant hemocitometro kamerą ir Tripano mėlio dažus, kaip aprašyta anksčiau (2.3 skirsnis). Apskaičiuojant ląstelių proliferaciją eksperimentinėse grupėse (hipoksija/reoksigenacija ar atitinkamos kultivavimo trukmės kontroli-

nės grupės), ląstelių skaičiaus didėjimas buvo išreiškiamas procentais nuo pasėto ląstelių skaičiaus.

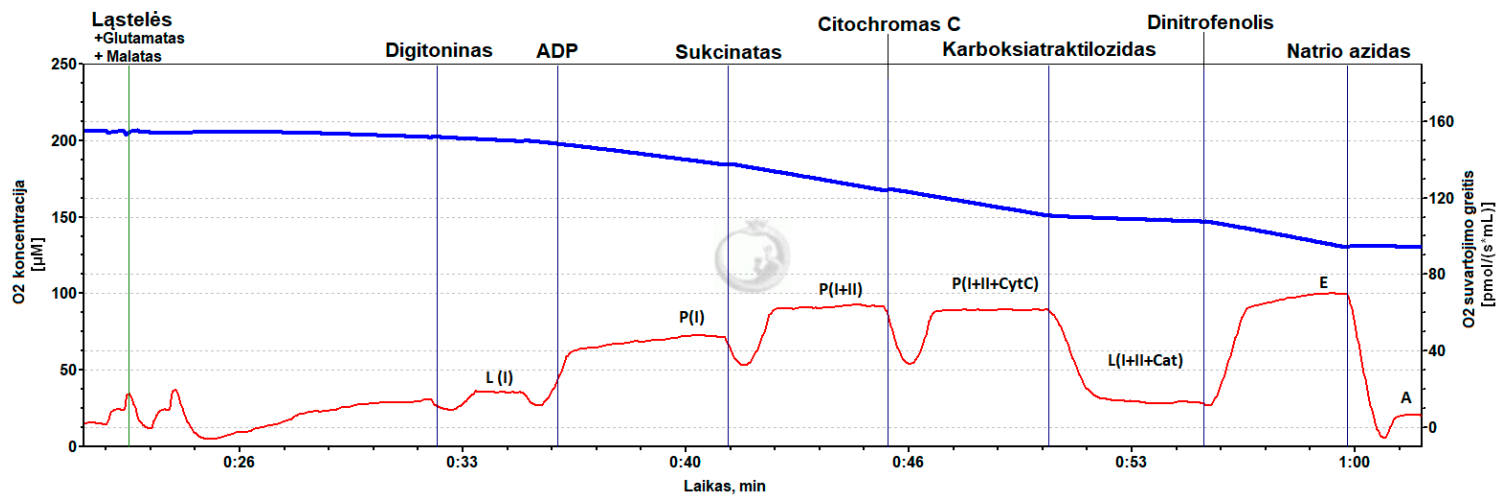
2.7. Mitochondrijų kvėpavimo greičio registravimas

Mitochondrijų kvėpavimo greičio registravimas buvo atliekamas su permeabilizuotomis ląstelėmis matuojant deguonies suvartojimo greitį naudojant didelės raiškos oksigrafinę sistemą Oroboros O2k (Insbrukas, Austrija). Registravimo metu 2 mln. ląstelių buvo sumaišoma su specialia kvėpavimo terpe ir dedama į dviejų mililitrų oksigrafo kiuvetę, kurioje nuolat palaikoma 37 °C temperatūra ir maišoma magnetine maišykle 750 aps./min. greičiu. Kvėpavimo terpės sudėtis: 3 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0,5 mM EGTA, 60 mM k-laktobionato, 20 mM taurino, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM cukrozės, (pH 7,1, 37 °C). Mitochondrijų kvėpavimo registravimas vyko tokia eiga:

1. Į oksigrafo kiuvetę pridedamas 2 mln. ląstelių bei mitochondrijų kvėpavimo grandinės I komplekso substratų 5 mM glutamato ir 7,5 mM malato. Ląstelėmis permeabilizuoti dedama 12,15 μM digitonino. Registruojamas deguonies suvartojimo greitis laidumo būsenoje (L(I));
2. Į kiuvetę dedama 2 mM ADP, registruojamas deguonies suvartojimo greitis fosforilinimo būsenoje su I komplekso substratais (P(I));
3. Į kiuvetę dedama 12,5 mM sukcinato, mitochondrijų kvėpavimo grandinės II komplekso substrato, registruojamas maksimalus deguonies suvartojimo greitis fosforilinimo būsenoje (P(I+II));
4. Į kiuvetę dedama 35 μM citochromo C ir registruojamas deguonies suvartojimo greitis (P(I+II+CytC)). Pridedant egzogeninio citochromo C, kuriam nepralaidi išorinė mitochondrijų membrana, vertinama mitochondrijų išorinės membranos pažeidimą. Apskaičiuojamas citochromo C efektas $P(I+II+CytC)/P(I+II)$, kuris yra lygus 1, esant nepažeistai mitochondrijų išorinei membranai, ir didėja, jeigu išorinės membranos laidumas yra padidėjęs;
5. Į kiuvetę dedama 1 μM karboksitraktilozido (Cat), mitochondrijų adenino nukleotidų nešiklio slopiklio, ir registruojamas deguonies suvartojimo greitis laidumo būsenoje (L(I+II+Cat)). Šioje laidumo būsenoje galima vertinti mitochondrijų vidinės membranos pažeidimą ir laidumo pokyčius.
6. Į kiuvetę dedama 45 μM dinitrofenolio, kuris padidina vidinės mitochondrijų membranos laidumą ir atskiria fosforilinimą nuo elektronų pernašos. Tuo metu registruojamas deguonies suvartojimo greitis esant maksimaliam elektronų pernašos grandinės pajėgumui (E).

7. Galiausiai, į kiuvetę pridedama 10 mM natrio azido (NaN_3), kuris yra mitochondrijų kvėpavimo grandinės IV komplekso slopiklis, todėl užslopina mitochondrijų deguonies suvartojimą. Registruojamas nuo mitochondrijų nepriklausomas ląstelėje vykstančių procesų deguonies suvartojimo greitis (A).

Duomenų analizės metu deguonies suvartojimo greitis A yra atimamas iš visų kitų registruotų deguonies suvartojimo greičių, taip vertinamas tik mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis, kuris yra standartizuojamas vienam milijonui ląstelių ir išreiškiamas $\text{pmol/s/1 mln. ląstelių}$. Žemiau pateikta tipinė pavyzdinė mitochondrijų kvėpavimo registravimo kreivė (2.7.1 pav.).



2.7.1 pav. RPTEC ląstelių mitochondrijų kvėpavimo tipinė registravimo kreivė

2.8. Vandenilio peroksido susidarymo greičio vertinimas RPTEC ląstelėse

Vandenilio peroksido susidarymo greitis RPTEC ląstelėse buvo matuojamas fluorimetriniu metodu panaudojant AmplexRed reagentą, kuris verčiamas į fluorescentinį junginį rezorufiną veikiant H_2O_2 ir krienų peroksidazei. Ląstelės buvo suskaičiuojamos ir suspenduojamos HBSS (angl. *Hanks' Balanced Salt Solution*) druskų tirpale su $30 \mu\text{g/ml}$ krienų peroksidaze ir $15 \mu\text{M}$ AmplexRed ($7,3 \times 10^5$ ląstelių/ml), suspensija dedama į 96 šulinėlių juodo plastiko plokštelę. Rezorufino fluorescencija matuojama kas 5 minutes, iš viso 30 minučių, esant 544 nm sužadinimo ir 590 nm emisijos bangų ilgiams naudojant Fluoroscanner Ascent (Thermo Scientific, JAV) fluorimetrą. Fluorescencijos signalas buvo nukalibruotas su žinomomis H_2O_2 koncentracijomis, rezultatai pateikiami kaip $H_2O_2 \mu\text{M}$ per 1 minutę/1 milijonui ląstelių.

2.9. Kardiopolino kiekio analizė RPTEC ląstelėse fluorimetriniu metodu

Bendro kardiopolino kiekio analizė RPTEC ląstelėse buvo atliekama fluorimetriniu metodu panaudojant kardiopolinui specifinį fluorescencinį dažą 10-N-nonil-akridino oranžą (NAO). Ląstelės suspenduojamos auginimo terpėje su $1 \mu\text{M}$ NAO dažu ir inkubuojama 30 min, 37°C temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės nucentrifuguojamos, pašalinamas supernatantas su NAO dažu, o ląstelės resuspenduojamos fosfatiniame buferyje 10^6 ląstelių/ml ir iš karto matuojama fluorescencija Fluoroscanner Ascent (Thermo Scientific, JAV) fluorimetru juodo plastiko 96 šulinėlių plokštelėse esant 485 nm sužadinimo ir 538 nm emisijos bangų ilgiams. Gauti rezultatai perskaičiuojami vienam milijonui ląstelių ir išreiškiama kaip kardiopolino kiekis/NAO fluorescencijos intensyvumas santykiniais vienetais.

2.10. Lipidų išskyrimas

Lipidų išskyrimas iš RPTEC ląstelių ir žiurkės inkstų mitochondrijų buvo atliekamas modifikuotu Folch'o metodu naudojant chloroformo ir metanolio mišinį [218]. Vidutiniškai 4 mln. RPTEC ląstelių arba 5 mg žiurkės inkstų mitochondrijų suspensijos buvo sumaišoma su dejonizuotu vandeniu, metanolio ir chloroformu, atitinkamu tūrio santykiu 1:2:4. Tuomet į mišinį pridama kardiopolino vidinio standarto CL (C14:0)₄ (Avanti polar lipids, JAV). Vidinio standarto dedama $40 \mu\text{g/ml}$, galutiniam lipidų suspensijos tūriui ($600 \mu\text{l}$). Mišinys gerai sumaišomas ir centrifuguojamas 2000 aps./min. greičiu 5 minutes kambario temperatūroje. Po centrifugavimo mišinys išsisluoksniuoja – viršutinis metanolio/vandens sluoksnis išsiurbiamas pastero pipete, apatinis chloroformo sluoksnis su ištirpusiais lipidais nupilamas į stiklinį mė-

gintuvėlį, kuris statomas į kaitinimo bloką ~50 °C. Virš mėgintuvėlio leidžiamos azoto dujos, siekiant apsaugoti lipidus nuo oksidacijos oro deguonimi. Mėgintuvėlis paliekamas, kad garuotų chloroformas. Toliau aprašyta dalis pakartojama tris kartus: atskirta nuo chloroformo metanolio/vandens frakcija sumaišoma su dviem tūrio dalimis šviežio chloroformo ir centrifuguojama; po centrifugavimo, chloroformo/lipidų dalis vėl nupilama į stiklinį mėgintuvėlį garantis kaitinimo bloke. Galutinai išgaravus chloroformui lipidai resuspenduojami 600 µl chloroformo:2-propanolio mišinyje tūrio santykiu 1:5, filtruojama per 0,22 µm švirkštinį filtrą ir supilama į tamsaus stiklo chromatografinį mėgintuvėlį. Iki chromatografinės analizės lipidų frakcijų mėginiai buvo saugomi –80 °C temperatūroje.

2.11. Kardiolipino standarto oksidacija

Kardiolipino standartas (*Cardiolipin sodium salt from bovine heart*, Sigma Aldrich, JAV) buvo oksiduojamas remiantis metodika, aprašyta Kagan ir kt. [130] ir Tyurina ir kt. [219]. Kardiolipino standartas buvo gerai sumaišytas fosfatiniame buferyje (K_2HPO_4 50 mM, KH_2PO_4 50 mM, pH 7,4) ir laikomas ultragarso vonelėje 3 minutes, kad susiformuotų micelės. Į tirpalą buvo pridėta 30 µM citochromo C bei 400 µM H_2O_2 , tuomet inkubuojama 60 min. 37 °C temperatūroje. H_2O_2 400 µM buvo dedama po 100 µM kas 15 min. inkubacijos metu, iš viso keturis kartus. Po inkubacijos, lipidai buvo išskiriami kaip aprašyta anksčiau (2.10 skirsnis). Kardiolipino oksidacijos produktai buvo vertinami chromatografijos-masių spektrometrijos metodu.

2.12. Kardiolipino kokybinė ir kiekybinė analizė chromatografijos-masių spektrometrijos metodu

Kardiolipino formų kokybinė ir kiekybinė analizė žiurkės inkstų mitochondrijų bei RPTEC ląstelių lipidų frakcijose buvo atliekama ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos metodu (UPLC-MS/MS), sukurtu remiantis metodika, aprašyta Kim ir kt. [187]. Analizei naudotas Waters Acquity UPLC chromatografas su Xevo TQD (trigubo kvadrupolio) masių spektrometru (Waters, JAV).

Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos (UPLC) metu lipidų skirstymui buvo taikytas atvirkščių fazių gradientinės eliacijos metodas panaudojant du eliuventus – A (450 ml acetonitrilo, 50 ml dejonizuoto H_2O , 2,5 ml ledinės acto rūgšties ir 2,5 ml trietilamino) ir B (450 ml 2-propanolio, 50 ml dejonizuoto H_2O , 2,5 ml ledinės acto rūgšties ir 2,5 ml trietilamino). Gradientinės eliacijos eiga pateikta 2.12.1 lentelėje. Toks eliuentų mišinys užtikrina efektyvų skirtingų kardiolipino formų atskyrimą chromatografinėje kolonėlėje,

bei sudarė sąlygas kardiolipinui įgauti vieną neigiamą krūvį $[M-H]^+$. Chromatografiniam lipidų skirstymui buvo naudojama Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm kolonėlė. Mėginio injekcijos tūris 10 μl , chromatografinės kolonėlės temperatūra palaikoma ties 40 °C.

2.12.1 lentelė. *Gradientinės eliucijos eiga vykdyta ultraefektyviosios skysčių chromatografijos metu*

Eliucijos laikas, min.	Eliuento A tūris, proc.	Eliuento B tūris, proc.	Tėkmės greitis, ml/min.
Pradinis	100	0	0,5
10	50	50	0,5
20	20	80	0,35
21	0	100	0,2
24	100	0	0,2
26	100	0	0,5

Masių spektrometrijos metu lipidai buvo jonizuojami elektropurkštuvinės jonizacijos metodu ir taikytas neigiamai įkrautų jonų skenavimas masės/krūvio (m/z) santykio intervale tarp 200 ir 1650. Kiti masių spektrometro parametrai: kapiliaro įtampa 2,5 kV, konusinio filtro įtampa 120 V, šaltinio temperatūra 150 °C, desolvacijos (išgarinimo) temperatūra 600 °C, ardymo energija 80 V. Jonizacijos metu kardiolipinas ar jo fragmentas įgaudavo vieną neigiamą krūvį, todėl jų masės ir krūvio santykis atitiko kardiolipino arba jo fragmento masę. Tandeminės masių spektrometrijos metu buvo taikytas daugybinių reakcijų stebėjimas (MRM, angl. *Multiple reaction monitoring*), analizuojamas kardiolipinas bei iš jo kilę fragmentai ir pagal tai buvo identifikuojamos skirtingos kardiolipino formos.

Kardiolipino kokybinė analizė buvo atliekama remiantis jų sulaikymo laiku, masės/krūvio santykiu bei būdinga fragmentacija. Kardiolipino kiekybinė analizė atlikta apskaičiuojant chromatografinių smailių plotus ir standartizuojant pagal vidinio standarto chromatografinės smailės plotą. Kiekybiniai rezultatai perskaičiuojami pagal kalibracinę kreivę (naudojant kardiolipino standartą), arba išreiškiami santykiniais vienetais pagal chromatografinių smailių plotus, jeigu nėra tam tikrų kardiolipino formų standartų. Tetralinoleil-kardiolipino (TLCL) oksidacijos produktų kiekybinis vertinimas ir standartizavimas atliktas apskaičiuojant santykį tarp konkrečios oksiduotos formos chromatografinės smailės ploto ir visų oksiduotų formų bei neoksiduoto TLCL chromatografinių smailių plotų sumos. UPLC-MS/MS duomenų apdorojimas ir analizė buvo vykdoma naudojant MassLynx 4.0 programinę įrangą (Waters, JAV).

2.13. Visuminės RNR išgryninimas iš RPTEC ląstelių ir žiurkės inkstų

Visuminė RNR (ribonukleorūgštys) iš RPTEC ląstelių ir žiurkės inkstų buvo išgryninama panaudojant TRIzol reagentą (Thermo Fischer Scientific, JAV) pagal gamintojo rekomendacijas. Ląstelių suspensija gerai sumaišoma su 0,5 ml TRIzol reagentu ir inkubuojama kambario temperatūroje 5 minutes. Pridedama 0,1 ml chloroformo, sumaišoma vortex tipo maišykle, inkubuojama 2–3 minutes ir centrifuguojama 15 min. $12000 \times g$ greičiu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje Heraeus Megafuge 16R centrifugoje (Thermo Scientific, JAV). Po centrifugavimo vandeninis sluoksnis atskiriamas ir sumaišomas su 0,25 ml 2-propanoliu, inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 10 min. $12000 \times g$ greičiu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, RNR nuosėdos resuspenduojamos su 0,5 ml 75 proc. etanolio tirpalu, sumaišoma ir centrifuguojama 5 min. $7500 \times g$ greičiu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po centrifugavimo RNR nuosėdos vėl resuspenduojamos etanolio ir centrifuguojamos. Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas, nuosėdos džiovinamos ore 5–10 min. ir resuspenduojamos $40\text{ }\mu\text{l}$ H_2O be nukleazių. RNR kiekis ir grynumas nustatomas spektrofotometru Nanophotometer Pearl (Implen, Vokietija), su integruota RNR kiekio ir grynumo vertinimo programa. RNR mėginiai saugomi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki kopijinės DNR sintezės procedūros.

Žiurkės inkstai po chirurginių procedūrų (žr. 2.1 skirsnį) plaunami $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ KCl tirpalu, smulkiai sukarpomi ir homogenizuojami 10–15 sekundžių elektriniu homogenizatoriumi IKA T25 digital Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Vokietija), $20,6 \times 10^3$ aps./min. greičiu. Atsveriami apie 60 mg homogenato ir vėl homogenizuojama 10 sekundžių su 1 ml TRIzol reagentu. Homogenatas inkubuojamas 2–3 minutes ir centrifuguojama 15 min. $12000 \times g$ greičiu $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Tolimesnė procedūra atliekama identišškai kaip aprašyta anksčiau su RPTEC ląstelėmis, tačiau naudotų tirpalų kiekiai yra du kartus didesni (0,2 ml chloroformo, 0,5 ml 2-propanolio, 1 ml 75 proc. etanolio, $80\text{ }\mu\text{l}$ H_2O be nukleazių).

2.14. Kopijinės DNR sintezė

Kopijinė DNR buvo sintetinama panaudojant reagentų rinkinį High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, JAV), remiantis gamintojo rekomendacijomis. Reakcijos mišiniai buvo ruošiami šaldomuose stoveliuose. Kopijinės DNR sintezei naudojamų reagentų rinkinio komponentai ir RNR mėginio kiekis pateikti 2.14.1 lentelėje. Bendras reakcijos tūris $20\text{ }\mu\text{l}$, reakcijai naudojama 600 ng visuminės RNR.

2.14.1 lentelė. Kopijinės DNR sintezei naudojami reakcijos komponentai ir jų tūris vienai reakcijai

Reakcijos komponentas/reagentas	Tūris vienai reakcijai, μ l
10x atvirkštinės transkripcijos buferis	2
25x deoksinukleozido trifosfatų mišinys (dNTP)	0,8
10x RT atsitiktinių pradmenų mišinys	2
„Multiscribe“ atvirkštinė transkriptazė	1
Ribonukleazų slopiklis	1
H ₂ O be nukleazų	3,2
RNR mėginys	10 (60 ng/ μ l)

Reakcijos komponentai (išskyrus RNR mėginį ir H₂O be nukleazų) yra iš reagentų rinkinio High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, JAV).

Kopijinės DNR sintezės reakcija vykdoma naudojant termociklerį Biometra T Personal 48 Thermocycler (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Analytic Jena, Vokietija) pagal nustatytą programą: 10 min. 25 °C, 120 min. 37 °C, 5 min. 85 °C. Po kopijinės DNR sintezės, mėginiai buvo laikomi –80 °C temperatūroje iki genų raiškos analizės.

2.15. Genų raiškos analizė realaus laiko polimerazės grandininė reakcija

Realaus laiko polimerazės grandininė reakcija (RT-PCR, angl. *real-time polymerase chain reaction*) buvo atliekama naudojant reagentą TaqMan Universal Master Mix II with UNG (Applied Biosystems, JAV), taip pat specifinių RT-PCR pradmenų rinkinius su fluorescenciniais zondais TaqMan Gene Expression Assay FAM (Applied Biosystems, JAV). Tiriamieji genai ir pradmenų rinkinių kodai: *CRLSI* Hs00219512_m1, *TAZ* Hs00902887_g1, *LCLAT1* Hs00699427_m1). RT-PCR komponentai vienai reakcijai pateikti 2.15.1 lentelėje. Bendras reakcijos tūris 10 μ l. Kiekvienam tiriamam mėginiui buvo atliekami du pakartojimai.

2.15.1 lentelė. RT-PCR komponentai ir jų tūriai vienai reakcijai

Reakcijos komponentas/reagentas	Tūris vienai reakcijai, μ l
TaqMan Universal Master Mix II with UNG, 2x	5
TaqMan Gene Expression Assay, 20x	0,5
Kopijinė DNR (10 ng/ μ l)	2
H ₂ O be nukleazų	2,5

RT-PCR reakcijos buvo vykdomos naudojant Nerbe Plus 0,1 ml mikrocentrifuginius mėgintuvėlius (Nerbe Plus GmbH & Co. KG, Vokietija) ir

Quiagen Rotor Gene Q 5plex HRM RT-PCR termociklerį (Quiagen, Vokietija), pagal nustatytą programą: 2 min. 50 °C, 10 min. 95 °C, 40 ciklų – 15s 95 °C ir 1 min. 60 °C. Kopijinės DNR padauginimas įvertintas pagal fluorescencijos lygį, registruojant slenkstinio ciklo vertę (C_T , angl. *cycle of threshold*). Duomenų analizė atlikta programine įranga Rotor-Gene Q Series Software V2.3.1 (Quiagen, Vokietija). C_T vertės buvo normalizuojamos referentinio geno *HPRT1* (pradmenų rinkinio kodas Hs99999909_m1, Applied Biosystems, JAV) C_T vertėms. Genų raiškos pokyčiai buvo apskaičiuojami $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu.

2.16. Kardiolino sintezės/remodeliavimo fermentų ir HIF-1 α veiksnio kiekio analizė RPTEC ląstelėse

Kardiolino sintazės (CRLS1), lizokardiolino aciltransferazės 1 (LCLAT1), tafazino ir hipoksijos indukuojamo veiksnio (HIF-1 α) baltymų kiekiai buvo nustatomi RPTEC ląstelių lizatuose panaudojant ELISA rinkinius: Human Cardiolipin Synthase (CRLS1) ELISA Kit (Abbexa, Anglija), Human Lysocardiolipin Acyltransferase 1 (LCLAT1) ELISA Kit (Abbexa, Anglija), Human Tafazzin/TAZ ELISA Kit (Antibodies.com, Anglija), Human HIF-1 alpha Total ELISA Kit (Invitrogen, Thermo Scientific, JAV). Analizė buvo atlikta pagal ELISA rinkinių gamintojų protokoluose pateiktas instrukcijas.

2.17. Fosfolipazės A $_2$ γ kiekio analizė RPTEC ląstelėse

Fosfolipazės A $_2$ γ (iPLA $_2$ γ) kiekis RPTEC ląstelėse buvo vertinamas Western Blot metodu panaudojant iPLA $_2$ γ specifinį antikūną anti-PNPLA8 (Patatin like phospholipase domain containing 8, Abbexa, Anglija), bei antikūną referentiniam baltymui ACTB (Beta aktinas, Abbexa, Anglija). Pirmiausia buvo pagaminami ląstelių lizatai šildant-šaldant, baltymų kiekis lizate buvo nustatomas naudojant Bradfordo reagentą, kaip aprašyta anksčiau (2.5. skirsnis). Mėginiams paruošti imama 15 μ g ląstelių lizato, sumaišoma su buferinio tirpalo NuPAGE LDS Sample Buffer (Thermo Scientific, JAV) ir 10 proc. merkapto-etanolio mišiniu, kaitinama 5 min. 100 °C temperatūroje. Paruošiama elektroforezės celė XCell 4 SureLock Midi-cell Electrophoresis System (Thermo Scientific, JAV) – įstatomas 10 proc. poliakrilamido gelis ir užpildoma elektroforezės buferiu (25 mM Tris, 192 mM glicinas, 1 proc. natrio dodecilsulfatas). Į gelį sudedami mėginiai ir pradedama elektroforezė – 30 minučių leidžiama 90 V srovė, tada 60 min. 150 V. Pasibaigus elektroforezei, gelis plaunamas Western Blot (pernašos) buferyje (25 mM Tris, 192 mM glicino, 20 proc. metanolio) 15 min. Baltymai iš gelio pernešami ant 0,45 μ m poli-

vinilideno fluorido (PVDF) membranos pusiau sausos pernašos būdu (angl. *semi-dry transfer*) panaudojant pernašos buferį, vykdoma 60 min. esant 20 V įtampai, panaudojant Invitrogen Semi-Dry Electrobloetter sistemą (Invitrogen, JAV). Po pernašos membrana blokuojama TBST tirpalu (15 mM Tris-HCl, 4,6 mM Tris, 153 mM NaCl, 0,1 proc. Tween) su 5 proc. BSA tirpalu 1 val. kambario temperatūroje ir inkubuojama su pirminiais antikūnais per naktį 4 °C temperatūroje. Pirminiai antikūnai anti-ACTB ir anti-PNPLA8 buvo skiedžiami 1:1000 santykiu su TBST + 5 proc. BSA buferiu. Po inkubacijos membrana plaunama 3 kartus po 10 min. su TBST buferiu ir inkubuojama su antriniu antikūnu, konjuguotu su krienų peroksidaze (Donkey Anti-Rabbit IgG Antibody (HRP), Abbexa, Anglija), 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos su antriniu antikūnu, membrana plaunama du kartus po 10 min. ir 1 kartą 5 min. su PBS. Membrana veikiama substratais Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, JAV) 2 min. ir membranos vaizdinimas atliekamas naudojant Biospectrum 600 vaizdinimo sistemą (UVP, JAV) ir Vision WorksLS (UVP, JAV) programinę įrangą. Atliekant analizę pagal reagentų rinkinio gamintojo nurodytas instrukcijas, buvo stebimas PNPLA8 baltymo fragmentavimasis, todėl vertinant rezultatus buvo pasirinkta įvertinti vieno vizualiai ryškiausio fragmento, kurio masė atitiko ~20 kDa, santykinį tankį. Baltymų dėmių analizė atlikta naudojantis ImageJ 1.53k programinę įrangą.

2.18. Malondialdehido nustatymas RPTEC ląstelėse

Malondialdehido nustatymas buvo atliekamas naudojant reagentų rinkinį Lipid Peroxidation (LPO) assay kit (Abbexa, Anglija). Visos procedūros buvo atliekamos pagal reagentų rinkinio gamintojo protokole pateiktas instrukcijas.

2.19. Statistinė duomenų analizė

Duomenų apdorojimas ir statistinė analizė buvo atliekama IBM SPSS Statistics 29.0 (IBM, JAV) bei Microsoft Excel (Microsoft 365 MSO, Microsoft, JAV) programinėmis įrangomis. Rezultatuose pateikiami eksperimentų vidurkiai su standartine paklaida. Lyginant dviejų nepriklausomų grupių vidurkius taikytas Stjudento t testas. Lyginant trijų ir daugiau nepriklausomų grupių vidurkius taikyta vienfaktorinė dispersinė analizė ANOVA su Fisher LSD kriterijumi. Jeigu duomenys neatitiko normalumo kriterijų (Shapiro-Wilk testas), buvo taikyti neparametriniai testai. Vidurkių skirtumai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

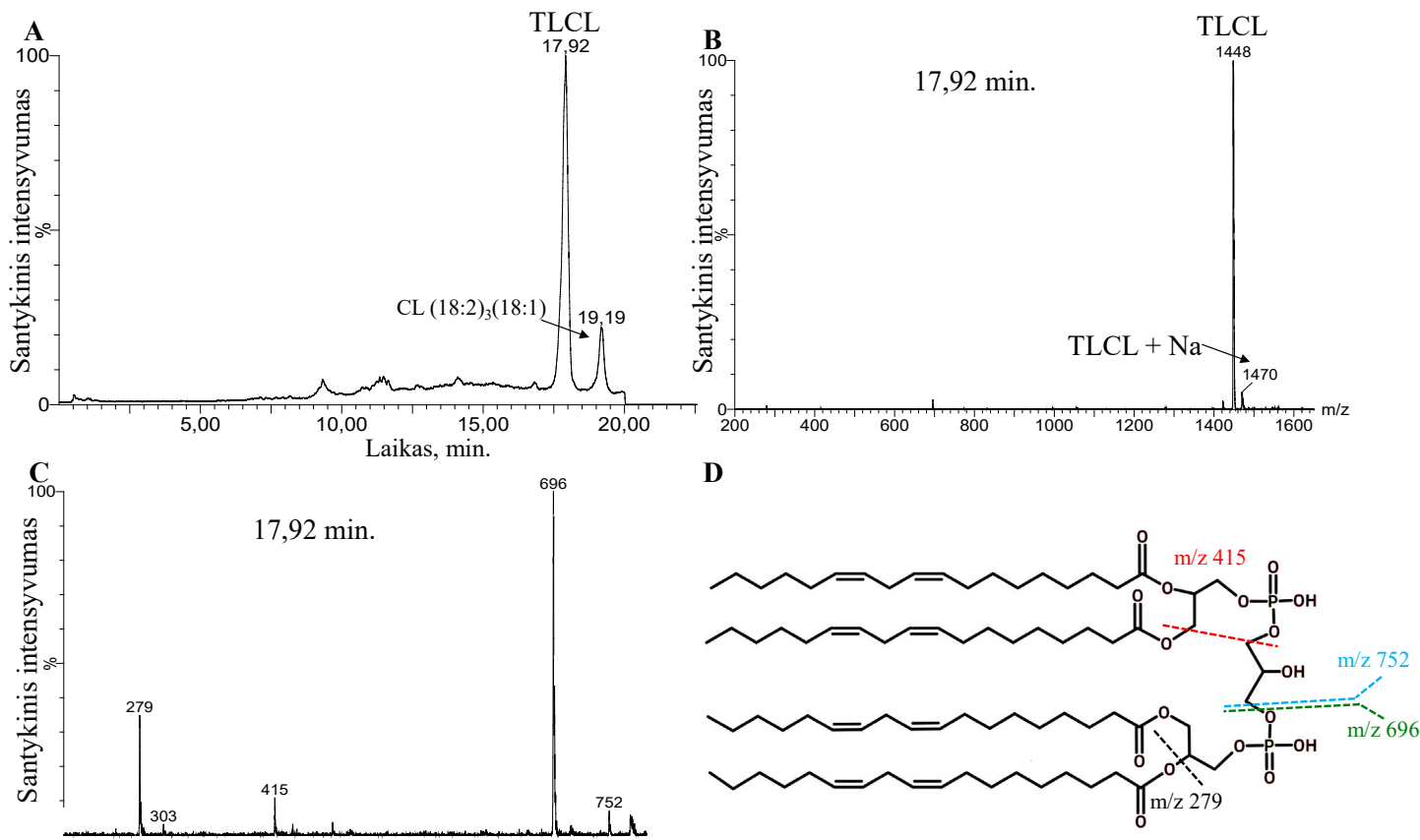
3. REZULTATAI

3.1. Kardiolino ir jo oksidacijos produktų identifikavimas chromatografijos-masių spektrometrijos metodu

3.1.1. Kardiolino standarto analizė

Kardiolino kiekį, struktūrą ir jų pokyčius galima nustatyti chromatografijos ir masių spektrometrijos metodais, tačiau efektyviai analizei reikalingi išgryninti standartiniai mėginiai, kurių komercinių pasiūlymų yra labai mažai. Literatūroje trūksta informacijos apie inkstų kardioliną, tačiau aprašoma, jog žinduolių inkstuose dominuoja tetralinoleil-kardiolinas (TLCL) [4,220], todėl pritaikėme ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-tandeminės masių spektrometrijos metodą (UPLC-MS/MS) kardiolino kokybiniam ir kiekybiniam identifikavimui pirmiausia panaudojant kardiolino standartą – liofilizuotą kardiolinų mišinį (natrio druskų pavidalu) iš jaučio širdies. Šiame mišinyje 90 proc. riebalų rūgščių sudaro linolo riebalų rūgštis (C18:2), 5 proc. oleino riebalų rūgštis (C18:1) ir 5 proc. kitos, gamintojo nenurodytos riebalų rūgštys, todėl didžiausią kardiolino dalį sudaro tetralinoleil-kardiolinas. Išanalizavus standartą UPLC-MS/MS metodu, buvo nustatytas TLCL sulaikymo laikas 17,92 min. (3.1.1.1 pav. A) pagal junginio masės/krūvio santykį (m/z 1448), kuris atitiko natūralią TLCL molekulinę masę (3.1.1.1 pav. B), nes jonizacijos metu, kardiolinas prarado tik vieną vandenilio atomą ($M-H^+$). Taip pat identifiкуotas didesnę masę turintis kardiolinas su trimis linolo ir viena oleino riebalų rūgštimi ($CL(18:2)_3(18:1)$), kurio chromatografinis sulaikymo laikas 19,19 min. (3.1.1.1 pav. A). Matoma, jog dėl savo didelės masės ir didelio hidrofobiškumo, kardiolino sulaikymo laikas yra didelis, t.y., kardiolinas sąveikauja su chromatografinės kolonėlės stacionaria faze (užpildu) ir yra išplaunamas iš kolonėlės sąlyginai vėlai, chromatografijos pabaigoje. Analizuojant masių spektrą ties TLCL chromatografinio sulaikymo laiku 17,92 min., buvo nustatyti ir tipiniai kardiolino fragmentai, susidarantys lipidų jonizacijos metu masių spektrometro jonizatoriuje – linolo riebalų rūgštis m/z 279, monoacilglicerolio fosfatas su linolo riebalų rūgštimi m/z 415, diacilglicerolio fosfatas su dviem linolo riebalų rūgštimis m/z 696, bei diacilglicerolio fosfatas su gliceroliu m/z 752. Tarp jų matomas ir dar vienas fragmentas su m/z 303, kuris atitinka linolo riebalų rūgštį su prijungtu natrio jonu. (3.1.1.1 pav. C). 3.1.1.1 paveiksle D yra pateikta schema, kurioje pavaizduota būdinga tetralinoleil-kardiolino fragmentacija bei fragmentų masės/krūvio santykiai. Verta paminėti, jog nepaisant kokia kardiolino riebalų rūgščių sudėtis, kardiolino molekulės fragmentacija išlieka vienoda, skiriasi tik fragmento masė priklausomai nuo

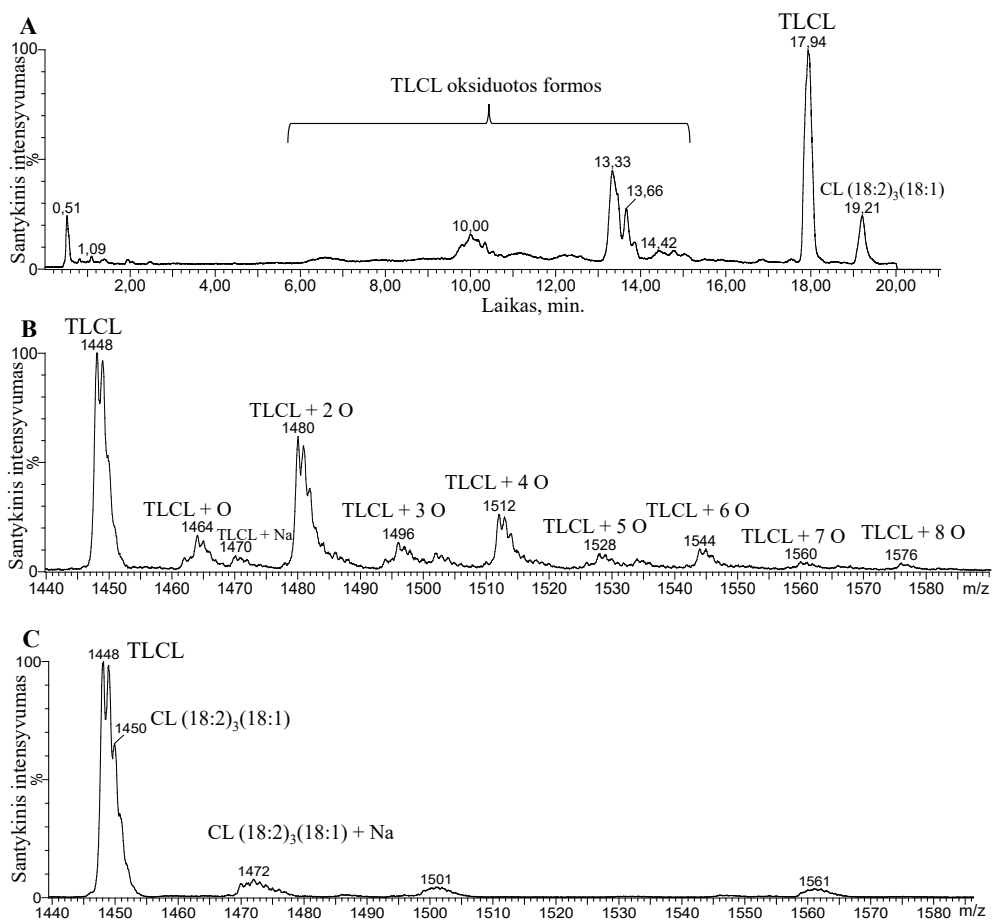
prijungtų riebalų rūgščių. Remiantis tokiais kardiolino sulaikymo laikais, masių spektrometro parodymais bei būdinga fragmentacija vėliau buvo ieškomi ir identifikuojami kiti kardiolinai biologiniuose mėginiuose.



3.1.1.1 pav. Kardiolino standarto analizės UPLC-MS/MS metodu tipinė chromatografinė kreivė (A), masių spektrai (B ir C) bei tetralinoleil-kardiolino fragmentacijos schema (D)

TLCL – tetralinoleil-kardiolipinas; m/z – masės ir krūvio santykis.

Siekiant išsiaiškinti galimus kardiolipino oksidacijos produktus biologiniuose mėginiuose, buvo pirmiausia atlikta kardiolipino standarto oksidacija ir išanalizuoti produktai UPLC-MS/MS metodu. Kardiolipino standarto oksidacija buvo vykdoma panaudojant vandenilio peroksidą ir citochromą C, norint imituoti vieną iš mitochondrijose vykstančių kardiolipino oksidacijos kelių, kuomet, dėl stiprios citochromo C sąveikos su kardiolipinu, citochromas C įgauna peroksidazinį aktyvumą, ir sukelia kardiolipino peroksidaciją [221]. Atlikus oksiduoto kardiolipino standarto chromatografiją ir masių spektrometriją buvo pastebėta, jog chromatogramoje atsirado naujų chromatografinių smailių (3.1.1.2 pav. A, lyginant su 3.1.1.1 pav. A), o masių spektre - naujų masių, kurios buvo didesnės nei TLCL m/z 1448 (3.1.1.2 pav. B, palyginimui neoksiduoto kardiolipino standarto masių spektras 3.1.1.2 pav. C). Masių kartotiniai buvo po 16 atominių vienetų, kas atitinka deguonies atomo masę, todėl buvo daryta prielaida, jog šios masės yra oksiduoti TLCL su papildomais deguonies atomais. Buvo identifikuotos aštuonios TLCL oksiduotos formos, papildomai prisijungusios nuo vieno iki aštuonių deguonies atomų (3.1.1.2 pav. B). Pastebėta, jog oksiduotų kardiolipino formų chromatografinis sulaikymo laikas yra mažesnis nei neoksiduoto kardiolipino – kuo daugiau papildomų deguonies atomų, tuo mažesnis sulaikymo laikas. Manoma, jog taip yra dėl didėjančio hidrofiliškumo, todėl labiau oksiduotas kardiolipinas mažiau sąveikauja su hidrofobine chromatografinės kolonėlės stacionaria faze (užpildu) ir chromatografijos metu yra išplaunamas greičiau.



3.1.1.2 pav. Oksiduoto kardiolino standarto analizės UPLC-MS/MS metodu tipinė chromatografinė kreivė (A) ir masių spektras, rodomos masės ties m/z nuo 1440 iki 1580 (B), neoksiduoto kardiolino standarto masių spektras, rodomos masės ties m/z nuo 1440 iki 1580 (C)

Kardiolino standarto oksiduotų formų patvirtinimui buvo išanalizuota jų fragmentacija. Kardiolino fragmentų analizė atlikta remiantis literatūroje pateikiama oksiduotam kardiolinui būdinga fragmentacija [187,222]. Buvo nustatyti linolo riebalų rūgščių ir diacilglicerolio fosfato fragmentų, su papildomais deguonies atomais, masės/krūvio santykiai, taip pat pastebėta, kad kai kurios oksiduotos riebalų rūgštys ar diacilglicerolio fosfatai buvo dehidratuojami masių spektrometrijos metu ($m/z - 18$), kas yra būdinga lipidų hidroperoksidsams. TLCL su vienu papildomu deguonies atomu (m/z 1464) chromatografinis sulaikymo laikas buvo apie 15,21 min. Nustatyti būdingi fragmentai – m/z 279 (linolo riebalų rūgštis), m/z 295 (oksiduota linolo rie-

balų rūgštis su papildomu vienu deguonies atomu, m/z 279 + 16) bei m/z 712 (diacilglicerolio fosfatas su viena oksiduota linolo riebalų rūgštimi, m/z 696 + 16). Apie 13,30–14,00 min. identifikuotas TLCL su papildomai prisijungusiais dviem deguonies atomais (m/z 1480), kurio būdingi fragmentai masių spektre buvo m/z 311 (linolo riebalų rūgšties hidroperoksidas, m/z 279 + 32), taip pat m/z 293, tai yra dehidratuotas linolo riebalų rūgšties hidroperoksidas (m/z 311 – 18). Identifikuotas ir diacilglicerolio fosfato hidroperoksidas m/z 728 (m/z 696 + 32) bei dehidratuota šio fragmento forma su m/z 710 (m/z 728 – 18). Buvo pastebėtas ir didesnę masę turintis fragmentas m/z 1392, kuris buvo siejamas su TLCL hidroperoksidu, nuo kurio vienos riebalų rūgšties atskilo penkių anglies atomų fragmentas ir vienas deguonis (m/z 1480 – 88). Tai parodo, jog TLCL peroksidacija įvyko ties tryliktu linolo riebalų rūgšties anglies atomu. Oksiduoto TLCL su papildomais trimis deguonies atomais (m/z 1496) chromatografinis sulaikymo laikas buvo apie 12,20 min., stebėti fragmentai masių spektre – linolo rūgštis su hidroksi- ir hidroperoksigrupėmis m/z 326 (m/z 279 + 48), diacilglicerolio fosfatas m/z 744 (m/z 696 + 48) bei dehidratuota jo forma m/z 726 (m/z 744 – 18). Apie 10,18 min. identifikuotas TLCL su papildomais keturiais deguonies atomais m/z 1512, taip pat būdingi fragmentai – linolo rūgšties hidroperoksidas m/z 311, linolo rūgšties hidroperoksido dehidratuota forma m/z 293, diacilglicerolio fosfato su papildomais vienu ir dviem deguonies atomais, atitinkamai m/z 712 ir 728. Pastebėtas ir didesnis fragmentas m/z 1424, kuris, tikėtina, yra praradęs penkių anglies ir vieno deguonies atomų fragmentą (m/z 1512 – 88), vėl parodantis, kad peroksidacija vyko ties tryliktu linolo rūgšties deguonies atomu. Oksiduoto TLCL su penkiais papildomais deguonies atomais chromatografinis sulaikymo laikas buvo apie 8,87 min., būdingi fragmentai – m/z 293, 295, 311, parodantys hidroksi- ir hidroperoksilinolo riebalų rūgštis. Didesni fragmentai m/z 728 ir 744 parodė diacilglicerolio fosfatus su papildomais dviem ir trimis deguonies atomais. Fragmentai m/z 344 ir 307 parodė linolo rūgštį su dviem hidroperoksilo grupėmis ir dvigubai dehidratuotą jo formą (m/z 344 – 18 – 18). TLCL oksiduoto su papildomais šešiais deguonies atomais (m/z 1544) sulaikymo laikas buvo apie 6,80 min. Ryškiausiai atskiriami fragmentai masių spektre – m/z 293, 295, 311, 327 ir 344, kurie atitinka linolo rūgšties hidroksidus, hidroksiperoksidus ir dihidroperoksidus. TLCL oksiduoto su papildomais septyniais deguonies atomais (m/z 1560) sulaikymo laikas buvo 5,30 min., o stebėti fragmentai – m/z 293 ir 311, parodantys linolo rūgšties hidroperoksidas, taip pat m/z 712 ir 728 bei m/z 742, kuris atitiko dehidratuotą diacilglicerolio fosfatą su dviem hidroperoksido grupėmis (m/z 760 – 18). TLCL oksiduoto su aštuoniais papildomais deguonies atomais (m/z 1576) sulaikymo laikas buvo 4,30. Masių spektrai parodė tipinius linolo rūgšties hidroperoksidas (m/z 293 ir 311), taip pat hidroksidus m/z 295 ir linolo rūgštį su

hidroperoksido ir hidroksido grupę (m/z 328). Didesni fragmentai buvo panašūs į anksčiau aprašytus, atitinkančius diacilglicerolio fosfatus su hidroksi-, hidroperoksi- ir net dviem hidroperoksido grupėmis (m/z 712, 728, 760 ir 742 (dehidratuota forma)). Vėl pastebėtas didesnis fragmentas m/z 1488, kuris atitinka penkių anglies atomų ir deguonies fragmento atskėlimą ($1576 - 88$), kaip aprašyta anksčiau. Fragmentų įvairovė šiuose masių spektruose parodo, jog TLCL oksidacijos metu susidaro įvairūs izomerai. Kuo didesnis oksidacijos laipsnis (daugiau papildomų deguonies atomų), tuo daugiau deguonies atomų pasiskirstymo linolo rūgštyse variantų matoma. Taip pat pastebėta, jog labiau oksiduotų TLCL formų (su 5-8 deguonies atomais) masių spektruose buvo stebimas mažas signalo ir triukšmo santykis, todėl didelis kiekis nespecifinių masių galėjo daryti įtaką bendrai šių oksidacijos produktų struktūros interpretacijai. Visi šie rezultatai parodo, jog kardiopolino standarto oksidacijos metu susidaro daugybė TLCL oksiduotų formų, tarp kurių didžiausi santykinio signalo intensyvumai masių spektre yra TLCL su papildomais vienu, dviem ir keturiais deguonies atomais (3.1.1.2 pav. B). Remiantis oksiduotų TLCL chromatografiniais sulaikymo laikais buvo apskaičiuoti sulaikymo koeficientai (santykis tarp TLCL oksiduotos ir neoksiduotos formos sulaikymo laikų), pagal kuriuos vėliau buvo nustatomi TLCL oksiduotų formų sulaikymo laikai biologiniuose mėginiuose (3.1.1.1 lentelė).

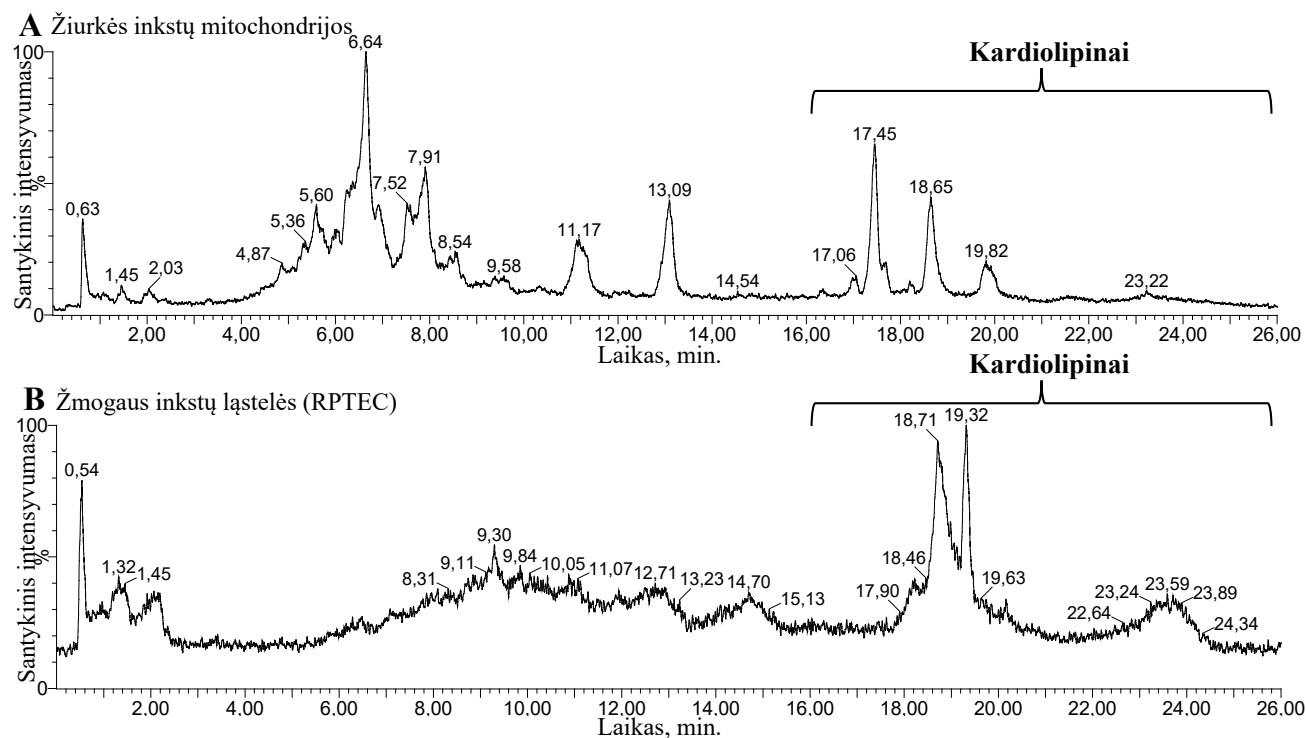
3.1.1.1 lentelė. Oksiduotų TLCL formos, jų masės ir krūvio santykiai bei sulaikymo koeficientai

TLCL oksiduotos formos	TLCL oksiduotos formos masė (m/z)	Apskaičiuotas sulaikymo koeficientas
TLCL + 1 O	1464	0,837
TLCL + 2 O	1480	0,748
TLCL + 3 O	1496	0,684
TLCL + 4 O	1512	0,564
TLCL + 5 O	1528	0,507
TLCL + 6 O	1544	0,380
TLCL + 7 O	1560	0,315
TLCL + 8 O	1576	0,261

3.1.2. Kardiopolino kokybinė analizė žiurkės inkstų mitochondrijose ir žmogaus inkstų ląstelėse

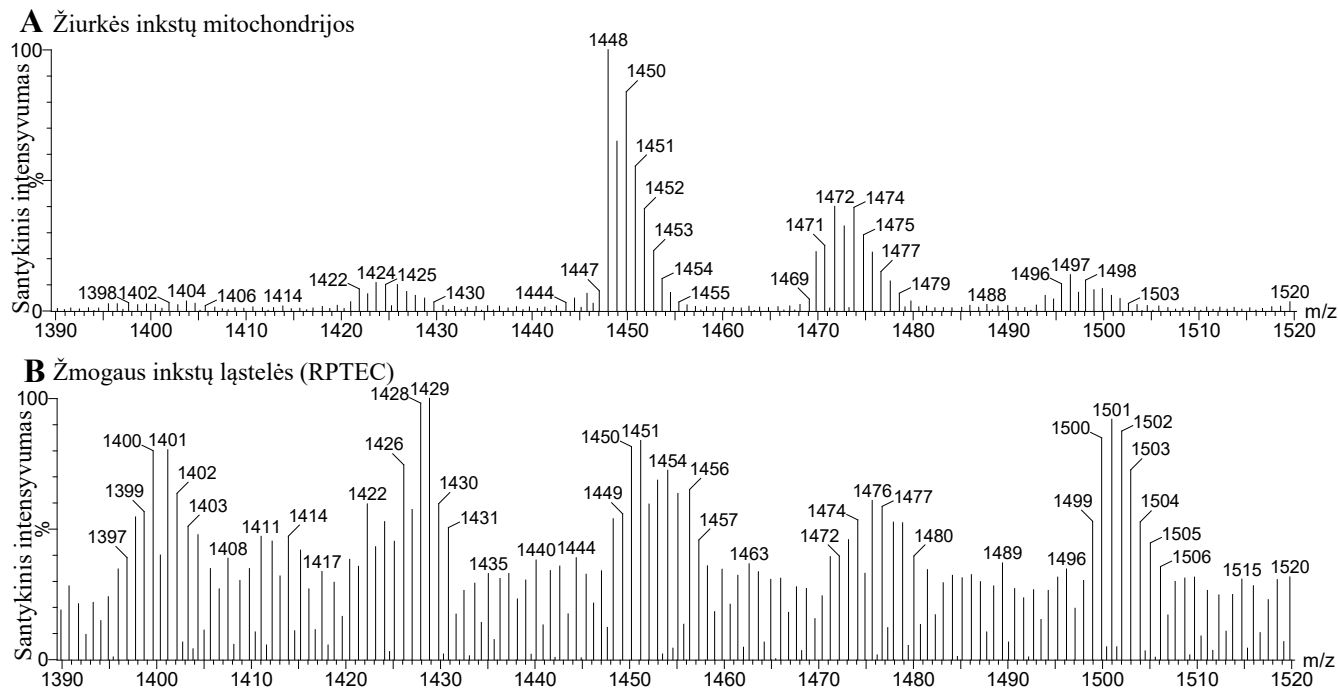
Atlikus kardiopolino standarto analizę UPLC-MS/MS metodu ir nustačius chromatografinius sulaikymo laikus, koeficientus bei kardiopolinui būdingus fragmentus toliau analizavome kardiopolino įvairovę biologiniuose mėginiuose – žiurkės inkstų mitochondrijose bei žmogaus inkstų ląstelėse RPTEC

kultūrose. Tam, kad atliktume tokią analizę, pirmiausia buvo išskirtos ir sukoncentruotos lipidų frakcijos iš šių biologinių mėginių, kurios buvo tiesiogiai naudojamos analizei UPLC-MS/MS. Kaip ir standartinio kardiolidinų mišinio, taip ir žiurkės inkstų mitochondrijų bei žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolidinai chromatografijos metu buvo identifikuoti vėliausiai tarp visų lipidų. Jų chromatografiniai sulaikymo laikai prasidėjo maždaug nuo 16 min. ir tęsėsi iki 26 min. (3.1.2.1 pav. A ir B).



3.1.2.1 pav. Tipinės chromatografinės kreivės gaunamos analizuojant lipidų frakcijas išskirtas iš žiurkės inkstų mitochondrijų (A) ir žmogaus inkstų ląstelių kultūros (RPTEC) (B)

Masių spektrometrijos analizė šiame chromatografinio sulaikymo laiko intervale parodė individualius kardiolipinus, kurių masės siekė nuo 1400 m/z iki 1500 m/z. Masių spektruose išsiskyrė tam tikros masių grupės, o jų ir pavienių individualių kardiolipinų masių santykiniai intensyvumai skyrėsi tarp žiurkės inkstų mitochondrijų ir žmogaus inkstų ląstelių. Tarp žiurkės inkstų mitochondrijų individualių kardiolipinų didžiausią dalį sudarė TLCL, bei kiti kardiolipinai, kurių riebalų rūgščių didžiausią dalį sudarė linolo ir oleino riebalų rūgštys (matomas intensyviausias signalas). Masių spektre matomos kelios išsiskiriančios grupės, kurių centrinės/didžiausią intensyvumą turinčios masės yra m/z 1424, 1448, 1474, 1498 (3.1.2.2 pav. A). Tuo tarpu žmogaus inkstų RPTEC ląstelių individualių kardiolipinų tarpe TLCL masė m/z 1448 masių spektre neišsiskiria, ir matoma jog masių grupių signalų intensyvumai yra beveik vienodi, tarpusavyje neišsiskiria. Pagal santykinį signalo intensyvumą, žmogaus inkstų ląstelėse vyrauja kardiolipinas su m/z 1428. Masių spektre matomos masių grupės, kurių centrinės/didžiausią intensyvumą turinčios masės yra m/z 1400, 1428, 1450, 1476, 1502 (3.1.2.2 pav. B).



3.1.2.2 pav. Tipiniai masių spektrai gaunami analizuojant lipidų frakcijas išskirtas iš žiurkės inkstų mitochondrijų (A) ir žmogaus inkstų ląstelių kultūros (RPTEC) (B).

Rodomos masės m/z 1390 – 1520; chromatografinio sulaikymo laiko intervale nuo 16 iki 26 min.

Vėliau buvo atliekama detalesnė šių kardiolipinų analizė – buvo stebima masių fragmentacija, analizuojamos sąsajos tarp atskilusių riebalų rūgščių bei diacilglicerolio fosfato fragmentų ir pradinių masių tam, kad būtų nustatyta preliminarini individualių kardiolipinų riebalų rūgščių sudėtis. Remiantis chromatografijos ir masių spektrometrijos parodymais buvo iš viso identifikuota 16 individualių kardiolipinų ir identifikuotos preliminarios šių kardiolipinų riebalų rūgščių sudėtys. Taip pat buvo apskaičiuoti šių kardiolipinų sulaikymo koeficientai (kardiolipino chromatografinis sulaikymo laikas padalinamas iš vidinio standarto sulaikymo laiko) (3.1.2.1 lentelė).

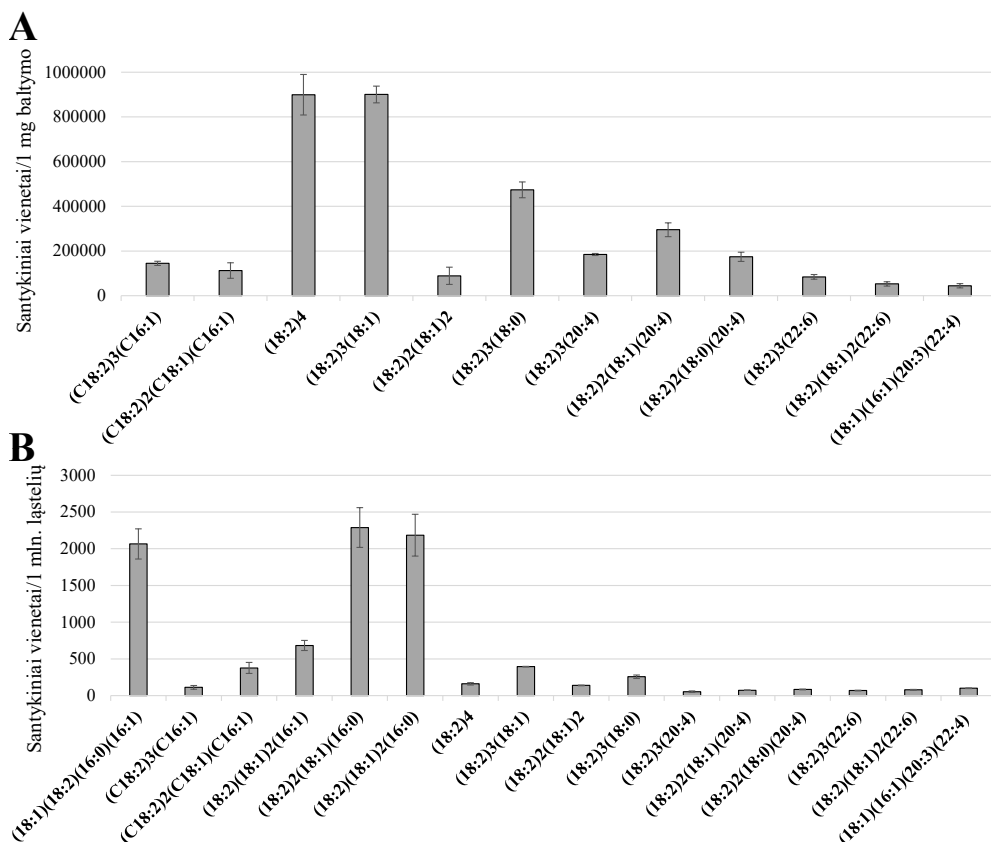
3.1.2.1 lentelė. UPLC-MS/MS metodu išanalizuoti kardiolipinai žiurkės inkstų mitochondrijų ir žmogaus inkstų ląstelių lipidų frakcijose

Kardiolipino masė, m/z	Preliminari kardiolipino riebalų rūgščių sudėtis	Diacilglicerolio fosfato fragmentai, m/z	Riebalų rūgščių fragmentai, m/z	Sulaikymo koeficientas
1400	(18:2)(18:1)(16:0)(16:1)	671	281, 253	1,16
1422	(18:2) ₃ (16:1)	695	279, 253	0,99
1424	(18:2) ₂ (18:1)(16:1)	669, 671, 697	279, 253	1,06
1426	(18:2)(18:1) ₂ (16:1)	671, 697, 728	253	1,15
1426	(18:2) ₂ (18:1)(16:0)	671, 695	279, 255	1,16
1428	(18:2)(18:1) ₂ (16:0)	697	281, 279, 255	1,23
1448	(18:2) ₄	695	279	0,995
1450	(18:2) ₃ (18:1)	697	279, 281	1,08
1452	(18:2) ₂ (18:1) ₂	695	281, 279	0,998
1452	(18:2) ₃ (18:0)	695, 699	283, 279	1,07
1472	(18:2) ₃ (20:4)	695, 719	279, 303	0,92
1474	(18:2) ₂ (18:1)(20:4)	719	279, 281, 303	0,98
1476	(18:2) ₂ (18:0)(20:4)	723, 699, 695	279, 283, 303	0,981
1496	(18:2) ₃ (22:6)	695	279, 327	0,98
1500	(18:2)(18:1) ₂ (22:6)	697	279, 281, 327	1,057
1502	(18:1)(16:1)(20:3)(22:4)	721, 723	281, 305, 331	1,08

Pateiktos kardiolipinų masės, būdingi fragmentai, preliminarios riebalų rūgščių sudėtys ir sulaikymo koeficientai.

Rezultatai parodė, jog daugelyje kardiolipinų dominavo linolo riebalų rūgštis. Taip pat, kardiolipinų sudėtyse nemažai nustatyta ir oleino, kiek mažiau palmitino (C16:0) ir palmitoleino (C16:1) riebalų rūgščių. Nustatyta ir kardiolipinų su ilgos grandinės polinesočiosiomis riebalų rūgštimis, tokio-
mis, kaip arachidono (C20:4), dokozaheksanoinė (C22:6) ar dokozaetetranoi-
nė rūgštis (C22:4). Atlikus kiekybinę analizę buvo nustatyta, jog žiurkės ink-
stų mitochondrijose dominuoja TLCL kardiolipinas ((18:2)₄), taip pat nemažai

aptinkama kardioliipinų CL (18:2)₃(18:1), CL (18:2)₃(18:0), CL (18:2)₂(18:1) (20:4). Mažiausiai nustatyta kardioliipinų turinčių ilgos grandinės riebalų rūgščių – CL (18:2)₃(22:6), CL (18:2)(18:1)₂(22:6), CL (18:1)(16:1) (20:3) (22:6) (3.1.2.3 pav. A). Tuo tarpu žmogaus inkstų ląstelėse dominavo kardioliipinai su kitomis riebalų rūgščių sudėtimis – CL (18:2)₂(18:1)(16:0), CL (18:2)(18:1)₂(16:0) bei CL (18:1)(18:2)(16:0)(16:1). Šių kardioliipinų žiurkės inkstų mitochondrijose beveik nebuvo įmanoma nustatyti kiekybiškai. Žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse TLCL buvo labai mažai, lyginant su kitais kardioliipiniais. Kaip ir žiurkės inkstų mitochondrijose, RPTEC ląstelėse kardioliipinų su ilgos grandinės riebalų rūgštimis buvo taip pat labai mažai (3.1.2.3 pav. B). Remiantis gautais duomenimis apie žiurkės inkstų ir žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardioliipinus, toliau buvo analizuojami šių kardioliipinų kiekybiniai pokyčiai po išemijos ir reperfuzijos žiurkės inkstų mitochondrijose, ir po hipoksijos ir reoksigenacijos žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse.



3.1.2.3 pav. Skirtingų kardioliipinų santykiniai kiekiai žiurkės inkstų mitochondrijose (A) ir žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse (B)

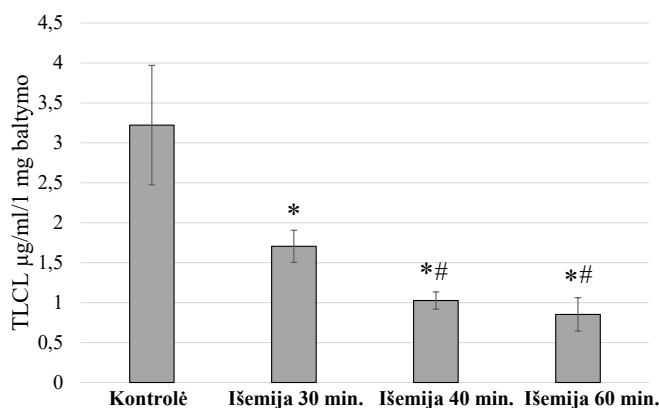
Eksperimentų skaičius n = 3 (A); n = 4 (B).

3.2. Išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis žiurkės inkstų mitochondrijų kardioliipinui

Išemijos ir reperfuzijos metu organuose sukeliamas oksidacinis stresas – aktyvių deguonies junginių sintezės suintensyvėjimas, dėl kurio oksiduojami ląstelių lipidai, baltymai bei nukleorūgštys [14]. Mitochondrijų elektronų pernašos grandinė yra vienas iš didžiausių aktyvių deguonies junginių šaltinių. Dėl kardioliipino lokalizacijos mitochondrijose ir glaudžios sąveikos su šios sistemos kompleksais, kardioliipinas tampa vienas iš pirmųjų taikinių oksidacijai, kuri lemia oksiduoto kardioliipino hidrolizę, disociaciją nuo mitochondrijų baltymų bei mitochondrijų ir ląstelės funkcijų sutrikimus vedančius į ląstelių žūtį [20].

3.2.1. Išemijos *in vivo* poveikis žiurkės inkstų kardioliipino ir TLCL oksidacijos produktų kiekiui

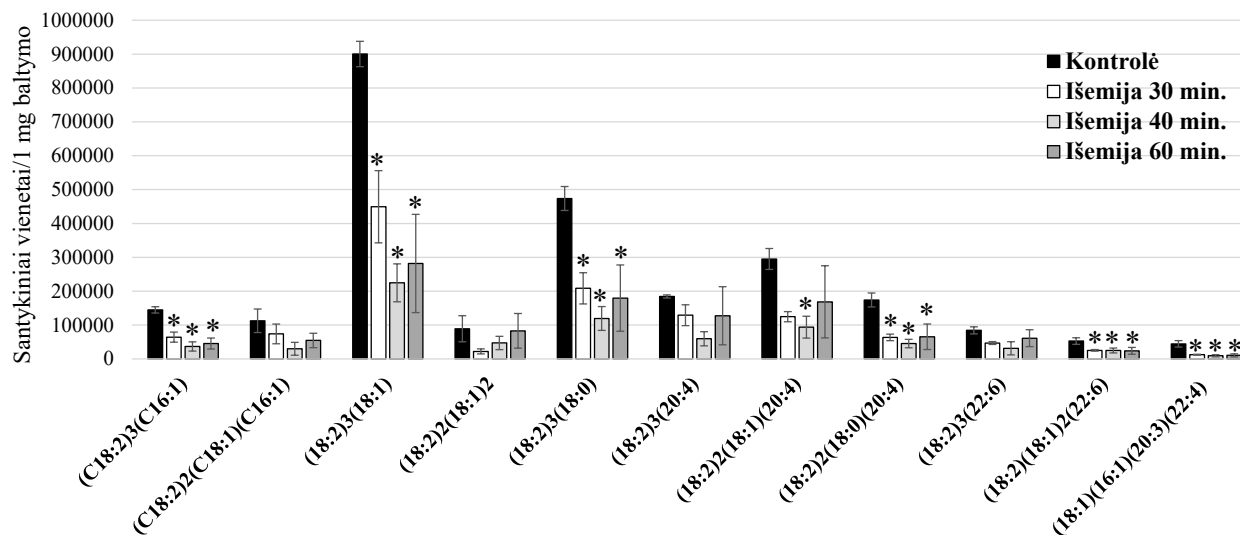
Pritaikant žiurkės inkstų išemijos/reperfuzijos *in vivo* modelį pirmiausia buvo išanalizuotas 30, 40 ir 60 minučių išemijos poveikis žiurkės inkstų kardioliipinui. Buvo nustatyta, kad jau po 30 min. išemijos dominuojančio kardioliipino TLCL kiekis sumažėjo 47 proc. ($p < 0,05$), o po 40 ir 60 min. kiekis toliau mažėjo atitinkamai 68 proc. ir 74 proc., lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). TLCL kiekis po 60 min. išemijos buvo reikšmingai mažesnis, lyginant ir su 30 bei 40 min. išemijos grupėmis, atitinkamai 51 proc. ir 40 proc. ($p < 0,05$) (3.2.1.1 pav.).



3.2.1.1 pav. Išemijos *in vivo* poveikis dominuojančio kardioliipino TLCL kiekiui žiurkės inkstų mitochondrijose

Vienoje grupėje atlikti 3–7 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su išemija 30 min.

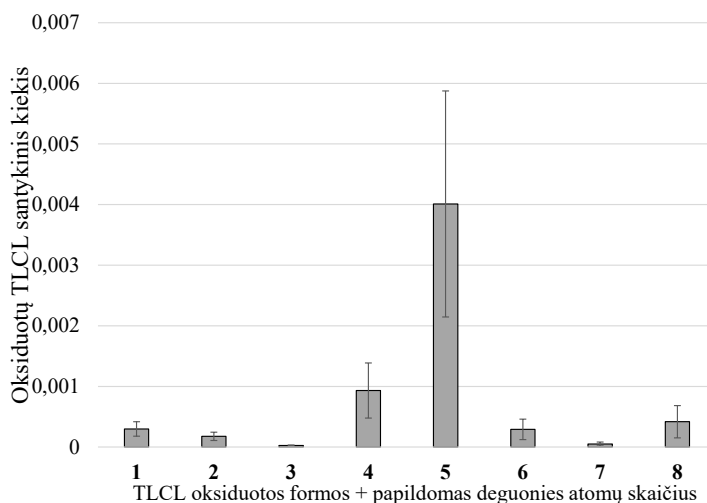
Analizuojant kitus kardiolipinus, buvo nustatyta, jog po 30 min. išemijos, šešių kardiolipinų santykiniai kiekiai sumažėjo vidutiniškai 58 proc. ($p < 0,05$), tarp kurių labiausiai sumažėjo kardiolipino CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:4), 72 % mažiau, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Po 40 min. išemijos septynių kardiolipinų santykinis kiekis buvo vidutiniškai 71 proc. mažiau, lyginant su kontrole ($p < 0,05$), o po 60 min. šešių kardiolipinų santykiniai kiekiai buvo vidutiniškai 65 proc. sumažėję, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Tarp šių šešių formų labiausiai buvo sumažėję to paties CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:4), jo buvo 76 proc. mažiau, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Taip pat buvo pastebėta tendencija, jog po 60 min. daugelio kardiolipinų kiekiai nežymiai padidėjo, lyginant su 40 min. išemijos grupe (3.2.1.2 pav.).



3.2.1.2 pav. Išemijos in vivo poveikis skirtingų kardiolipinų (kardiolipinų su skirtinga riebalų rūgščių sudėtimi) santykiniais kiekiais žiurkės inkstų mitochondrijose

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

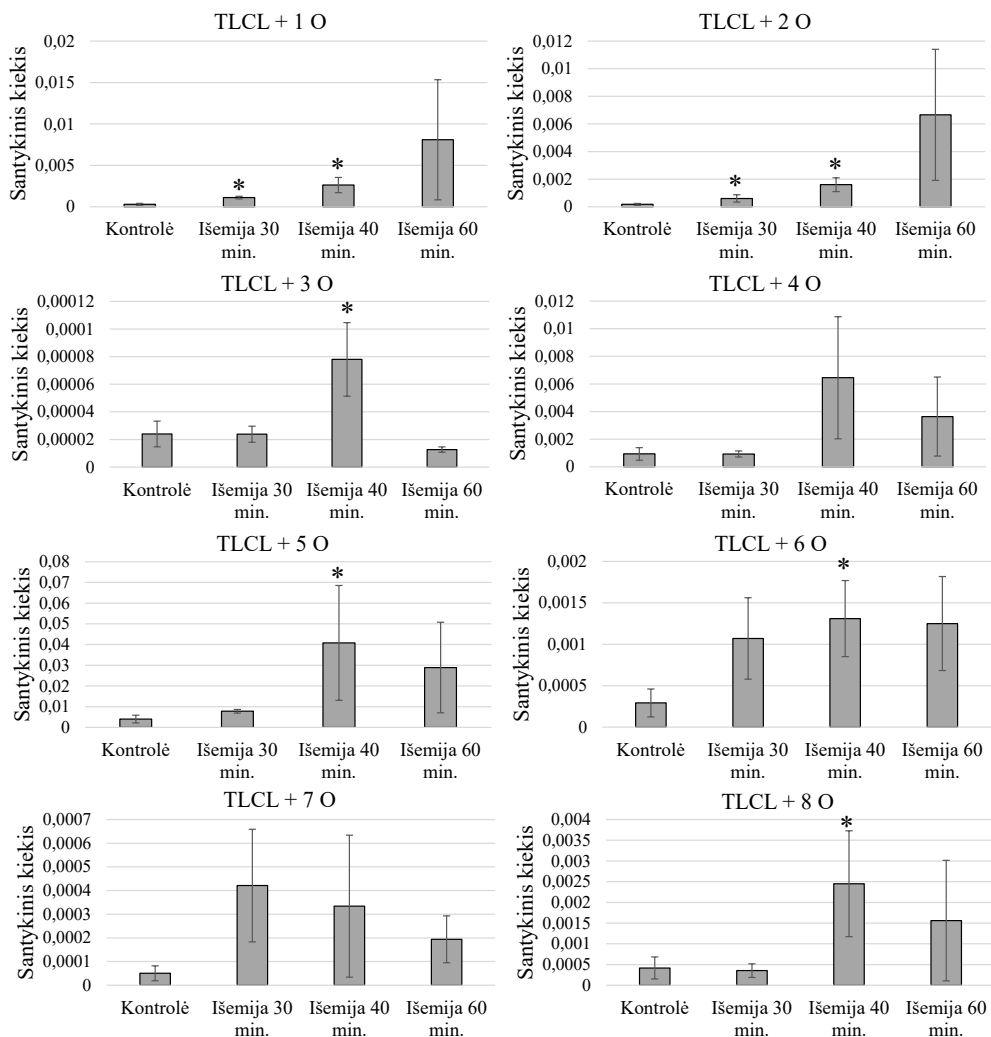
Toliau buvo analizuojami TLCL oksidacijos produktai remiantis kardiolipino standarto oksidacijos analizės rezultatais. Atlikus kontrolinių žiurkės inkstų mitochondrijų lipidų analizę, buvo nustatytos tokios pačios TLCL oksiduotos formos, kurių struktūroje buvo nuo vieno iki aštuonių papildomų deguonies atomų. Tarp šių formų didžiausią kiekį sudarė TLCL, prisijungęs penkis papildomus deguonies atomus ir beveik nebuvo aptikta TLCL su papildomais trimis deguonies atomais (3.2.1.3 pav.)



3.2.1.3 pav. Kontrolinių žiurkės inkstų mitochondrijų TLCL oksiduotų formų santykiniai kiekiai

Pateikiamos aštuonios TLCL oksiduotos formos, skaičiumi pažymėtas papildomas deguonies atomų kiekis prisijungęs prie TLCL. Grupėje atlikti 7 nepriklausomi pakartojimai.

Vėliau buvo įvertinti visų aštuonių TLCL oksiduotų formų, kurių struktūroje buvo nuo vieno iki aštuonių papildomų deguonies atomų, santykiniai kiekių pokyčiai po 30–60 minučių inkstų išemijos *in vivo* (3.2.1.4 pav.). Nustatyta, kad visų oksiduotų formų kiekiai turėjo tendenciją didėti išemijos metu – vidutiniškai padidėjo 3 kartus po 30 minučių išemijos bei 6,9 karto po 40 minučių išemijos. Po 60 minučių išemijos buvo nustatyta, kad TLCL su papildomai prisijungusiais vienu ir dviem deguonies atomais santykiniai kiekiai buvo atitinkamai 27 ir 38 kartus didesni, lyginant su kontroline grupe, tačiau tai nebuvo statistiškai reikšmingas skirtumas. Taip pat buvo pastebėta tendencija, kad visų kitų TLCL oksiduotų formų (papildomai prisijungusių nuo trijų iki aštuonių deguonies atomų) santykiniai kiekiai mažėjo po 60 minučių išemijos, lyginant su 40 minučių išemija.



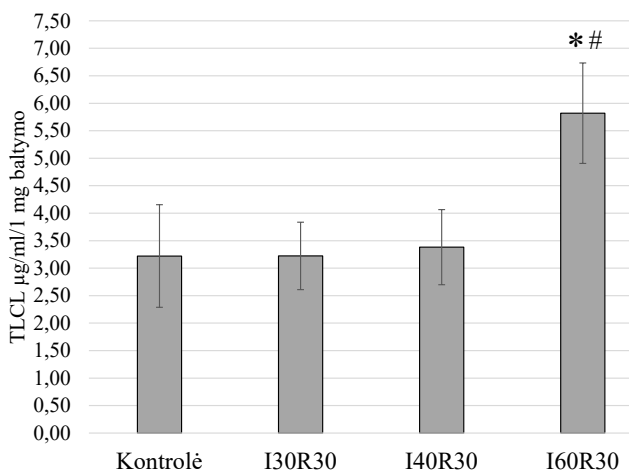
3.2.1.4 pav. Išemijos in vivo poveikis oksiduotų TLCL formų, papildomai prisijungusių nuo vieno iki aštuonių deguonies atomų, santykiniams kiekiams žiurkės inkstų mitochondrijose

TLCL + deguonies atomų kiekis; Vienoje grupėje atlikti 3–7 nepriklausomi pakartojimai; * statistškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

Šie rezultatai parodo, jog jau pačios išemijos metu žiurkių inkstuose vyksta kardiolino peroksidacija, suformuojant keletą oksiduotų TLCL produktų bei mažinant individualių neoksiduotų kardiolino kiekius.

3.2.2. Išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis žiurkės inkstų kardiolino ir TLCL oksidacijos produktų kiekiui

Įvertinus kardiolino kokybinius ir kiekybinius pokyčius žiurkės inkstuose po 30–60 minučių išemijos *in vivo*, toliau buvo atliekama kardiolino analizė po tokios pačios trukmės inkstų išemijos ir 30 minučių reperfuzijos. Įvertinus TLCL kiekio pokyčius žiurkės inkstų mitochondrijose po išemijos/reperfuzijos *in vivo* buvo nustatyta, kad 30 ir 40 minučių išemija su 30 minučių reperfuzija neturėjo poveikio, tačiau po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos TLCL kiekis reikšmingai išaugo 1,8 karto, lyginant su kontroline ir išemijos 30 min./reperfuzijos 30 min. grupe ($p < 0,05$) (3.2.2.1 pav.).

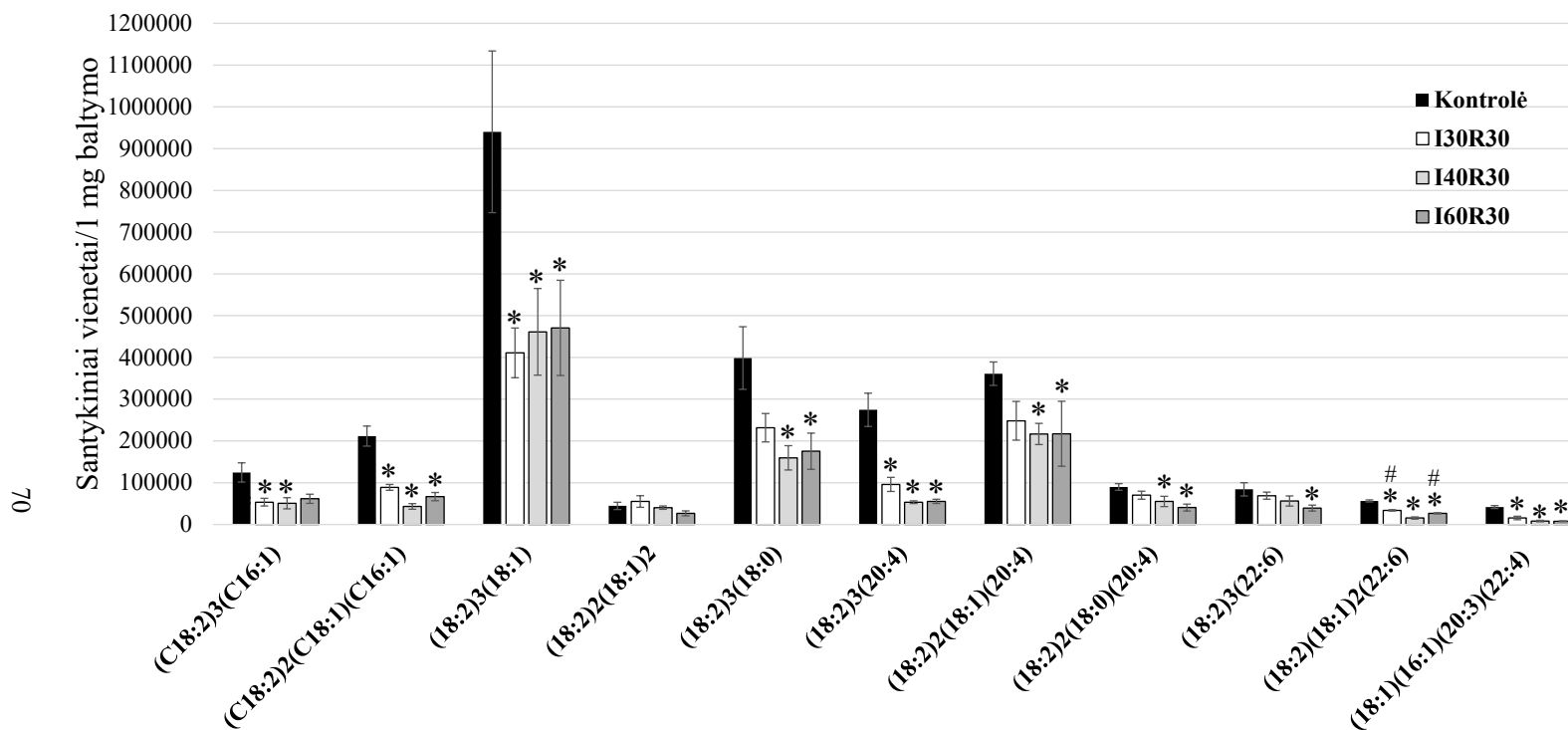


3.2.2.1 pav. Išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis dominuojančio kardiolino TLCL kiekiui žiurkės inkstų mitochondrijose

Vienoje grupėje atlikti 3-5 nepriklausomi pakartojimai; I30R30 – 30 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I40R30 – 40 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I60R30 – 60 min. išemija su 30 min. reperfuzija; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su I30R30 ($p < 0,05$).

Vėliau buvo išanalizuoti vienuolikos kitų kardiolinų kiekybiniai pokyčiai ir nustatyta, kad jau po 30 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos šešių iš vienuolikos kardiolinų santykiniai kiekiai sumažėjo vidutiniškai 57 proc. ($p < 0,05$) (3.2.2.2 pav.). Labiausiai sumažėjo kardiolinų, kurių sudėtyje buvo ilgos grandinės polinesočiųjų riebalų rūgščių - CL(18:2)₃(20:4) ir CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:6), jų kiekiai buvo atitinkamai mažesni 65 proc. ir 63 proc., lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Po 40 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos devynių kardiolinų santykiniai kiekiai buvo vidutiniškai 62 proc. mažesni, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Vėlgi, labiausiai

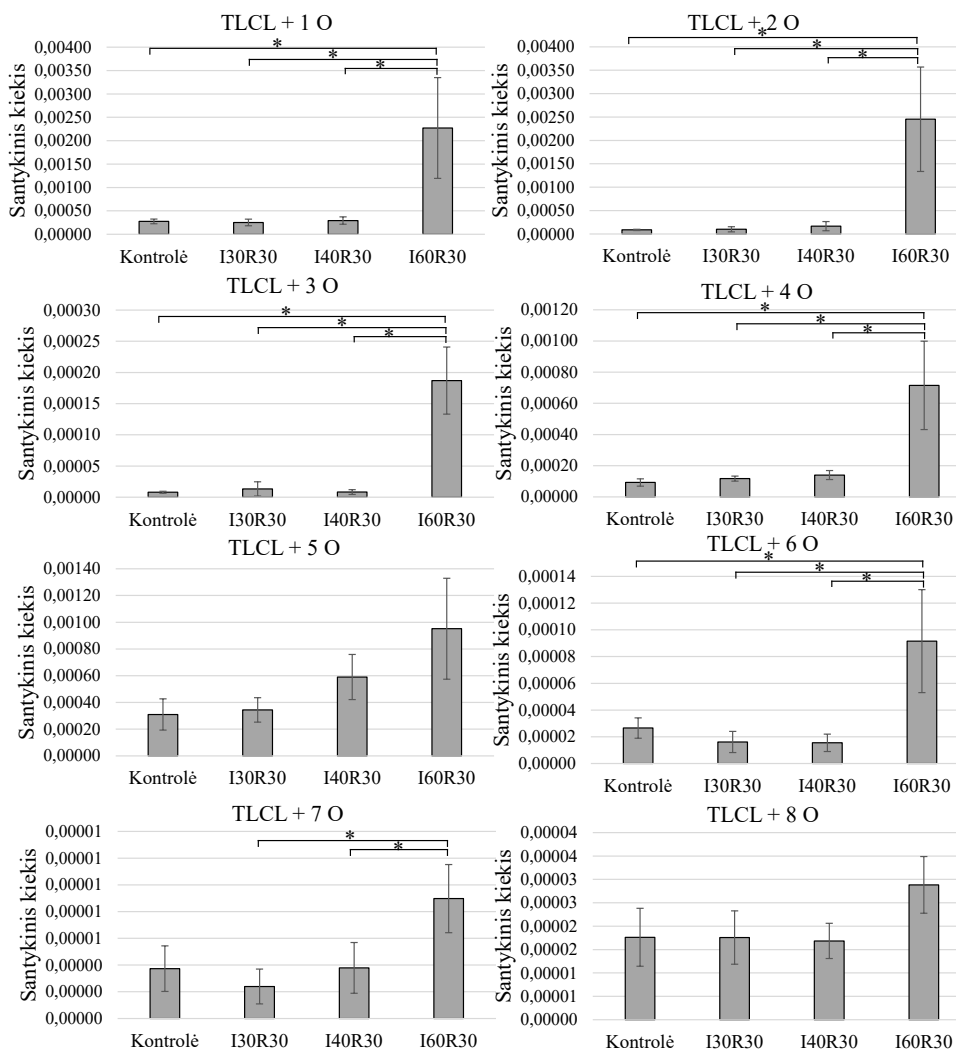
buvo sumažėję tų pačių kardiolipinų CL (18:2)₃(20:4) ir CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:6), kurių atitinkamai buvo 81 proc. ir 80 proc. mažiau, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Panašių pokyčių buvo stebima po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos – dešimties kardiolipinų santykiniai kiekiai buvo vidutiniškai 59 proc. mažesni už kontrolę. Labiausiai po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos sumažėjo CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:4), kurio santykinis kiekis buvo net 81 proc. mažesnis, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Pastebėta tendencija, kad daugelio kardiolipinų santykiniai kiekiai po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos daugiau nemažėjo ir kaip tik nežymiai didėjo, lyginant su 40 minučių išemija ir 30 minučių reperfuzija.



3.2.2.2 pav. Išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis skirtingų kardiolipinų (kardiolipinų su skirtinga riebalų rūgščių sudėtimi) santykiniais kiekiais žiurkės inkstų mitochondrijose

Vienoje grupėje atlikti 3-6 nepriklausomi pakartojimai; I30R30 – 30 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I40R30 – 40 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I60R30 – 60 min. išemija su 30 min. reperfuzija; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su I40R30 ($p < 0,05$).

Galiausiai buvo išanalizuoti dominuojančio kardiolipino TLCL oksiduotų formų kiekybiniai pokyčiai reperfuzijos metu. Nustatyta, kad beveik visų TLCL oksiduotų formų santykiniai kiekiai reikšmingai padidėjo vidutiniškai 9,8 kartus po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos (3.2.2.3 pav.). Didžiausias skirtumas buvo stebimas su TLCL su papildomai prisijungusiais 2 ir 3 deguonies atomais, kurių santykiniai kiekiai buvo atitinkamai 28,2 ir 23,6 karto didesni, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). TLCL su papildomai prisijungusiais 1 ir 4 deguonies atomais po 60 min. išemijos ir 30 min. reperfuzijos buvo atitinkamai 8,3 ir 7,7 kartų daugiau, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). TLCL oksidacijos produkto su papildomai prisijungusiu 6 deguonies atomus santykinis kiekis didėjo 3,5 karto, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). TLCL su papildomai prisijungusiais 1, 2, 3, 4 ir 6 atomais santykiniai kiekiai po 60 min. išemijos ir 30 min. reperfuzijos buvo ženkliai didesni ne tik lyginant su kontrole, tačiau taip pat lyginant ir su 30 min. išemijos/30 min. reperfuzijos bei 40 min. išemijos/30 min. reperfuzijos grupėmis.



3.2.2.3 pav. Išemijos/reperfuzijos in vivo poveikis oksiduotų TLCL formų, papildomai prisijungusių nuo vieno iki aštuonių deguonies atomų, santykiniams kiekiams žiurkės inkstų mitochondrijose

TLCL + deguonies atomų kiekis; Vienoje grupėje atlikti 5 nepriklausomi pakartojimai; I30R30 – 30 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I40R30 – 40 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I60R30 – 60 min. išemija su 30 min. reperfuzija; * statistškai reikšmingas skirtumas tarp pažymėtų grupių ($p < 0,05$).

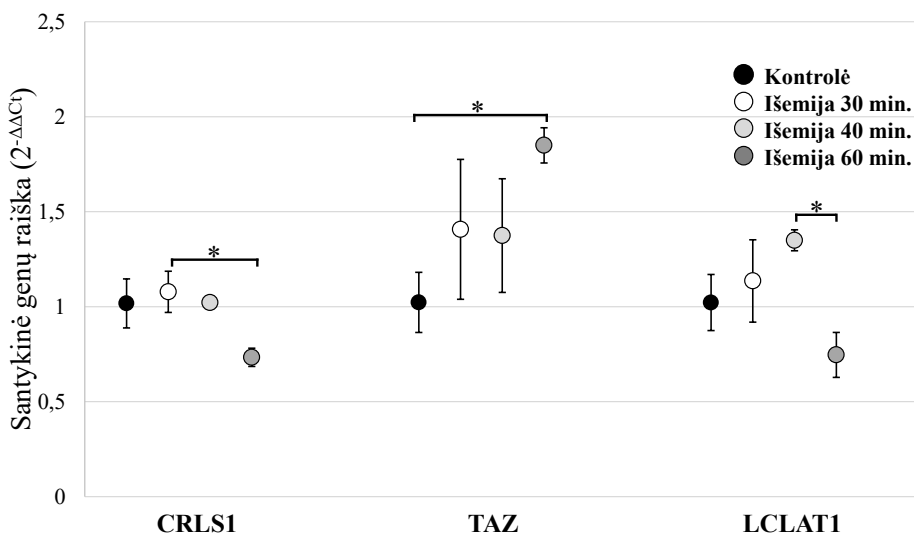
Šie rezultatai parodo, jog po išemijos/reperfuzijos daugelio individualių kardiolipinų kiekiai ima mažėti, tačiau dominuojančio TLCL kiekis po ilgiausios trukmės išemijos ir reperfuzijos netgi didėja, nors TLCL oksidacijos produktų kiekis taip pat padidėja. Siekiant išsiaiškinti kardiolipinų kiekio

didėjimo po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos priežastis, buvo analizuojami molekuliniai mechanizmai, susiję su kardiolino sinteze ir remodeliavimu.

3.2.3. Išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis žiurkės inkstų kardiolino sintezės ir remodeliavimo fermentų genų raiškai

Kardiolino sintezė vyksta vidinėje mitochondrijų membranoje, mitochondrijų matrikso pusėje, kur išsidėstę visi kardiolino *de novo* sintezės fermentai. Suformuotas taip vadinamas „nebrandus“ kardiolipinas po to yra remodeliuojamas – kardiolino riebalų rūgščių sudėtis yra pakeičiama ir suformuojamas brandus, audiniui/organui specifinis kardiolipinas. Buvo atlikta kelių fermentų, dalyvaujančių kardiolino sintezėje ir remodeliavime, genų raiškos analizė. Buvo pasirinkti trys genai: 1. *CRLS1* genas, koduojantis kardiolino sintazę, paskutinį kardiolino sintezės *de novo* fermentą, kuris formuoja nebrandų kardioliną; 2. *TAZ* genas, koduojantis fermentą tafaziną – aciltransferazę, dalyvaujančią kardiolino remodeliavimo reakcijose po sintezės *de novo*; 3. *LCLAT1* genas, koduojantis fermentą lizokardiolino aciltransferazę 1, kuri taip pat dalyvauja remodeliuojant kardioliną [223].

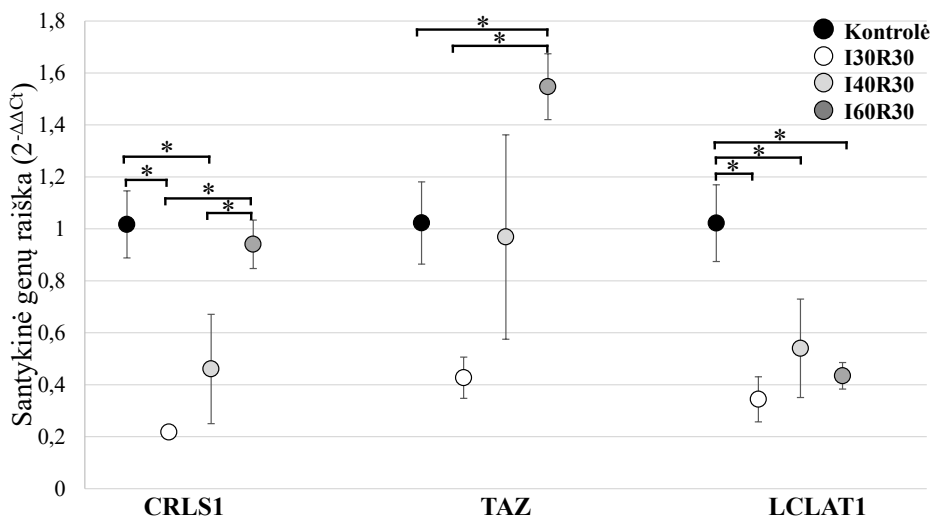
Pirmiausia buvo įvertinti šių genų raiškos pokyčiai po inkstų išemijos *in vivo*. Atlikus analizę buvo nustatyta, kad 30 ir 40 minučių išemija neturėjo poveikio genų raiškai, tačiau po 60 minučių išemijos *TAZ* geno raiška reikšmingai didėjo 1,8 karto, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$) (3.2.3.1 pav.). Taip pat pastebėta, kad po 60 minučių išemijos *CRLS1* ir *LCLAT1* genų raiška pradėjo mažėti: lyginant su 30 minučių išemijos grupe, *CRLS1* sumažėjo 32 proc. ($p < 0,05$), o *LCLAT1* sumažėjo 45 proc., lyginant su 40 minučių išemijos grupe ($p < 0,05$).



3.2.3.1 pav. Išemijos *in vivo* poveikis kardiolino sintazės (*CRLS1*), tafazino (*TAZ*) ir lizokardiolino aciltransferazės 1 (*LCLAT1*) genų raiškai žiurkės inkstuose

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas tarp pažymėtų grupių ($p < 0,05$).

Toliau buvo įvertintas ir inkstų išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis šių fermentų genų raiškai. Nustatyta, jog 30 minučių išemija/30 minučių reperfuzija reikšmingai mažino visų genų raišką: *CRLS1*, *TAZ*, *LCLAT1* genų raiška atitinkamai sumažėjo 79 proc. ($p < 0,05$), 58 proc. ir 66 proc. ($p < 0,05$), lyginant su kontrole (3.2.3.2 pav.). Po 40 minučių išemijos/30 minučių reperfuzijos tik *CRLS1* ir *LCLAT1* genų raiška buvo mažesnė atitinkamai 55 proc. ir 47 proc., lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Po 60 minučių išemijos/30 minučių reperfuzijos *CRLS1* geno raiškos lygis beveik nesiskyrė nuo kontrolės, *TAZ* geno raiška tapo 1,5 kartus didesnė už kontrolę ($p < 0,05$) ir net 3,6 kartus didesnė už išemijos 30 minučių/reperfuzijos 30 minučių grupę ($p < 0,05$), o *LCLAT1* geno raiška išliko 57 proc. sumažėjusi, lyginant su kontrole grupe ($p < 0,05$). Taip pat buvo palyginamas 30 minučių reperfuzijos poveikis genų raiškai po išemijos, t.y. palygintos išemijos/reperfuzijos grupių genų raiška su atitinkamai tos pačios trukmės išemijos grupių genų raiška. Nustatyta, kad 30 minučių reperfuzija sumažino *CRLS1* geno raišką 80 proc. po 30 minučių išemijos ($p < 0,05$). Panašų efektą turėjo ir 30 minučių reperfuzija po 40 minučių išemijos – *CRLS1* geno raiška sumažėjo 55 proc. ($p < 0,05$). *TAZ* geno raiška po 30 min. išemijos/30 min. reperfuzijos sumažėjo net 70 proc., lyginant su 30 minučių išemijos grupe ($p < 0,05$).



3.2.3.2 pav. Išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis kardiolino sintazės (CRLS1), tafazino (TAZ) ir lizokardiolino aciltransferazės 1 (LCLAT1) genų raiškai žiurkės inkstuose

Vienoje grupėje atlikti 3-4 nepriklausomi pakartojimai; I30R30 – 30 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I40R30 – 40 min. išemija su 30 min. reperfuzija; I60R30 – 60 min. išemija su 30 min. reperfuzija; * statistiškai reikšmingas skirtumas tarp pažymėtų grupių ($p < 0,05$).

Rezultatai parodo, jog kardiolino kiekio padidėjimai po 60 min. išemijos/30 min. reperfuzijos gali vykti dėl tafazino geno raiškos aktyvinimo.

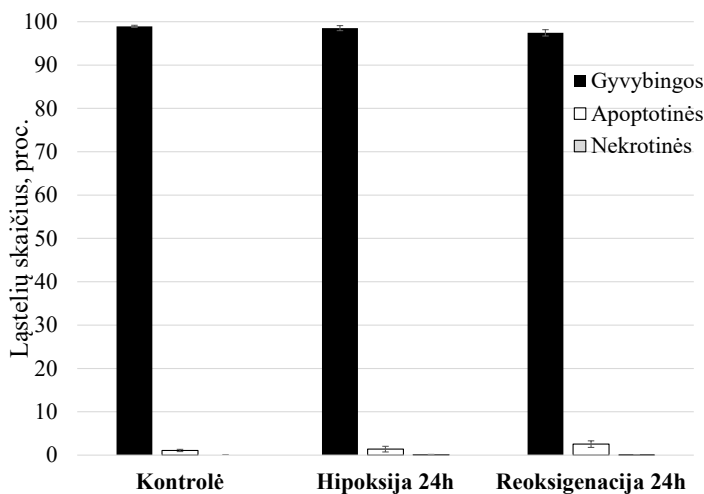
3.3. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių gyvybingumui, mitochondrijų funkcijoms, kardiolino kiekybiniais pokyčiams ir jų mechanizmams

Tolimesni eksperimentai analizuojant kardiolino kiekybinius pokyčius ir juos lemiančius mechanizmus išemijos/reperfuzijos metu buvo analizuojami panaudojant *in vitro* modelius su žmogaus inkstų RPTEC ląstelių linija. Šiuose tyrimuose naudojama imortaliizuota žmogaus inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių linija (RPTEC/TERT1). Inkstų proksimalinių kanalėlių epitelis yra gausus mitochondrijomis ir sunaudoja nemažai deguonies, kad aprūpintų ląsteles pakankamu kiekiu ATP, reikalingu vykdyti medžiagų pernašą. Dėl didelio mitochondrijų kiekio ir deguonies poreikio, šios ląstelės yra jautrios deguonies apykaitos sutrikimams, pvz., išemijos/reperfuzijos metu, todėl jos yra geras modelis analizuoti išemijos/reperfuzijos sukeltus pažeidimus [209]. Šiame darbe naudojamas *in vitro* hipoksijos/reoksigenacijos modelis – ląstelės inkubuojamos specialioje hipoksinėje kameroje, kurioje atmosferos deguonies koncentracija yra 2 proc., taip pat palaikoma 5 proc.

CO₂, 37 °C temperatūra ir 70 proc. santykinė drėgme. Reoksigenacijai sukelti ląstelių kultūros yra perkeliamos į įprastas auginimo sąlygas prieš tai pakeičiant ląstelių auginimo terpę šviežia. Taigi, panaudojant tokį modelį yra keičiama tik deguonies koncentracija atmosferoje. Šiame darbe dėl paprastumo hipoksijos grupė bus vadinama „Hipoksija 24h“, o grupė, kuriai sukurta hipoksija ir reoksigenacija, bus vadinama tiesiog „Reoksigenacija 24h“.

3.3.1. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių gyvybingumui ir mitochondrijų funkcijoms

Tiriant hipoksijos/reoksigenacijos poveikį RPTEC ląstelių kardiolipinui, pirmiausiai įvertintas ląstelių gyvybingumas, proliferacija, mitochondrijų kvėpavimas bei aktyvių deguonies junginių (H₂O₂) sintezės greitis. RPTEC ląstelių gyvybingumas buvo vertinamas fluorescencinės mikroskopijos metodu, nudažant ląstelių branduolius Hoechst 33342 ir propidžio jodido dažais. Apskaičiavus gyvybingas, apoptotines ir nekrotines ląsteles, buvo nustatyta, kad nei hipoksija nei reoksigenacija neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui. Gyvybingų ląstelių visose grupėse buvo ne mažiau nei 97,4 proc., apoptotinių ląstelių ne daugiau nei 2,5 proc., o nekrotinių ląstelių ne daugiau nei 0,1 proc. (3.3.1.1 pav.).

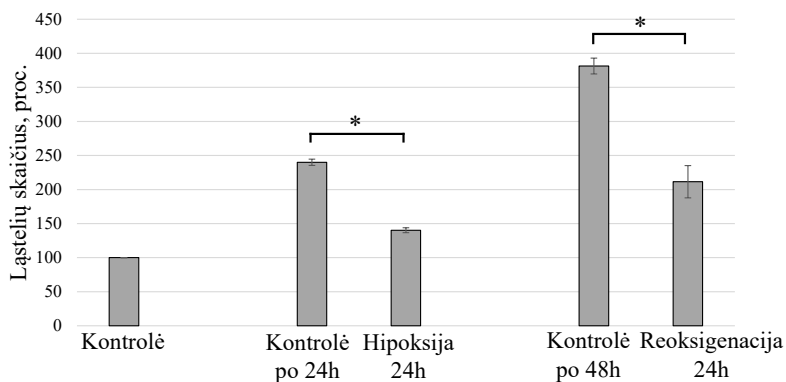


3.3.1.1 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių gyvybingumui

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai.

Taip pat buvo analizuojamas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis ląstelių proliferacijai, vertinant ląstelių skaičiaus prieaugį po 24 val. hipoksijos ir po 24 val. reoksigenacijos, bei palyginama su ląstelių skaičiaus prieaugiu po tos

pačios trukmės įprasto kultivavimo. Atlikus skaičiavimus buvo nustatyta, jog 24 val. hipoksija slopino ląstelių proliferaciją 41,5 proc., lyginant su 24 val. įprastos inkubacijos kontroline grupe ($p < 0,05$), o po 24 val. reoksigenacijos, ląstelių prieaugis buvo 44,5 proc. mažesnis, lyginant su 48 val. įprastos inkubacijos kontroline grupe ($p < 0,05$) (3.3.1.2 pav.).

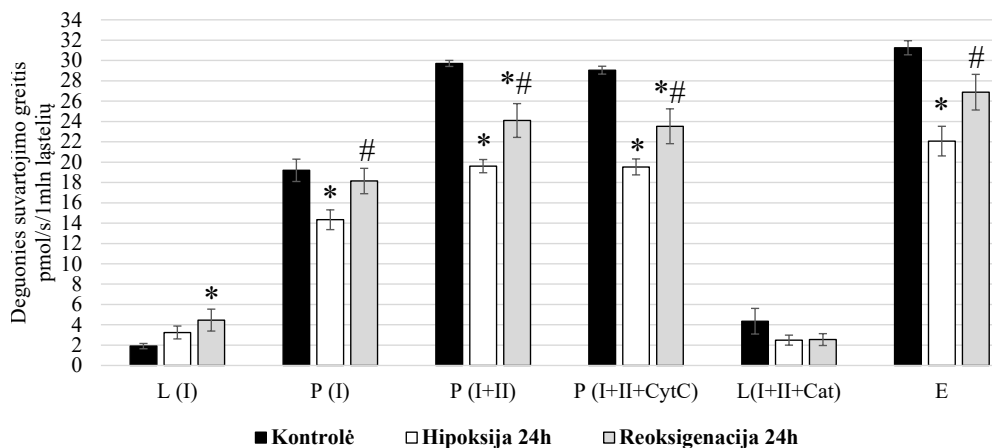


3.3.1.2 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių proliferacijai

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas tarp pažymėtų grupių ($p < 0,05$).

Kitoje eksperimentų serijoje analizuotas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis RPTEC ląstelių mitochondrijų funkcijoms – įvertintas mitochondrijų kvėpavimas (deguonies suvartojimo greitis) oksigrafiniu metodu bei aktyvių deguonies junginių susidarymo greitis fluorimetriniu metodu. Matuojant mitochondrijų deguonies suvartojimo greitį laidumo būsenoje su I kvėpavimo grandinės komplekso substratais glutamatu ir malatu (L (I)) nustatyta, kad po 24 val. reoksigenacijos šis greitis buvo 2,3 karto didesnis, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$) (3.3.1.3 pav.). Pridėjus adenozino difosfato buvo aktyvinama ATP sintazė bei oksidacinis fosforilinimas (P (I)) ir pastebėta, jog 24 val. hipoksija slopino mitochondrijų deguonies suvartojimo greitį 25 proc., lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Po 24 val. reoksigenacijos deguonies suvartojimo greitis oksidacinio fosforilinimo būsenoje padidėjo 27 proc., lyginant su hipoksijos grupe ($p < 0,05$), ir beveik pasiekė kontrolės lygį. Į kvėpavimo matavimo terpę pridėjus sukcinato, buvo aktyvinamas II kvėpavimo grandinės kompleksas ir vertinamas maksimalus deguonies suvartojimo greitis oksidacinio fosforilinimo būsenoje (P (I+II)) bei nustatyta, kad po 24 val. hipoksijos šis greitis sumažėjo 32 proc., lyginant su kontrole ($p < 0,05$), o po 24 val. reoksigenacijos padidėjo 23 proc., lyginant su hipoksijos grupe ($p < 0,05$), tačiau išliko 19 proc. žemesnis lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Vėliau į matavimo terpę buvo pridedama citochromo C, kad būtų įvertintas mitochon-

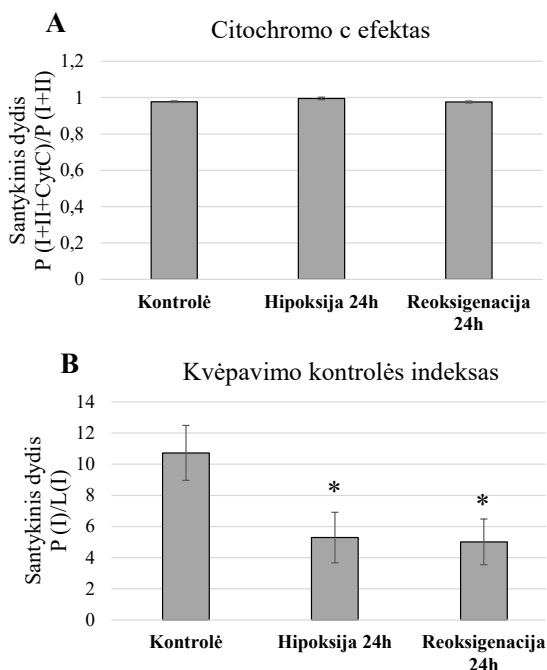
drijų išorinės membranos pralaidumas (P (I+II+CytC)), tačiau citochromas C neturėjo poveikio kvėpavimo greičiui šioje būsenoje tiriamosiose grupėse – po 24 val. hipoksijos mitochondrijų kvėpavimo greitis išliko 33 proc. mažesnis, lyginant su kontrole ($p < 0,05$), o po 24 val. reoksigenacijos kvėpavimo greitis didėjo, bet išliko reikšmingai mažesnis, lyginant su kontrole. Pridėjus karboksitraktilozido buvo užslopintas adenino nukleotidų nešiklis, todėl buvo registruojamas mitochondrijų kvėpavimo greitis laidumo būsenoje su I ir II komplekso substratais (L (I+II+Cat)), siekiant įvertinti mitochondrijų vidinės membranos pralaidumo pokyčius, tačiau po hipoksijos/reoksigenacijos nebuvo nustatyta reikšmingų mitochondrijų deguonies suvartojimo greičio pokyčių šioje būsenoje. Galiausiai į terpę buvo pridėta skyriklio dinitrofenolio, kuris atskiria fosforilinimo ir elektronų pernašos procesus, tokiu būdu buvo išmatuotas mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis esant maksimaliam elektronų pernašos pajėgumui (E). Nustatyta, jog po 24 val. hipoksijos mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis šioje būsenoje buvo 29 proc. mažesnis, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Po 24 val. reoksigenacijos deguonies suvartojimo greitis padidėjo 22 proc., lyginant su 24 val. hipoksijos grupe ($p < 0,05$) ir beveik pasiekė kontrolės lygį.



3.3.1.3 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių mitochondrijų kvėpavimui

Vienoje grupėje atlikti 4 nepriklausomi pakartojimai; L (I) – laidumo būseną su I komplekso substratais glutamatu ir malatu; P (I) – fosforilinimo būseną su I komplekso substratais glutamatu ir malatu; P (I+II) – fosforilinimo būseną su I ir II komplekso substratais glutamatu, malatu ir sukcinatu; P (I+II+CytC) – fosforilinimo būseną su I ir II komplekso substratais glutamatu, malatu, sukcinatu ir su egzogeniniu citochromu C; L (I+II+Cat) – laidumo būseną su I ir II komplekso substratais glutamatu, malatu, sukcinatu bei su karboksitraktilozidu; E – maksimalus elektronų pernašos grandinės pajėgumas; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h ($p < 0,05$).

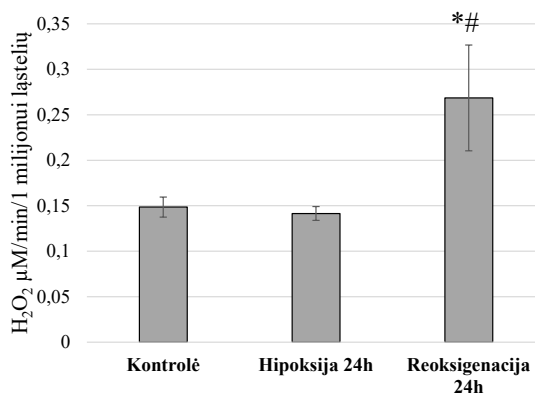
Papildomai buvo apskaičiuotas citochromo C efektas, kuris parodo mitochondrijų išorinės membranos pralaidumo pokyčius. Citochromo C efektas nekito tarp tiriamųjų grupių ir išliko žemiau už 1, tai reiškia, kad išorinė mitochondrijų membrana nebuvo pažeista ir jos pralaidumas nepadidėjo po hipoksijos/reoksigenacijos (3.3.1.4 pav. A). Taip pat apskaičiuotas kvėpavimo kontrolės indeksas, kurio santykinis dydis parodo mitochondrijų oksidacinio fosforilavimo sistemos fosforilavimo gebą. Kvėpavimo kontrolės indeksas buvo reikšmingai sumažėjęs tiek po 24 val. hipoksijos, tiek po 24 val. reoksigenacijos, atitinkamai 51 proc. ir 53 proc. ($p < 0,05$) (3.3.1.4 pav. B).



3.3.1.4 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos in vitro poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių citochromo C efektui (A) ir kvėpavimo kontrolės indeksui (B)

Vienoje grupėje atlikti 4 nepriklausomi pakartojimai; $P(I+II+CytC)$ – mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis fosforilavimo būsenoje su I ir II komplekso substratais glutamatu, malatu, sukcinatu ir su egzogeniniu citochromu C; $P(I+II)$ – mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis fosforilavimo būsenoje su I ir II komplekso substratais glutamatu, malatu ir sukcinatu; $P(I)$ – mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis fosforilavimo būsenoje su I komplekso substratais glutamatu ir malatu; $L(I)$ – mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis laidumo būsenoje su I komplekso substratais glutamatu ir malatu; * statistškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

Mitochondrijų elektronų pernašos grandinė yra vienas iš aktyvių deguonies junginių susidarymo šaltinių, kuris fiziologinėmis sąlygomis padeda reguliuoti mitochondrijų ir ląstelės homeostazę, o patologijų atvejais gali sukelti žalingą įvairių molekulių oksidaciją [189]. Nustatius, kad hipoksija ir reoksigenacija slopina RPTEC ląstelių mitochondrijų oksidacinio fosforilinimo gebą, buvo išmatuotas aktyvių deguonies junginių (H_2O_2) susidarymo greitis fluorimetriniu metodu. Atlikus analizę nustatyta, jog 24 val. hipoksija neturėjo poveikio H_2O_2 susidarymo greičiui RPTEC ląstelėse, tačiau po 24 val. reoksigenacijos H_2O_2 susidarymo greitis išaugo 1,8 karto, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$) (3.3.1.5 pav.).



3.3.1.5 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis H_2O_2 susidarymo greičiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

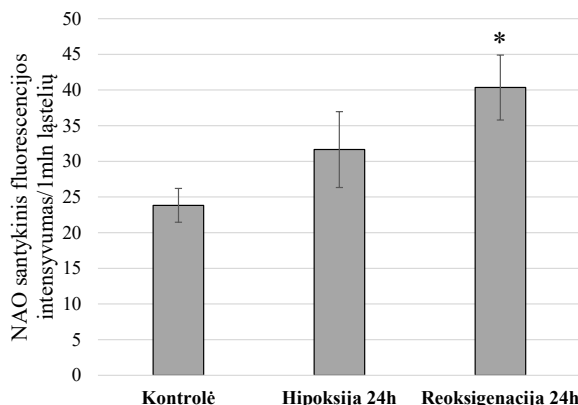
Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h ($p < 0,05$).

Apibendrintai, rezultatai parodo, jog hipoksija/reoksigenacija nepaveikė RPTEC ląstelių gyvybingumo, tačiau slopino ląstelių proliferaciją, mitochondrijų kvėpavimą ir didino aktyvių deguonies junginių susidarymo greitį.

3.3.2. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiopolipino kiekiui

Toliau buvo analizuojamas RPTEC ląstelių kardiopolipinas bei jo kiekybiniai pokyčiai hipoksijos/reoksigenacijos metu. Pirmiausiai buvo įvertintas bendras kardiopolipino kiekis RPTEC ląstelėse panaudojant fluorescencinį dažą 10-N-nonilakridino oranžą (NAO), kuris specifiskai jungiasi prie kardiopolipino. Atlikus fluorimetrinę analizę buvo nustatyta, jog po 24 val. hipoksijos NAO fluorescencija turėjo tendenciją didėti, tačiau po 24 val. reoksigenacijos

NAO fluorescencijos intensyvumas buvo 1,7 karto didesnis, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$) (3.3.2.1 pav.).

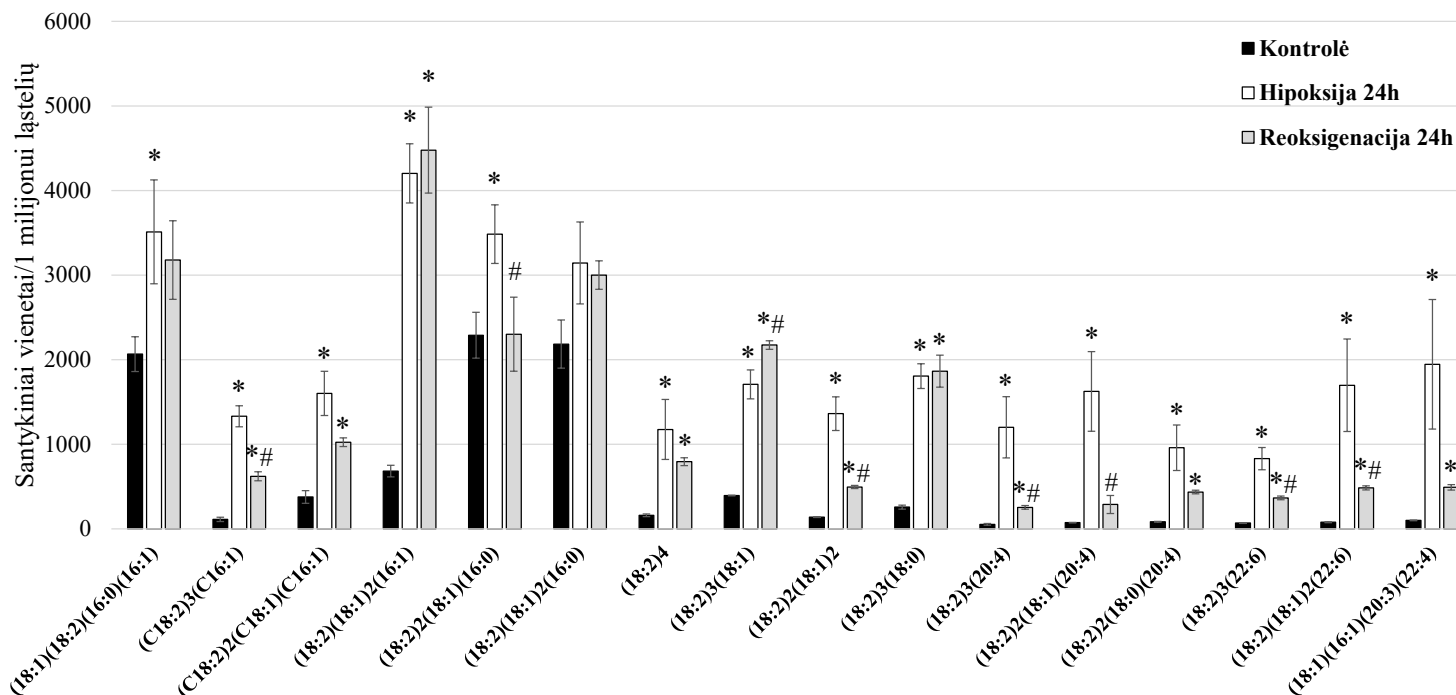


3.3.2.1 pav. *Hipoksijos/reoksigenacijos in vitro poveikis NAO fluorescencijos intensyvumui – bendram kardiolipino kiekiui – žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse*

Vienoje grupėje atlikti 5-6 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

Įvertinus bendrą kardiolipino santykinį kiekį RPTEC ląstelėse prieš ir po hipoksijos/reoksigenacijos toliau buvo analizuojamas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis individualių kardiolipinų kiekiui UPLC-MS/MS metodu. Skyriuje 3.1.2. buvo aprašyta, jog RPTEC ląstelėse identifikuota 16 kardiolipinų ir nustatytas jų santykinis kiekis. Atlikus šių formų kiekybinę analizę po hipoksijos/reoksigenacijos buvo nustatyta, jog 24 val. hipoksija sukėlė reikšmingą beveik visų kardiolipino formų santykinio kiekio didėjimą nuo 1,4 iki 22,5 karto, lyginant su kontrole (3.3.2.2 pav.). Didžiausias pokytis įvyko tarp kardiolipinų su ilgos grandinės riebalų rūgštimis, tai buvo CL (18:2)₃(20:4), CL (18:2)₂(18:1)(20:4), CL (22:6)(18:1)₂(18:2) ir CL (22:4)(20:3)(16:1)(18:1), kurių santykiniai kiekiai po 24 val. hipoksijos buvo atitinkamai 22,5, 22,1, 21,6 ir 19,4 kartus didesni, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$). Kardiolipinai CL (18:1)(18:2)(16:0)(16:1), CL (18:2)₂(18:1)(16:0) ir CL (18:2)(18:1)₂(16:0) po 24 val. hipoksijos buvo paveikti mažiausiai – šių kardiolipinų santykiniai kiekiai buvo atitinkamai 1,7 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) ir 1,4 kartus didesni, lyginant su kontrole. Po 24 val. reoksigenacijos daugelio kardiolipinų kiekiai sumažėjo (lyginant su 24 val. hipoksijos grupe), išskyrus CL (18:2)(18:1)₂(16:1), CL (18:2)₃(18:1) ir CL (18:2)₃(18:0), jų santykiniai kiekiai išliko reikšmingai didesni nei kontrolinės grupės ($p < 0,05$). Vertinant kitų kardiolipino formų santykinius kiekius po 24 val. reoksigenacijos, di-

džiausias pokytis buvo nustatytas tarp kardiolipinų, kurių sudėtyje buvo ilgų grandinės riebalų rūgščių – CL (18:2)₃(20:4), CL (18:2)₂(18:1)(20:4), CL (18:2)₃(22:6) ir CL (22:6)(18:1)₂(18:2). Šių kardiolipinų santykiniai kiekiai po 24 val. reoksigenacijos sumažėjo atitinkamai 4,7, 5,6, 2,3 ir 3,5 kartus, lyginant su 24 val. hipoksijos grupe ($p < 0,05$). Tačiau nepaisant sumažėjimo, šių kardiolipino formų santykiniai kiekiai išliko reikšmingai didesni, lyginant su kontrole.

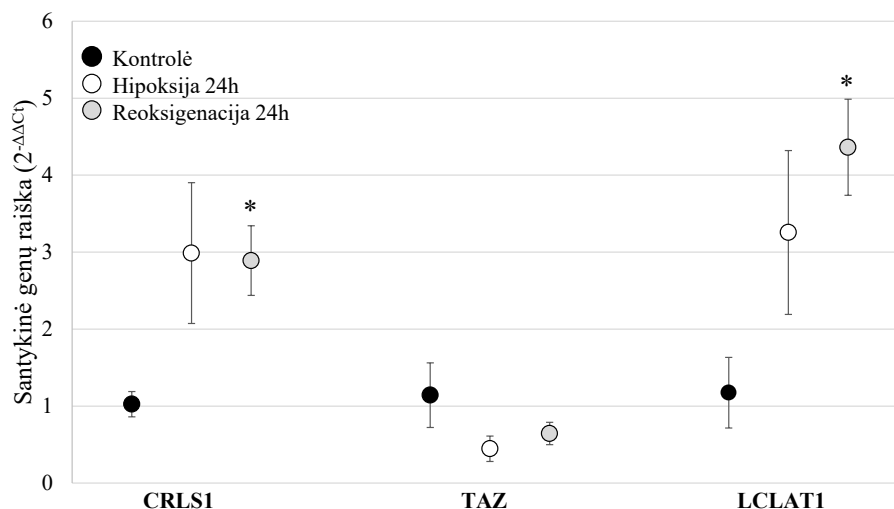


3.3.2.2 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos in vitro poveikis individualių kardiolipinų santykiniais kiekiais žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3-4 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h ($p < 0,05$).

3.3.3. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolino sintezės ir remodeliavimo fermentų kiekiui, jų genų raiškai bei HIF-1 α veiksnio kiekiui

Atlikus kiekybinę kardiolino analizę RPTEC ląstelėse ir nustatčius, jog hipoksija/reoksigenacija sukelia kardiolino santykinio kiekio didėjimą, toliau buvo analizuojami tokius pokyčius lemiantys mechanizmai. Pirmiausia buvo atlikta trijų anksčiau minėtų kardiolino sintezės ir remodeliavimo fermentų genų raiškos analizė – *CRLS1* (kardiolino sintazė, galutinis kardiolino *de novo* sintezės fermentas), *TAZ* (tafazinas, remodeliavimo fermentas) ir *LCLAT1* (lizokardiolino aciltransferazė 1, remodeliavimo fermentas). Atlikus šių genų raiškos analizę kontrolinėje, hipoksijos ir reoksigenacijos grupėse buvo pastebėta tendencija, jog po 24 val. hipoksijos *CRLS1* ir *LCLAT1* genų raiška didėja, tačiau tai nebuvo statistiškai reikšmingas skirtumas (3.3.3.1 pav.). Po 24 val. reoksigenacijos šių genų raiška yra atitinkamai 2,8 ir 3,7 karto didesnė, lyginant su kontrole ($p < 0,05$). Tuo tarpu *TAZ* geno raiška nekito hipoksijos/reoksigenacijos metu.

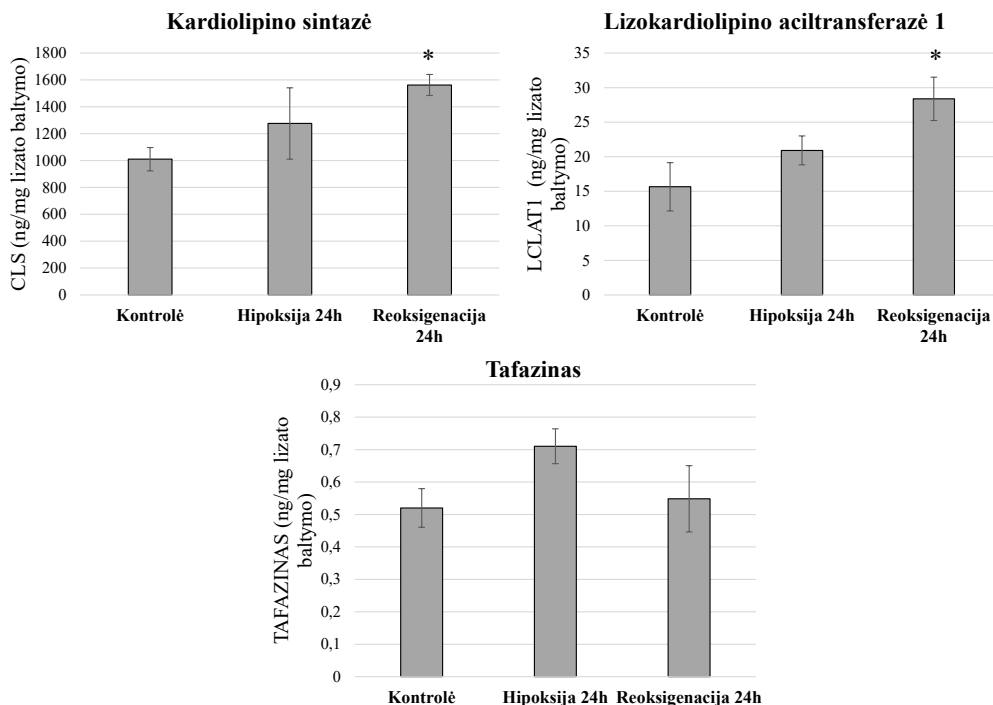


3.3.3.1 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis kardiolino sintazės (*CRLS1*), tafazino (*TAZ*) ir lizokardiolino aciltransferazės 1 (*LCLAT1*) genų raiškai žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3-4 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

Tuomet buvo įvertintas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis pačių fermentų kiekiams RPTEC ląstelių lizatuose. Atlikus fermentų kiekybinę analizę ELISA metodu buvo nustatyta, jog po 24 val. hipoksijos kardiolino sintazės

ir lizokardiolino aciltransferazės 1 kiekiai turėjo tendenciją didėti (3.3.3.2 pav.). Po 24 val. reoksigenacijos šių fermentų kiekiai buvo atitinkamai 1,5 ir 1,8 karto didesni už kontrolę ($p < 0,05$). Tuo tarpu hipoksija/reoksigenacija neturėjo poveikio tafazino kiekiui žmogaus RPTEC ląstelėse. Taip pat pastebėta, kad kardiolino sintazės ir lizokardiolino aciltransferazės 1 fermentų kiekybiniai pokyčiai koreliavo su jų genų raiškos pokyčiais hipoksijos/reoksigenacijos metu.

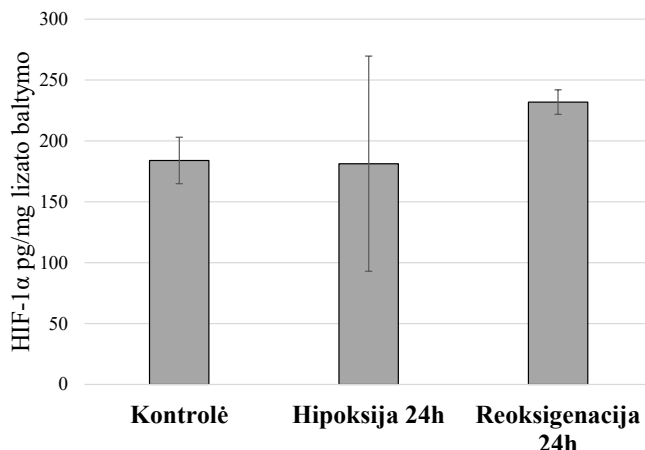


3.3.3.2 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis kardiolino sintazės (CLS), tafazino ir lizokardiolino aciltransferazės 1 (LCLAT1) fermentų kiekiams žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$);

Yra žinoma, kad hipoksijos/reoksigenacijos metu įvairių genų raiška ląstelėje yra moduluojama hipoksijos indukuojamo veiksnio 1 α (HIF-1 α), kurio kiekis ląstelėje paprastai didėja hipoksinėmis sąlygomis dėl slopinamo jo skaidymo. Šis veiksnys yra atsakingas už ląstelės prisitaikymą hipoksijos metu [224]. Siekiant išsiaiškinti ar kardiolino sintezės ir remodeliavimo fermentų genų raiškos pokyčiai hipoksijos/reoksigenacijos metu galėtų būti veikiami HIF-1 α , buvo nustatytas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis

HIF-1 α veiksnio kiekiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse. Atlikus analizę, nustatyta, kad hipoksija/reoksigenacija neturėjo reikšmingo poveikio HIF-1 α kiekiui RPTEC ląstelėse, tačiau buvo pastebėta tendencija HIF-1 α kiekiui didėti po 24 val. reoksigenacijos (3.3.3.3 pav.).

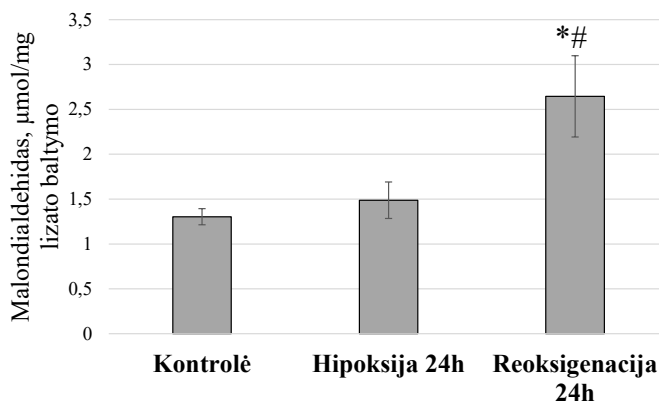


3.3.3.3 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis HIF-1 α kiekiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai.

3.3.4. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių lipidų peroksidacijai ir hidrolizei

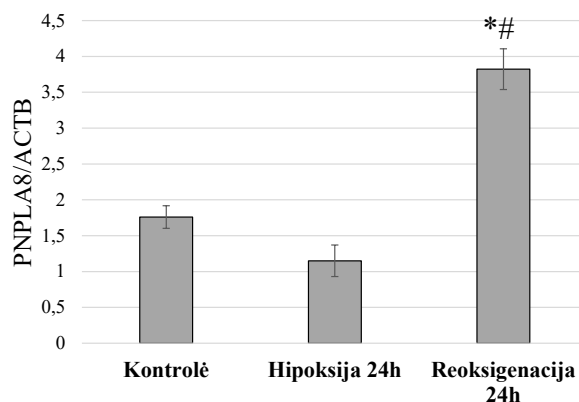
Kardiopolino kiekybinė analizė UPLC-MS/MS metodu parodė, jog reoksigenacijos metu individualių kardiopolinų santykinis kiekis sumažėja, labiausiai mažėjo tų kardiopolino formų, kurių sudėtyje buvo ilgos grandinės polinesočiųjų riebalų rūgščių. 3.3.1 skyriuje aprašyti rezultatai parodė, jog po 24 val. reoksigenacijos reikšmingai didėja aktyvių deguonies junginių (H_2O_2) kiekis RPTEC ląstelėse. Tikėtina, jog didėjantis aktyvių deguonies junginių kiekis gali sukelti ir kardiopolino polinesočiųjų riebalų rūgščių oksidaciją, todėl buvo siekiama įvertinti susidariusių oksidacijos produktų kiekį. Vienas iš tokių produktų yra malondialdehidas, galutinis polinesočiųjų riebalų rūgščių oksidacijos produktas, kuris yra laikomas oksidacinio streso rodikliu [193]. Atlikus analizę buvo nustatyta, jog 24 val. hipoksija nepaveikė malondialdehido kiekio RPTEC ląstelėse, lyginant su kontrole (3.3.4.1 pav.), tačiau po 24 val. reoksigenacijos buvo nustatytas du kartus didesnis malondialdehido kiekis RPTEC ląstelėse, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$).



3.3.4.1 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis malondialdehido kiekiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 4 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h ($p < 0,05$).

Kardiopolino kiekio mažėjimas reoksigenacijos metu galėtų įvykti ne tik dėl peroksidacijos, bet ir dėl hidrolizės. Yra žinoma, jog oksiduotus fosfolipidus gali hidrolizuoti fosfolipazės. Nustatyta, jog mitochondrijų nuo kalcio nepriklausoma fosfolipazė $A_2\gamma$, dar vadinama PNPLA8 (angl. *patatin-like phospholipase domain-containing 8*), yra membraninis fermentas, kuris yra atsakingas už glicerofosfolipidų hidrolizę ir membraninių fosfolipidų homeostazę, tačiau taip pat yra duomenų, kad ši fosfolipazė hidrolizuoja oksiduoto kardiopolino riebalų rūgštis [198,225]. Siekiant išsiaiškinti, ar kai kurių kardiopolinų kiekio sumažėjimą žmogaus RPTEC ląstelėse po 24 val. reoksigenacijos galėjo nulemti ne tik oksidacija bet ir kardiopolino hidrolizės suaktyvinimas, buvo nustatytas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis fosfolipazės $A_2\gamma$ kiekiui RPTEC ląstelėse *Western Blot* metodu. Įvertinus PNPLA8 fragmento ir referentinio baltymo aktino beta (ACTB) santykį buvo nustatyta, jog PNPLA8 santykinis kiekis po 24 val. hipoksijos buvo nežymiai sumažėjęs, tačiau po 24 val. reoksigenacijos tapo 2,2 karto didesnis, lyginant su kontroline grupe ($p < 0,05$) (3.3.4.2 pav.).

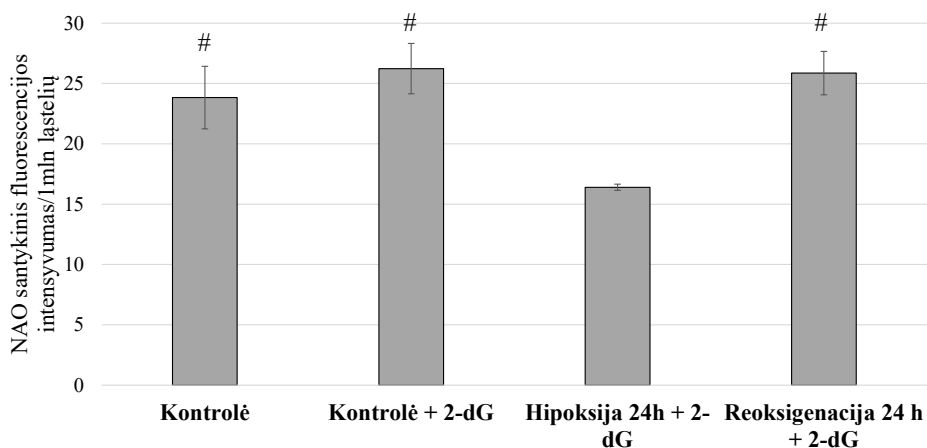


3.3.4.2 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis santykiniam fosfolipazės $A_2\gamma$ (PNPLA8) kiekiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3-4 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h ($p < 0,05$);

3.3.5. Hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-deoksi-D-gliukozės *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipino metabolizmui

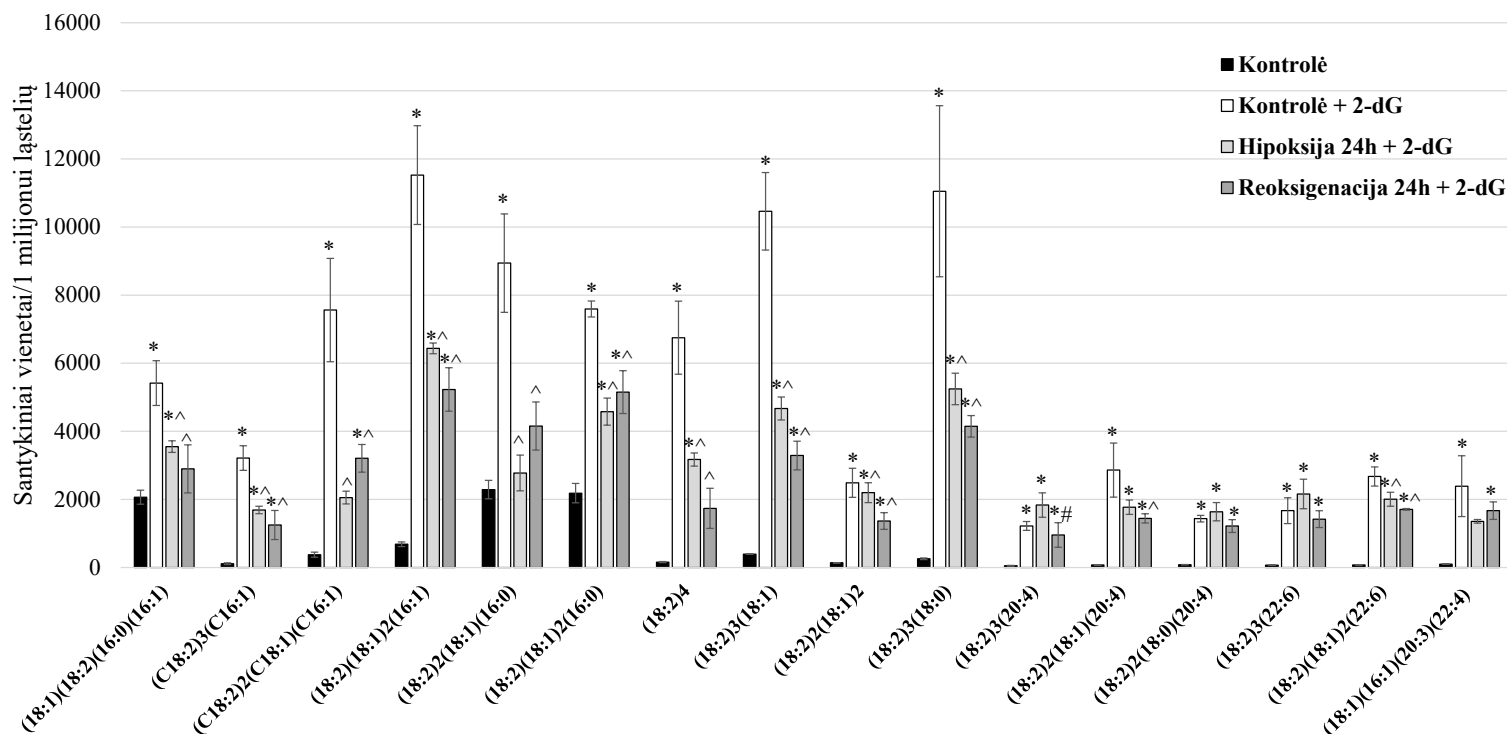
Išemijos/reperfuzijos metu inkstuose ne tik sumažėja deguonies kiekis, tačiau su krauju nebeatnešama ir maisto medžiagų. Vienas iš modelių išemijai/reperfuzijai *in vitro* tirti yra deguonies-gliukozės trūkumo modelis (angl. *oxygen-glucose deprivation*, OGD) [211], kuris buvo pritaikytas ir šiame disertaciniame darbe. Taikant anksčiau aprašytą hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* modelį su žmogaus inkstų RPTEC ląstelėmis papildomai į mitybinę terpę hipoksijos metu buvo pridėta 2-deoksi-D-gliukozės (2-dG), kuri yra glikolizės fermento heksokinazės slopiklis [226]. Pritaikius šį modelį buvo pirmiausiai analizuojami kardiolipino bendro kiekio pokyčiai fluorimetriniu metodu žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse. Paveikus ląsteles 2-dG nebuvo nustatyta žymių kardiolipino bendro kiekio pokyčių kontrolinėje grupėje (3.3.5.1 pav.), tačiau po 24 val. hipoksijos su 2-dG buvo stebimas reikšmingas kardiolipino bendro kiekio sumažėjimas 31 proc., lyginant su kontrole ($p < 0,05$), kuris po 24 val. reoksigenacijos atsistatė iki kontrolės lygio. Kardiolipino kiekis po 24 val. hipoksijos buvo reikšmingai mažesnis, lyginant su kontrole + 2-dG bei reoksigenacija 24h + 2-dG, atitinkamai 38 proc. ir 37 proc. ($p < 0,05$).



3.3.5.1 pav. *Hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-deoksi-D-gliukozės in vitro poveikis NAO fluorescencijos intensyvumui – bendram kardiolipino kiekiui – žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse*

Vienoje grupėje atlikti 4-6 nepriklausomi pakartojimai; # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h + 2-dG ($p < 0,05$).

Toliau buvo vertinamas hipoksijos/reoksigenacijos su 2-dG poveikis individualioms kardiolipino formoms žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse. Buvo nustatyta, kad pati 2-deoksi-D-gliukozė reikšmingai padidino visų kardiolipino formų santykinius kiekius vidutiniškai 23 kartus ($p < 0,05$) (3.3.5.2 pav.). Tarp jų, labiausiai buvo padidėję kardiolipino CL (18:2)₃(18:0) ir CL (C18:2)₄, atitinkamai 43 ir 42 kartus, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

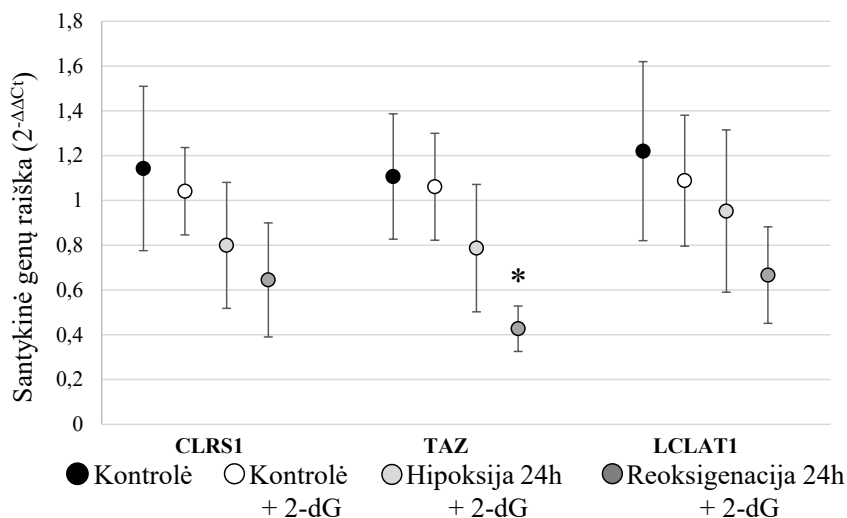


3.3.5.2 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos poveikis ir 2-deoksi-D-gliukozės *in vitro* poveikis individualių kardiolino formų santykiniams kiekiams žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3-4 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); ^ statistiškai reikšmingas skirtumas su kontrole + 2-dG ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h + 2-dG ($p < 0,05$).

Po 24 val. hipoksijos su 2-dG kardioliipinų santykiniai kiekiai buvo didesni už kontrolės lygį tačiau didelės dalies kardioliipinų su mažesnėmis masėmis (sudėtyje turintys tik C18 ir C16 riebalų rūgštis) santykiniai kiekiai sumažėjo, lyginant su kontrolės + 2-dG grupe. Tarp šių kardioliipinų labiausiai sumažėjo CL (C18:2)₂(C18:1)(C16:1) ir CL (18:2)₂(18:1)(16:0), atitinkamai 73 proc. ir 69 proc., lyginant su kontrole + 2-dG ($p < 0,05$). Po 24 val. reoksigenacijos su 2-dG individualių kardioliipinų kiekiai visgi išliko didesni už kontrolės lygį, tačiau daugelio kardioliipinų santykiniai kiekiai buvo mažesni, lyginant su kontrole + 2-dG. Labiausiai po 24 val. reoksigenacijos su 2-dG buvo sumažėję kardioliipinų CL (18:2)₄, CL (18:2)₃(18:1) ir CL (18:2)₃(18:0), atitinkamai 74 proc., 69 proc. ir 62 proc., lyginant su kontrole + 2-dG ($p < 0,05$). Apibendrinant, nustatyta, jog kontrolinės grupės ląsteles paveikus 2-dG, individualių kardioliipinų kiekiai reikšmingai išaugo, tačiau po hipoksijos/reoksigenacijos su 2-dG, kardioliipinų kiekiai mažėjo, lyginant su kontrole + 2-dG.

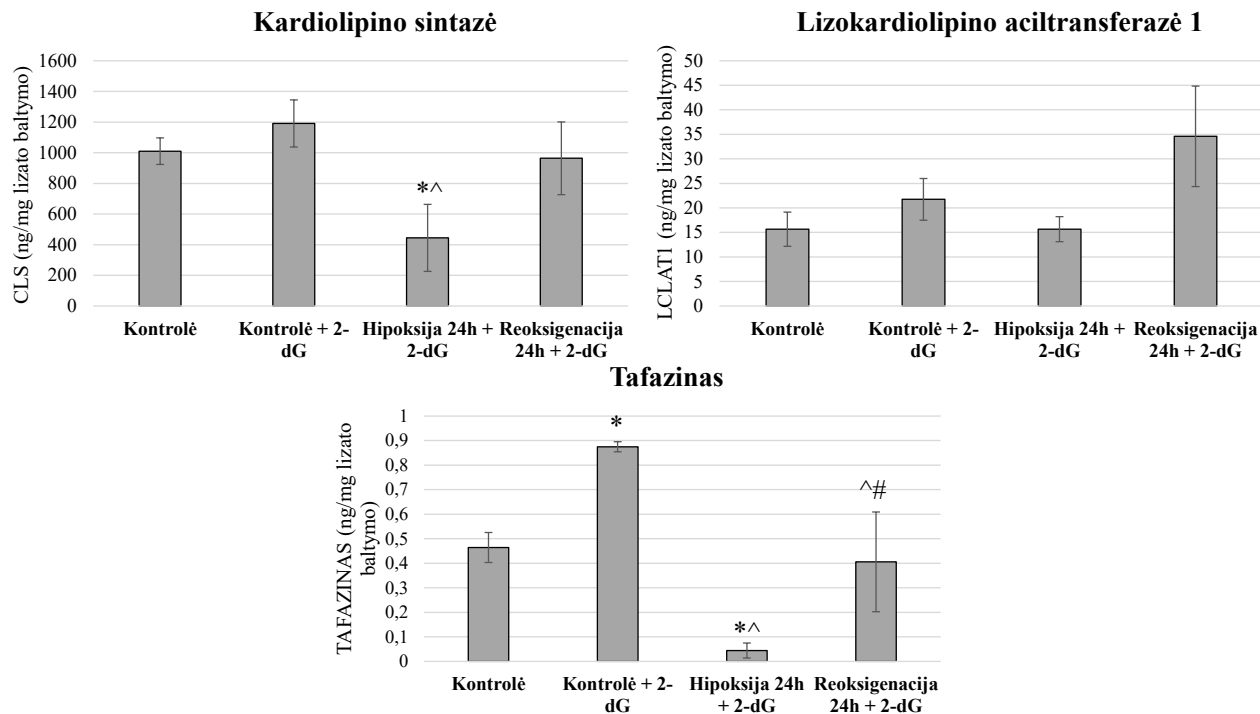
Toliau buvo įvertintas hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-dG poveikis kardioliipino sintezės ir remodeliavimo fermentų genų raiškos pokyčiams. Tyrimai parodė, jog pridėjus 2-dG ir sukeliant hipoksiją/reoksigenaciją, buvo pastebimas tendencingas visų genų raišką slopinantis poveikis (3.3.5.3 pav.), tačiau reikšmingas slopinimas nustatytas tik *TAZ* genų raiškos analizės metu – po 24 val. reoksigenacijos su 2-dG, *TAZ* geno raiška reikšmingai sumažėjo 61 proc., lyginant su kontrole ($p < 0,05$).



3.3.5.3 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-deoksi-D-gliukozės *in vitro* poveikis kardioliipino sintazės (*CRLS1*), tafazino (*TAZ*) ir lizokardioliipino aciltransferazės 1 (*LCLAT1*) genų raiškai žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3-4 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

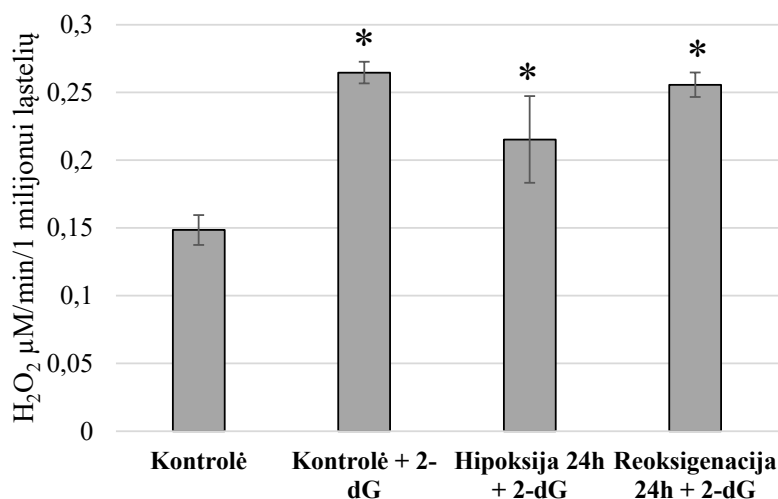
Atlikus genų raiškos analizę vėliau buvo vertinamas hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-dG poveikis kardiolipino sintazės, tafazino ir lizokardiolipino aciltransferazės 1 fermentų kiekiams žmogaus RPTEC ląstelių lizatuose. Atlikus fermentų kiekybinę analizę buvo nustatyta, jog pati 2-dG neturėjo poveikio kardiolipino sintazės ir lizokardiolipino aciltransferazės kiekiams, tačiau po 24 val. inkubacijos su 2-dG tafazino kiekis didėjo 1,9 karto, lyginant su kontrole ($p < 0,05$) (3.3.5.4 pav.). Taip pat buvo nustatyta, kad po 24 val. hipoksijos su 2-dG kardiolipino sintazės ir tafazino kiekiai reikšmingai sumažėjo, tiek lyginant su kontrole – atitinkamai 56 proc. ir 90 proc. ($p < 0,05$), tiek lyginant su kontrole + 2-dG – atitinkamai 87 proc. ir 95 proc. ($p < 0,05$). Po 24 val. reoksigenacijos su 2-dG buvo pastebėta, kad kardiolipino sintazės kiekis atsistatė beveik iki kontrolės lygio, o lizokardiolipino aciltransferazės 1 kiekis turėjo tendenciją didėti. Tik tafazino kiekis reikšmingai didėjo 9,1 karto, lyginant su hipoksija 24h + 2-dG ($p < 0,05$), tačiau išliko 54 proc. mažesnis už kontrolę + 2-dG ($p < 0,05$).



3.3.5.4 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-deoksi-D-gliukozės *in vitro* poveikis kardioliipino sintazės (CLS), tafazino ir lizokardioliipino aciltransferazės 1 (LCLAT1) fermentų kiekiams žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$); ^ statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole + 2-dG ($p < 0,05$); # statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su hipoksija 24h + 2-dG ($p < 0,05$)

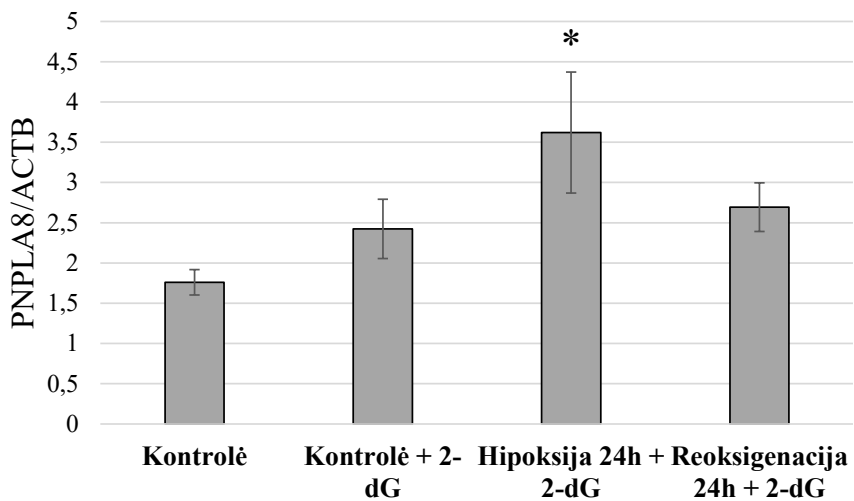
Papildomai, buvo įvertintas hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-dG poveikis aktyvių deguonies junginių sintezei ir fosfolipazės $A_2\gamma$ kiekiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse. Pirmiausiai, atlikus fluorimetrinę analizę ir įvertinus H_2O_2 susidarymo greitį tiriamosiose grupėse, buvo nustatyta, jog pati 2-dG skatino aktyvių deguonies junginių sintezę – H_2O_2 susidarymo greitis RPTEC ląstelėse padidėjo 1,8 karto, lyginant su kontrole ($p < 0,05$) (3.3.5.5 pav.). Taip pat buvo nustatyta, kad ir po 24 val. hipoksijos su 2-dG bei po 24 val. reoksigenacijos su 2-dG H_2O_2 susidarymo greitis išliko reikšmingai didesnis atitinkamai 1,5 ir 1,7 karto, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).



3.3.5.5 pav. Hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-deoksi-D-gliukozės *in vitro* poveikis H_2O_2 susidarymo greičiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

Atlikus *Western Blot* analizę ir įvertinus fosfolipazės $A_2\gamma$ santykinį kiekį buvo nustatyta, kad pati 2-dG neturėjo reikšmingo poveikio šio fermento kiekiui, tačiau po 24 val. hipoksijos su 2-dG buvo nustatytas 2 kartus didesnis fosfolipazės $A_2\gamma$ santykinis kiekis, lyginant su kontrole ($p < 0,05$) (3.3.5.6 pav.).



3.3.5.6. Hipoksijos/reoksigenacijos ir 2-deoksi-D-gliukozės *in vitro* poveikis santykiniam fosfolipazės $A_2\gamma$ (PNPLA8) kiekiui žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse

Vienoje grupėje atlikti 3-4 nepriklausomi pakartojimai; * statistiškai reikšmingas skirtumas, lyginant su kontrole ($p < 0,05$).

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Kardiolipinas yra ypatingą struktūrą turintis ir reikšmingas funkcijas atliekantis mitochondrijų fosfolipidas. Jo struktūriniai ir/ar kiekybiniai pokyčiai įvyksta daugelio patologijų metu, tokių kaip diabeto, Barto sindromo, širdies nepakankamumo ir ypač išemijos/reperfuzijos metu bei sukelia tolimesnes mitochondrijų ir ląstelės pažaidas [21,166,168,207,227,228]. Kardiolipino molekulėje yra keturios riebalų rūgštys, kurių sudėtis ir pasiskirstymas gali būti labai įvairus, priklauso nuo organizmo ir net gali skirtis tame pačiame organizme priklausomai nuo organo [4,49]. Kardiolipino oksidacija, kiekybiniai pokyčiai ir šių procesų molekuliniai mechanizmai išemijos/reperfuzijos metu nėra ištirtini inkstuose, kuriuose gausu mitochondrijų bei vyksta daug energijos reikalaujančių procesų, todėl kardiolipino kokybiniai ir/ar kiekybiniai pokyčiai gali sukelti rimtą pažaidą tiek mitochondrijoms tiek visam organui [229]. Yra aktualu analizuoti molekulinis kardiolipino pažaidos mechanizmus inkstuose ir jų įtaką mitochondrijoms ir visai ląstelei.

Disertaciniame darbe buvo analizuojamas inkstų kardiolipinas, inkstų išemijos/reperfuzijos poveikis kardiolipino kiekybiniais ir kokybiniais pokyčiams, bei šių pokyčių molekuliniais mechanizmais. Darbe buvo taikyti trys išemijos/reperfuzijos modeliai: inkstų išemijos/reperfuzijos *in vivo* modelis panaudojant Wistar veislės žiurkes, hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* modelis panaudojant žmogaus inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių imortalizuotą kultūrą (RPTEC ląstelės), bei hipoksijos/reoksigenacijos su 2-deoksi-D-gliukoze *in vitro* modelis naudojant tas pačias žmogaus inkstų ląsteles. Pritaikant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodus buvo identifikuota šešiolika kardiolipinų žiurkės inkstuose ir žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse bei parodyta, jog dominuojantys kardiolipinai skiriasi tarp tiriamųjų objektų. Nustatyta, jog išemija *in vivo* mažina visų ištirtų kardiolipinų kiekius žiurkės inkstuose, tačiau po reperfuzijos buvo stebimas ir kai kurių kardiolipinų kiekio padidėjimas bei suaktyvėjusi kardiolipino remodeliavimo fermento tafazino geno raiška. Taip pat parodyta, kad jau išemijos metu sukeliamą dominuojančio tetralinoleil-kardiolipino TLCL oksidacija žiurkės inkstuose, tokia oksidacija taip pat reikšmingai vyksta ir reperfuzijos metu. Žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse individualių kardiolipinų kiekiai ženkliai didėjo po 24 val. *in vitro* hipoksijos ir mažėjo po 24 val. reoksigenacijos, kartu didėjo ir kardiolipino sintazės ir lizokardiolipino-aciltransferazės 1 genų raiškos ir fermentų kiekiai. Reoksigenacijos metu ląstelėse didėjo ir aktyvių deguonies junginių susidarymo greitis, kuris sukėlė lipidų peroksidaciją ir lėmė padidėjusį lipidų peroksidacijos produkto malondialdehido kiekį. Parodyta, jog reoksigenacijos metu didėjo ir fosfo-

lipazės $A_2\gamma$ kiekis, kuri susijusi su fosfolipidų, ypač kardiolipino hidrolize. Nors nebuvo tiesiogiai tiriami kardiolipino hidrolizės ar oksidacijos produktai, reoksigenacijos metu vykstantys procesai paaiškina individualių kardiolipinų kiekio sumažėjimą, lyginant su hipoksijos grupe. Disertaciniame darbe buvo ištirtas ir 2-deoksi-D-gliukozės poveikis RPTEC ląstelėms kartu sukeliant hipoksiją/reoksigenaciją. Buvo parodyta, kad 2-dG didina individualių kardiolipinų kiekius žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse, kurie sumažėja po hipoksijos/reoksigenacijos. Po hipoksijos su 2-dG buvo nustatytas kardiolipino sintezės ir remodeliavimo fermentų genų raiškos ir fermentų kiekių sumažėjimas, fosfolipazės $A_2\gamma$ kiekio didėjimas ir aktyvių deguonies junginių susidarymo greičio didėjimas. Toliau bus aptariami šie disertacinio darbo rezultatai.

4.1. Žiurkės inkstų mitochondrijų ir žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipino įvairovė

Disertacinio darbo metu buvo pritaikytas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos ir tandeminės masių spektrometrijos metodas, remiantis Kim ir kt. metodika [187], kuris leido identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti skirtingus kardiolipinus ir jų oksidacijos produktus žiurkės inkstų mitochondrijose bei žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse. Nors originalioje metodikoje chromatografinio išskirstymo trukmė buvo 40 minučių, mūsų sąlygomis (panaudojant didelį slėgį) išskirstymas buvo sutrumpintas iki 26 minučių, išlaikant didelį efektyvumą ir chromatografinę raišką. Pirmiausia ši metodika buvo panaudota standartinio kardiolipino analizei. Kokybinės analizės metu buvo stebima kardiolipino fragmentacija į jam būdingus fragmentus – riebalų rūgštis, mono- ir diacilglicerolio fosfatus bei kitus fragmentus. Suprantant, kaip kardiolipinas fragmentuojamas mūsų turimomis masių spektrometrijos sąlygomis, buvo galima analizuoti daugelį kitų kardiolipinų biologiniuose mėginiuose, todėl remiantis nustatytais fragmentais ir pradinėmis masėmis buvo identifikuota 16 skirtingų kardiolipinų su preliminarėmis riebalų rūgščių sudėtimis žiurkės inkstuose ir žmogaus inkstų RPTEC ląstelėse. Literatūroje nėra pakankamai informacijos apie kardiolipino rūšis ir oksidacijos produktus inkstuose, todėl mūsų gauti rezultatai papildo esamus duomenis. Šiame darbe parodėme, kad žiurkės inkstuose dominuoja kardiolipinas su keturiomis linolo riebalų rūgštimis, ir visai neatsilieka kardiolipinas su trimis linolo ir viena oleino riebalų rūgštimi. Toks riebalų rūgščių pasiskirstymas tarp žiurkės inkstų kardiolipinų jau buvo pastebėtas seniau. Vieni iš seniausių tyrimų analizuojant žiurkių inkstų kardiolipiną buvo paskelbti Wolff ir kt., 1985 metais [230], jie parodė, jog jaunų Wistar žiurkių (21 dienos) inkstuose dominuoja kardiolipinas, kurio sudėtyje daugiausia linolo riebalų rūgštis. Įdomu ir tai, jog antroji pagal paplitimą riebalų rūgštis buvo ne oleino, bet cis-vak-

ceno rūgštis, kuri yra oleino rūgšties izomeras, turintis dvigubą jungtį ties ω -7 anglies atomu. Autoriai taip pat parodė, jog cis-vakceno rūgšties buvo daugiau nei oleino rūgšties žiurkių širdyse ir kepenyse [231]. Tie patys autoriai kitoje publikacijoje aprašė tyrimus apie mažai riebalų turinčios dietos poveikį kardiolipino riebalų rūgščių sudėčiai ir parodė, kad po tokios dietos Wistar žiurkių inkstų, širdies ir kepenų kardiolipino sudėtyje oleino rūgšties padaugėja dvigubai, lyginant su vakceno, kas taip pat parodo, jog kardiolipino riebalų rūgščių sudėtis gali priklausyti ir nuo mitybos. Tai pastebėjo ir kiti mokslininkai tyrinėdami dietos poveikį kardiolipino struktūrai įvairiuose organuose [4,232]. Daugelyje kitų publikacijų apie kardiolipiną nėra išskiriami šie izomerai, bet identifikuojama pagal anglies atomų ir dvigubųjų jungčių skaičių C18:1, dažniausiai vadinant oleino rūgštimi [4,55,233–235]. Vieni iš naujausių tyrimų apie inkstų kardiolipino įvairovę buvo atlikti Gowda ir kt. ir orientuoti į bendrą lipidų analizę C57BL/6 pelės inkstuose. Tarp analizuotų lipidų kontrolinėse grupėse buvo įvertintos ir aštuonios kardiolipino formos, tačiau nebuvo detalizuota jų struktūra, t.y. riebalų rūgščių sudėtis, išskyrus kardiolipino masę, bendrą riebalų rūgščių anglies atomų ir dvigubųjų jungčių skaičių. Palyginus autorių aprašomų kardiolipinų duomenis su mūsų tyrime identifiкуotais kardiolipinais, buvo matomi panašumai tarp šešių formų: – m/z 1424, 1448, 1450, 1474, 1476 ir 1496 masės su atitinkamais riebalų rūgščių anglies atomų ir dvigubųjų jungčių skaičiais CL 70:6, 72:8, 72:7, 74:9, 74:8 ir 76:12 [236], kurie pagal masę bei riebalų rūgščių anglies atomų ir dvigubųjų jungčių skaičių visiškai atitiko šiame disertaciniame darbe identifiкуotus kardiolipinus – CL (C18:2)₂(C18:1)(C16:1), CL (18:2)₄, CL (18:2)₃(18:1), CL (18:2)₂(18:1)(20:4), CL (18:2)₂(C18:0)(20:4) ir CL (18:2)₃(22:6). Panašus kardiolipino profilis inkstuose nustatytas ir kitų tyrimų metu su C57BL/6J pelėmis ir Sprague-Dawley žiurkėmis [220,237]. Eirin ir kt. išanalizavo kiaulės inkstų kardiolipiną. Ši mokslininkų grupė identifiкуavo ir aprašė 30 kardiolipino formų, tarp kurių pagal masę atitinka visos 16 mūsų identifiкуotų kardiolipino formų, tačiau iš šių 16 formų tik 7 atitinka mūsų nustatytą preliminarą riebalų rūgščių sudėtį – CL (C18:2)₃(C16:1), CL (18:2)(18:1)₂(16:1), CL (18:2)₄, CL (18:2)₃(18:1), CL (18:2)₂(18:1)₂, CL (18:2)₃(20:4) bei CL (18:2)₃(22:6). Autoriai taip pat parodė, kad tarp visų išanalizuotų kardiolipino formų dominavo kardiolipinai su keturiomis linolo bei trimis linolo su viena oleino riebalų rūgštimis [238]. Matoma, kad egzistuoja tarprūšiniai žinduolių inkstų kardiolipino profilio panašumai, tokie panašumai matomi ir širdies kardiolipino profilyje tarp pelės [169,233,239], žiurkės [220,240], triušio [241], jaučio [242], šuns [240] ir net žmogaus [52,243], todėl tikėtina, kad ir žmogaus inkstų kardiolipino profilis galėtų būti panašus į žiurkės ar kiaulės. Deja, duomenų mokslinėje literatūroje apie žmogaus inkstų kardiolipiną nėra (pavyzdžiui, žmogaus inksto preparate ar biopsijoje), tačiau yra

duomenų apie žmogaus inkstų ląstelių kardiolipiną. Šiame disertaciniame darbe taip pat buvo išanalizuotas žmogaus inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinių ląstelių linijos (RPTEC ląstelės) kardiolipinas, kurio individualių formų kiekybinis profilis labai skyrėsi nuo kardiolipinų esančių žiurkės inkstuose. Oemer ir kt. analizuodami žmogaus embrioninių ląstelių kultūros (HEK, angl. *Human embryonic kidney*) kardiolipiną parodė, jog profilyje išryškėja CL 70:5, CL 70:4, CL 68:4 kardiolipinai [49], kurie atitinka mūsų tirtų RPTEC ląstelių labiausiai dominuojančius kardiolipinus CL (18:2)₂(18:1)(16:0), CL (18:2)(18:1)₂(16:0) ir CL (18:1)(18:2)(16:0)(16:1). Remiantis tokiais rezultatais yra tikimybė, kad tame pačiame organe kardiolipino profilis gali skirtis priklausomai nuo ląstelių rūšies, tačiau tokiam palyginimui reikia įvertinti to paties organizmo viso organo ir/arba atskirų ląstelių tipų kardiolipino profilius. Zhang ir kt. analizavo C57BL/6J pelių inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelių lipidus, tarp jų ir keletą kardiolipinų formų. Šie mokslininkai nustatė, kad tarp kardiolipinų dominavo CL 72:7 [167], kuris atitinka CL (18:2)₃(18:1), vieną iš dominuojančių visame C57BL/6J pelės inkste [236,237]. Ši kardiolipino forma yra tarp dominuojančių ir kituose, jau anksčiau aprašytuose organizmuose, taip pat ir mūsų rezultatai su Wistar žiurkių inkstų kardiolipino profiliu tai parodo. Verta pastebėti, jog Zhang ir kt. tyrime buvo naudojami C57BL/6J pelių inkstų žievės pjūviai, kuriuose analizuotos proksimalinių kanalėlių ląstelės, taigi tai buvo pirminės ląstelės, tuo tarpu mūsų tyrime bei prieš tai lygintame Oemer ir kt. tyrime atitinkamai buvo naudotos transfekuotos inkstų ląstelių linijos RPTEC ir HEK. Anksčiau buvo minėta, jog kardiolipino profilį gali keisti ir mityba, tai yra, su maistu gaunami lipidai, riebalų rūgštys, todėl reikia atkreipti dėmesį į aplinką, kurioje ląstelių linijos yra kultivuojamos. RPTEC ir HEK ląstelės auga specializuotoje mitybinėje terpėje DMEM (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), kuri neretai būna papildoma įvairias priedas, o ypač fetaliniu veršelio serumu. Pačioje DMEM terpėje riebalų rūgščių nėra, tačiau yra fetaliniame veršelio serume, kuriame daugiausiai randama sočiųjų ir mononesočiųjų riebalų rūgščių (C16:0, C18:0, C18:1 ir kitos). Šiame disertaciniame darbe RPTEC ląstelių auginimo terpė buvo papildyta ir Ham's F-12 mitybiniu papildu, kurio sudėtyje taip pat yra linolo riebalų rūgšties (terpės kodas gamintojo puslapyje 10565018) [244,245]. Atsižvelgiant į ląstelių terpių sudėtį, būtų galima teigti, jog tiek RPTEC ląstelių tiek HEK ląstelių kardiolipino riebalų rūgščių sudėtys galėjo priklausyti nuo riebalų rūgščių esančių mitybinėse terpėse, tačiau mokslinėje literatūroje trūksta informacijos apie kardiolipino profilius skirtingose ląstelių linijose, kad būtų galima patvirtinti tokį teiginį, todėl reikia daugiau eksperimentinių tyrimų su ląstelių kultūromis, taip pat ir su transfekuotomis/imortalizuotomis ląstelių linijomis.

4.2. Išemijos/reperfuzijos *in vivo* poveikis kardiolipino kiekybiniams/kokybiniams pokyčiams

Inkstų išemija ir reperfuzija išlieka rimta problema lemianti lėtinių inkstų ligų išsivystymą, ilgalaikį inkstų pažeidimą po transplantacijos ir netgi kitų organų disfunkcija [246–248]. Išemijos/reperfuzijos pažeidžia apima ir kardiolipino oksidaciją bei jo kiekybinius pokyčius mitochondrijose [20]. Nors išemijos metu sustoja arterinė kraujotaka ir audiniuose ženkliai sumažėja deguonies, yra žinoma, kad likęs deguonis gali dalyvauti aktyvių deguonies junginių susiformavime ir taip prisidėti prie kardiolipino oksidacijos. Taip gali įvykti dėl elektronų „nutekėjimo“, kuomet vyksta jų atsipalaidavimas nuo mitochondrijų kvėpavimo grandinės dėl sulėtėjusios elektronų pernašos. Tuomet vyksta dalinė deguonies redukcija, suformuojant superoksido radikalą. Žinoma, didžiausi aktyvių deguonies junginių kiekiai susidaro reperfuzijos metu, kuomet atstatoma arterinė kraujotaka – deguonies kiekis ląstelėse tampa sąlyginai per didelis ir nėra efektyviai sunaudojamas, todėl vykstant daliai deguonies redukcijai susiformuoja superoksido radikalas ir kiti aktyvūs deguonies junginiai. Dėl hipoksijos metu nusilpusios antioksidacinės sistemos, susiformavę aktyvūs deguonies junginiai nėra efektyviai neutralizuojami, todėl vyksta intensyvi ir nespecifinė ląstelės baltymų, nukleorūgščių, lipidų, tarp jų ir kardiolipino oksidacija [202,249]. Šiame disertaciniame darbe buvo parodyta, jog žiurkės inkstuose po išemijos *in vivo* dominuojantis kardiolipinas su keturiomis linolo rūgštimis buvo oksiduojamas, susiformuojant net aštuoniems oksidacijos produktams, kurių struktūroje nustatyta nuo vieno iki aštuonių papildomai prisijungusių deguonies atomų. Tokias formas pavyko aptikti prieš tai išanalizavus kardiolipino standartą ir sukėlus jo oksidaciją *in vitro* su citochromu C ir vandenilio peroksidu. Nors šiame darbe buvo įvertintas tik papildomai prisijungusių deguonies atomų kiekis bei preliminaros funkcinės grupės, kiti mokslininkai yra parodę, jog kardiolipino oksidacijos metu ant riebalų rūgščių gali susiformuoti hidroksi-, dihidroksi-, hidroperoksi-, epoksi- ir kitos grupės. Buland ir kt. nustatė, kad TLCL oksidacija su 2,2'-azobis(2-metilpropionamidino) dihidrochloridu, kardiolipinas oksiduojamas papildomai prijungiant nuo vieno iki septynių deguonies atomų [199]. Kim ir kt. papildomai pritaikė ir kardiolipino oksidaciją oro deguonimi bei naudojant fotodiodų šviesą su fotosensibilizatoriumi. Autoriai parodė, kad tokiais būdais oksiduojamas TLCL gali papildomai prisijungti iki keturių deguonies atomų, kurie suformuoja kardiolipino hidroksidus, monohidroperoksidas, bis-monohidroperoksidas ir dihidroperoksidas [187]. Panašius rezultatus gavo ir Maciel ir kt. panaudoję vandenilio peroksidą ir geležies chloridą TLCL oksidacijai *in vitro*, tačiau tarp oksidacijos produktų buvo aptikta ir įvairių fragmentų, parodančių, kad kardiolipino hidroperoksida gali

skilti oksidacijos metu. Autoriai taip pat vertino kardiopolipino oksidaciją Wistar žiurkės inkstuose veikiant nefrotoksiniam antibiotikui gentamicinui ir nustatė tetralinoleil-kardiopolipino hidroksidų ir hidroperoksidų [196]. Mūsų tyrimai parodė, kad išemijos *in vivo* metu žiurkės inkstų mitochondrijose tetralinoleil-kardiopolipino oksidacijos produktų kiekiai labiausiai padidėjo po 40 minučių, tačiau neoksiduoto TLCL kiekis reikšmingai sumažėjo jau po 30 minučių išemijos. Panašūs kardiopolipino kiekybiniai pokyčiai po išemijos buvo nustatyti ir kitų mokslininkų. 1980 metais Smith ir kt. nustatė, kad bendras kardiopolipino kiekis žiurkės inkstuose po 30 minučių *ex vivo* išemijos sumažėjo apie 13 proc., o po 60 minučių – 22 proc. [250]. 1991 metais, Nakahara ir kt. parodė jog 30 minučių trukmės *ex vivo* išemija neturėjo poveikio kardiopolipino kiekiui Wistar žiurkės smegenų mitochondrijose, tačiau po 60 minučių išemijos kardiopolipino kiekis sumažėjo net 51 proc. [251]. Paradise ir kt. 1999 metais izoliuotose Wistar žiurkių širdyse po 30 minučių *ex vivo* išemijos nustatė 28 proc. mažesnę kardiopolipino kiekį, lyginant su kontrole, taip pat parodė, kad lipidų peroksidacijos produkto malondialdehido kiekis po išemijos reikšmingai padidėjo [205]. Lesnefsky ir kt. analizuodami išemijos *ex vivo* poveikį vyresnio amžiaus Fischer 344 žiurkių širdies mitochondrijų struktūrai ir funkcijoms nustatė, kad po 25 minučių išemijos kardiopolipino kiekis nebuvo pakitęs, bet daugėjo kardiopolipino oksidacijos produkto su trim papildomais deguonies atomais [252]. Matoma, kad daugiausia tyrimų atlikta su izoliuotais organais, tačiau nepaisant to, nustatomos tos pačios tendencijos – jau išemijos metu kardiopolipinas yra oksiduojamas ir jo kiekis ima mažėti. Būtina paminėti, kad kardiopolipino kiekio sumažėjimas nebūtinai vyksta tik dėl jo oksidacijos, kardiopolipinas bei jo oksidacijos produktai gali būti ir hidrolizuojami. Smaalen ir kt. parodė, kad po subnormoterminės kiaulių inkstų *ex vivo* išemijos mažėja tetralinoleil-kardiopolipino ir daugėja jo hidrolizės produkto monolizokardiopolipino [253]. Dar vienas įdomus tyrimas atliktas Tam ir kt. parodė, kad Sprague-Dawley žiurkių smegenyse po 30 minučių širdies sustojimo *in vivo* reikšmingai padidėja kardiopolipino hidrolizės produkto monolizokardiopolipino. Inkstuose, širdyje ir kepenyse tokių pokyčių nebuvo pastebėta [25]. Reperfuzijos metu mitochondrijų elektronų pernašos grandinėje ima susidaryti dar didesni kiekiai aktyvių deguonies junginių, kurie lemia taip vadinamą oksidacinį pliūpsnį [254]. Šiame disertaciniame darbe po išemijos/reperfuzijos *in vivo* buvo nustatytas reikšmingas oksiduoto TLCL formų kiekio didėjimas ir neoksiduoto kardiopolipino individualių formų kiekio mažėjimas. Šie rezultatai koreliavo su inkstų mitochondrijų funkcijų pažeida, kuri buvo įvertinta mūsų laboratorijoje ankstesnių tyrimų metu. Kamarauskaitė ir kt. parodė, jog jau 30 minučių išemija ir 30 minučių reperfuzija *in vivo* slopino inkstų mitochondrijų deguonies suvartojimo greitį fosforilavimo būsenoje oksiduojant I komplekso substratus glutamatą ir malatą, o prailginus išemiją

iki 40 ir 60 minučių su 30 min. reperfuzija mitochondrijų deguonies suvartojimo greitis buvo toliau slopinamas visose metabolinėse būsenose bei didėjo mitochondrijų išorinės membranos pralaidumas. Tokie patys rezultatai gauti ir įvertinus mitochondrijų deguonies suvartojimo greitį visose būsenose su II komplekso substratu sukcinatu [215]. Panašius rezultatus gavo ir Allen ir kt., kurie sukėlė *ex vivo* išemiją/reperfuziją Sprague-Dawley žiurkių širdims ir parodė, kad 20 minučių išemija su 120 minučių reperfuzija lėmė reikšmingą mitochondrijų kvėpavimo greičio sumažėjimą fosforilinimo būsenoje, sumažino mitochondrijų kristų kiekį ir bendrą kardiolipino kiekį mitochondrijose [90]. Martens ir kt. atliko Wistar žiurkių kepenų išemiją/reperfuziją *in situ* ir nustatė, kad po 20 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos įvairių kardiolipinų kiekiai nepakito, lyginant su kontroline grupe, tačiau didėjo oksiduoto TLCL kiekis [207]. Rao ir kt. savo tyrimuose su mongolinėmis smiltpelėmis analizavo 10 minučių išemijos ir 24 valandų *in vivo* reperfuzijos poveikį priekinių smegenų lipidų kiekybiniais pokyčiams ir nustatė, kad išemija nesukėlė kardiolipino kiekio pakitimų, bet po reperfuzijos kardiolipino kiekis reikšmingai sumažėjo [181]. Paradies ir Petrosillo su kolegomis nagrinėjo 30 minučių išemijos ir 15 minučių reperfuzijos *ex vivo* poveikį žiurkių širdžių mitochondrijų funkcijoms ir nustatė, kad po išemijos/reperfuzijos reikšmingai padidėjo H_2O_2 kiekis bei oksiduoto kardiolipino kiekis mitochondrijose, taip pat buvo nuslopintas mitochondrijų kvėpavimo greitis bei sumažėjo bendras kardiolipino kiekis. Šie mokslininkai taip pat nustatė, kad po išemijos/reperfuzijos reikšmingai sumažėjo I, III ir IV mitochondrijų kvėpavimo grandinės kompleksų aktyvumas, kuris atsistatė į mitochondrijų suspensiją pridėjus liposomų su kardiolipinu [113,114,205]. Panašius rezultatus gavo ir Shao ir kt. panaudoję Sprague-Dawley žiurkės. Mokslininkai atliko *ex vivo* žiurkių širdžių išemiją/reperfuziją, o vienoje iš tiriamųjų grupių išemijos/reperfuzijos metu širdis paveikė liposomomis su kardiolipinu. Rezultatai parodė, kad 30 minučių išemija ir 20 minučių reperfuzija lėmė reikšmingą bendro kardiolipino kiekio mažėjimą žiurkių širdyse bei sukėlė širdies mitochondrijų lipidų oksidaciją. Taip pat išemija/reperfuzija reikšmingai slopino mitochondrijų kvėpavimo greitį su I bei su II komplekso substratais fosforilinimo būsenoje, bei I ir III komplekso aktyvumą, tačiau liposomos su kardiolipinu išemijos/reperfuzijos metu apsaugojo nuo mitochondrijų kvėpavimo ir kompleksų aktyvumo nuslopinimo. Panašus poveikis buvo stebimas ir vertinant H_2O_2 susidarymą mitochondrijose – išemijos/reperfuzijos metu H_2O_2 susidarymo greitis reikšmingai didėjo, tačiau buvo reikšmingai mažesnis, kai terpėje buvo liposomų su kardiolipinu [22]. Kardiolipino oksidacija, oksiduoto/neoksiduoto kardiolipino santykio didėjimas, bei lipidų peroksidacijos produktų susidarymas išemijos/reperfuzijos metu stebimas ir daugelyje kitų tyrimų [23,255]. Yra atlikta tyrimų vertinančių širdies veiklos sustabdymo ir atstatymo povei-

kį kitų organų funkcijoms bei kardiopolipino pokyčiams. Tam ir kt. parodė, kad žiurkių smegenyse po 30 minučių širdies išemijos ir 1 valandos reperfuzijos *in vivo* reikšmingai sumažėjo kardiopolipino kiekis bei padidėjo monolizokardiopolipino kiekis. Nors inkstuose nebuvo pastebėta jokių pokyčių, buvo nustatyta, kad vien širdies išemija lėmė sumažėjusį bendrą kardiopolipino kiekį kepenyse, o reperfuzija lėmė kardiopolipino kiekio atsistatymą, bet neturėjo poveikio monolizokardiopolipino kiekiui [25]. Panašiam tyrimui Ji ir kt. analizavo širdies išemijos ir reperfuzijos poveikį Sprague-Dawley postnatalinių žiurkių smegenų žievės fosfolipidams ir nustatė, kad 9 minučių širdies sustojimas ir 60 minučių reperfuzija nesukėlė bendro kardiopolipino kiekio pokyčių, tačiau lėmė padidėjusį lizokardiopolipino, oksiduoto kardiopolipino bei laisvų oksiduotų linolo riebalų rūgščių kiekius žiurkių smegenyse [21]. Tai parodo, jog širdies infarktas gali lemti kitų organų kardiopolipino kiekio ir struktūros pokyčius. Daugelyje šių atvejų parodoma, kad išemija/reperfuzija lemia kardiopolipino oksidaciją, kardiopolipino kiekio mažėjimą bei mitochondrijų funkcijų pažeidimus. Tačiau yra priešingų tyrimų, kurie parodė, jog išemija/reperfuzija gali ir neturėti jokio poveikio kardiopolipinui. Pavyzdžiui, vienas iš naujausių tyrimų, kurį atliko Liss ir kt., parodė, kad po *in vivo* kepenų išemijos 1 val./reperfuzijos 6 val. bendras kardiopolipino kiekis visiškai nepakito C57BL/6J pelių kepenų mitochondrijose. Net prailginus reperfuziją iki 24 val. ar net 72 val., bendras kardiopolipino kiekis kepenyse nesiskyrė nuo kontrolės [256]. Kiti mokslininkai įrodė, jog išemijos/reperfuzijos metu kardiopolipino kiekis gali ir padidėti. Pavyzdžiui, Suzanne M. de la Monte ir kt. vertino *in vivo* išemijos/reperfuzijos poveikį 118–122 dienų avies vaisiaus smegenų lipidams. Avies vaisiui dar esant gimdoje buvo sukurta 30 minučių trukmės smegenų išemija užspaudžiant miego arterijas, o atstačius kraujotaką sukurta reperfuzija, kuri truko nuo 4 iki 72 valandų. Tarp išanalizuotų smegenų fosfolipidų buvo įvertintos šešios kardiopolipino formos ir nustatyta, kad mažiausią molekulinę masę turinčio kardiopolipino (m/z 1441,6) santykinis kiekis buvo labiausiai padidėjęs po 30 min. išemijos ir 4 val. reperfuzijos, lyginant su kontrole, tačiau šio kardiopolipino kiekis labai sumažėjo ilginant reperfuzijos laiką. Didžiausią masę turinčio kardiopolipino (m/z 1572,2) santykinis kiekis buvo sumažėjęs išemijos/reperfuzijos metu. Buvo taip pat pastebėta tendencija, kad likusių keturių kardiopolipinų santykiniai kiekiai didėjo ilginant reperfuzijos trukmę iki 48 val., tačiau po 72 val. reperfuzijos ėmė mažėti. Tokia tendencija buvo pastebėta ir tarp kitų lipidų – fosfatidilcholino, fosfatidinės rūgšties, fosfatidilinozitolio manozido, sfingomielino, sulfatido ir kitų lipidų, kurių kiekiai reikšmingai didėjo po 30 min. išemijos ir 48 val. reperfuzijos, lyginant su kontrole grupe [257]. Tyrimai rodo, kad išemijos/reperfuzijos poveikis kardiopolipino kiekybiniams ir kokybiniais pokyčiams priklauso nuo išemijos ir reperfuzijos trukmės, tiriamo organizmo bei paties organo tipo. Nors išemijos/reperfuzijos

metu intensyvus oksidacinis stresas lemia kardiolipino oksidaciją ir hidrolizę, taip pat yra galimybė, jog aktyvinami tam tikri molekuliniai mechanizmai lemiantys kardiolipino resintezę, siekiant apsaugoti mitochondrijas ir ląsteles nuo kardiolipino ir mitochondrijų pažaidos. Kadangi šiame disertaciniame darbe nustatėme, jog po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos žiurkės inkstuose dominuojančio kardiolipino TLCL kiekis reikšmingai padidėja, lyginant su kontroline grupe, buvo išanalizuota su kardiolipino sinteze ir remodeliavimu susijusių fermentų genų raiška. Mūsų tyrimų metu buvo analizuojami trys su kardiolipino sinteze ir remodeliavimu susiję baltymai ir jų genų raiška – tai kardiolipino sintazė, lizokardiolipino aciltransferazė 1 (LCLAT1, arba acil-KoA-lizokardiolipino aciltransferazė 1 – ALCAT1) ir tafazinas. Visi šie fermentai eukariotuose yra koduojami branduolio DNR, tačiau kardiolipino sintazė su tafazinu yra lokalizuoti mitochondrijose, o LCLAT1 fermentas lokalizuojasi endoplazminio tinklo-mitochondrijų membranų kontaktinėse vietose [64,67,258–260]. Šiame darbe nustatėme, kad 60 minučių išemija *in vivo* reikšmingai didina kardiolipino remodeliavimo fermento tafazino genų raišką, tačiau išemijos metu nebuvo nustatytas kardiolipino kiekio didėjimas. Yra nustatyta, kad išemijos metu, esant energijos trūkumui bei endoplazminio tinklo stresui, baltymų sintezė ir jų procesingas yra nuslopinti, todėl nepaisant genų raiškos padidėjimo, t. y. informacinės RNR kiekio didėjimo, transliacijos procesas gali ir nevykti. Reperfuzijos metu, atsistačius deguonies kiekiui ląstelėje ir mitochondrijose, vyksta intensyvesnė ATP sintezė, dėl kurios gali vykti ir baltymų transliacija, tačiau net ir tada dėl oksidacinio streso baltymo susilankstymas iki optimalios struktūros gali būti sutrikdytas [261–264]. Mes parodėme, kad po 60 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos tafazino geno raiška išliko didesnė už kontrolės lygį, tačiau tafazino kiekis ar aktyvumas nebuvo analizuojamas, todėl galima tik spėti, kad ir paties fermento, kuris atsakingas kardiolipino remodeliavimą, kiekis didėjo. Įdomu, kad labiausiai didėjo kardiolipino būtent su keturiomis linolo riebalų rūgštimis. Tafazino specifiskumas riebalų rūgštims, o ypač linolo riebalų rūgščiai, buvo analizuojamas daugelio mokslininkų. Nustatyta, kad esant tafazino geno mutacijoms (Barto sindromui), mitochondrijose mažėja kardiolipino/monolizokardiolipino santykis, o į kardiolipiną įjungiamo mažiau linolo riebalų rūgšties. Tačiau taip pat yra atlikta tyrimų, kurių rezultatai parodė, jog tafazinas nepasižymi jokių specifiskumu riebalų rūgštims [78,265]. Yra žinoma, kad kardiolipino remodeliavimo procese veikiant tafazinui gali dalyvauti monolizokardiolipinas arba visas kardiolipinas [59], todėl kardiolipino kiekio padidėjimas reperfuzijos metu gali būti siejamas su monolizokardiolipino remodeliavimu prijungiant riebalų rūgštį ir suformuojant struktūriškai pilną kardiolipino molekulę. Analizuojant genų raišką šiame darbe parodyta, kad LCLAT1 geno raiška reikšmingai mažėjo po 30 minučių išemijos ir 30

minučių reperfuzijos ir išliko panašiam lygyje net ir prailginus išemijos laiką iki 60 minučių su 30 minučių reperfuzija. Tuo tarpu kardiolino sintazės geno raiška sumažėjusi po 30 minučių išemijos ir 30 minučių reperfuzijos atsistatė, kai išemijos trukmė buvo prailginta iki 60 minučių. Tikėtina, kad toks kardiolino sintazės geno raiškos atsistatymas galėjo prisidėti prie kardiolino kiekio padidinimo ir palaikymo žiurkės inkstų mitochondrijose išemijos/reperfuzijos metu. Kardiolino remodeliavimo reakcijose taip pat dalyvauja ir monolizokardiolino aciltransferazė 1 (MLCLAT1). Pastebėta, jog MLCLAT1 fermentas turėjo didesnę specifiskumą linolo riebalų rūgščiai nei oleino, o limfoblastuose su tafazino trūkumu padidinta MLCLAT1 raiška lėmė didesnę linolo rūgšties įjungimą į kardiolino struktūrą [69,70]. Nors šio fermento geno ar baltymo raiška disertaciniame darbe nebuvo tirta, jis galėjo prisidėti prie kardiolino kiekio didėjimo remodeliavimo metu.

4.3. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių gyvybingumui, mitochondrijų funkcijoms, oksidaciniam stresui

Detalesni kardiolino kokybinių ir kiekybinių pokyčių išemijos/reperfuzijos metu mechanizmai toliau buvo analizuojami panaudojant *in vitro* ląstelių kultūrų modelius. Šiame disertaciniame darbe buvo naudojama žmogaus inkstų RPTEC/TERT1 ląstelių kultūra. Ši RPTEC ląstelių linija buvo imortaliizuota hTERT transfekcijos būdu (indukuojant žmogaus telomerazės raišką RPTEC ląstelėse), tačiau buvo nustatyta, jog šios ląstelės po imortalizavimo išlaiko normalioms/pirminėms inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėms ląstelėms būdingą fenotipą (funkcijas, morfologiją, atsaką į hormonus ir kitas savybes) [266]. Inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelės vykdo intensyvią glomerulo filtrato reabsorbciją, todėl šiose ląstelėse energijos poreikis yra didelis ir priklauso nuo efektyvaus oksidacinio fosforilinimo, kurį užtikrina mitochondrijos. Dėl šių priežasčių inkstų proksimalinių kanalėlių ląstelės yra labai pažeidžiamos išemijos/reperfuzijos metu [267,268]. Šiame darbe buvo taikyti du *in vitro* hipoksijos/reoksigenacijos modeliai – *in vitro* hipoksinės sąlygos buvo sukurtos sumažinant atmosferos deguonies koncentraciją iki 2 proc., o ląstelių mitybinės terpės sudėtis nebuvo keičiama. Tačiau kitame modelyje buvo papildomai pridedama 2-deoksi-D-gliukozės, kuri slopina glikolizės procesą, siekiant sudaryti sąlygas artimesnės išemijai. Yra žinoma, jog deguonies koncentracija organuose yra žemesnė nei atmosferoje, taip pat įvairiuose audiniuose skiriasi, priklausomai nuo kraujagyslinės anatomijos ir atstumo iki širdies. Žmogaus inkstų audiniuose deguonies koncentracija yra apie 7 proc. arba apie 52 mmHg [269], todėl disertaciniame darbe sudarytos hipoksinės sąlygos buvo palyginti švelnios ir nesukėlė reikšmingos pažaidos ląstelėms – ląstelės išliko gyvybingos, tačiau sulėtėjo jų proliferacija. Pana-

šūs rezultatai buvo gauti kitų mokslininkų, kurie analizavo hipoksijos poveikį žmogaus sinovijos mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, kurios yra prisitaikiusios prie hipoksinių sąlygų. Zheng ir kt. parodė, kad šias ląsteles kultivuojant hipoksinėmis sąlygomis, kai deguonies koncentracija siekė 5 proc., gyvybingumas nesumažėjo. Ląstelės išliko gyvybingos net tada, kai deguonies koncentracija buvo sumažinta iki 0,5 proc., o ląstelių kultivavimas tęsėsi 7 dienas. Tiesa, tokia hipoksija nepaveikė ir ląstelių proliferacijos [270]. Naudojant išemijai/reperfuzijai artimesnius *in vitro* modelius arba pirmines ląstelių kultūras yra stebimas ryškesnis atsakas. Pavyzdžiui, Schäfer ir kt. [271] panaudojo išemijai/reperfuzijai artimą *in vitro* modelį su pirminėmis kiaulių aortos endotelio ląstelėmis. Ląstelės buvo 1 val. inkuojamos *in vitro* išemijos sąlygomis terpėje be serumo, gliukozės ir kitų mitybinių medžiagų bei laikant ląstelių kultūras atmosferoje su 100 proc. N₂. Po 1 val. hipoksijos ląstelės buvo inkubuotos įprastomis sąlygomis su mitybine terpe be serumo 24 val. ir tuomet buvo įvertintas ląstelių skaičius, kuris buvo reikšmingai didesnis už kontrolinę grupę. Taigi, šiuo atveju *in vitro* išemija/reperfuzija lėmė suintensyvėjusią ląstelių proliferaciją. Tačiau net ir pirminės ląstelės gali būti atsparios hipoksijai. Allen ir kt. įvertino hipoksijos (1 proc. O₂) poveikį pirminėms žmogaus placentos arterijų endotelio ląstelėms ir nustatė, jog gyvybingumas išliko didesnis nei 99 proc. net ir po 6 valandų hipoksijos [272]. Net ir tokios pačios ląstelės, bet iš skirtingų organizmų gali parodyti nevienodą atsaką į deguonies koncentracijos pokyčius. Eleftheriadis ir kt. naudojo žmogaus, C57BL/6 pelės ir Sirinio žiurkėno pirmines inkstų proksimalinių kanalėlių epitelines ląsteles, kurias kultivavo anoksinėmis sąlygomis (< 1 proc. O₂). Mokslininkai nustatė, kad žmogaus inkstų ląstelės žuvo po 4 val. anoksijos, pelės ląstelės žuvo po 48 val. anoksijos, o žiurkėno ląstelės išgyveno net po 120 val. anoksijos. Tuomet buvo analizuojamas reoksigenacijos poveikis ląstelių žūčiai po dvigubai trumpesnės trukmės hipoksijos, kuri sukėlė ląstelių žūtį ir buvo nustatyta, kad žmogaus ląstelių žūtis pasireiškė po 2 val. anoksijos ir 8 val. reoksigenacijos. Pelių ląstelės buvo jautresnės reoksigenacijai, jos žuvo po 24 val. anoksijos ir 4 val. reoksigenacijos. Žiurkėno ląstelės po 24 val. anoksijos ir 24 val. reoksigenacijos vis dar išlaikė savo morfologiją ir nerodė žūties požymių. Tokie rezultatai koreliavo ir su ląstelių žūtimi susijusiais veiksniais – laktato dehidrogenazės išsiskyrimo bei proapoptotinių veiksmų kiekio padidėjimu ląstelėse [273]. Ląstelių žūties suintensyvėjimą, proliferacijos slopinimą bei su ląstelių žūtimi susijusių veiksmų kiekio didėjimą *in vitro* išemijos/reperfuzijos metu stebėjo ir kiti mokslininkai analizavę C57BL/6 pelės kardiomiocitus [274], H9C2 žiurkių kardiomiocitus [275,276], žmogaus virkštelės venos endotelio ląsteles [277] ar žmogaus vainikinių arterijų endotelio ląsteles [278]. Kitų tyrimų metu gautas priešingas efektas – net 48 valandų trukmės hipoksija skatino žmogaus plaučių arterijų endotelio ląstelių

proliferaciją [279], o žmogaus inkstų HK-2 ląstelėse po 24 val. hipoksijos ir 12 val. reoksigenacijos apoptozės žymenų (aneksinu žymėto fosfatidilserino) bei prouždegiminių žymenų (naviko nekrozės veiksnys α , interleukino 6 ir 1 β) genų raiška buvo reikšmingai padidėjusi, tačiau po 24 val. reoksigenacijos sumažėjo iki kontrolės lygio [280].

Ląstelių gyvybingumo pokyčius hipoksijos/reoksigenacijos metu lemia įvairūs viduląsteliniai mechanizmai, tarp jų ir energijos (ATP) metabolizmo sutrikimai, kurie gali įvykti dėl mitochondrijų funkcijų pažeidimo. Šiame disertaciniame darbe buvo įvertintas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis žmogaus inkstų RPTEC ląstelių mitochondrijų kvėpavimui ir nustatyta, kad po 24 val. hipoksijos mitochondrijų kvėpavimo greičiai fosforilinimo ir elektronų pernašos (su skyrikliu dinitrofenoliu) būsenose buvo reikšmingai sumažėję, o po 24 val. reoksigenacijos padidėjo, tačiau neatsistatė iki kontrolės lygio. Apskaičiuotas citochromo C efektas parodė, jog hipoksija/reoksigenacija neturėjo poveikio mitochondrijų išorinės membranos laidumui, tačiau kvėpavimo kontrolės indeksas, rodantis oksidacinio fosforilinimo gebą, buvo ženkliai sumažėjęs tiek po hipoksijos tiek po reoksigenacijos. Panašūs rezultatai stebimi ir kitų mokslininkų atliktų eksperimentų metu. Allen ir kt. analizuodami pirminių žmogaus placentos arterijų endotelio ląstelių atsaką į 1 valandos hipoksiją/15 minučių reoksigenaciją nustatė, jog fosforilinimo būsenoje mitochondrijų kvėpavimas nepakito, lyginant su kontrole, tačiau ženkliai suintensyvėjo laidumo būsenoje, kas gali rodyti mitochondrijų vidinės membranos pažeidimą [272]. Adzigibli ir kt. nustatė, kad jau po 15 minučių anoksijos ir 10 minučių reoksigenacijos kiaulių smilkininio raumens ir smegenų gumburo ląstelių mitochondrijų kvėpavimas buvo užslopintas fosforilinimo būsenoje, taip pat nustatytas reikšmingai sumažėjęs citochromo C oksidazės (IV mitochondrijų kvėpavimo grandinės komplekso) aktyvumas. Autoriai papildomai įvertino ir aktyvių deguonies junginių susidarymą šiose ląstelėse, tačiau hipoksija/reoksigenacija neturėjo jokio poveikio, lyginant su kontrole [281]. Priešingai, mūsų atlikti tyrimai parodo, jog 24 val. reoksigenacija reikšmingai padidina aktyvių deguonies junginių (H_2O_2) susidarymo greitį RPTEC ląstelėse. Panašūs rezultatai buvo gauti tiriant hipoksijos/reoksigenacijos poveikį aktyvių deguonies junginių susidarymui pirminėse žmogaus, pelės ir žiurkėno inkstų ląstelėse [273], H9C2 žiurkių kardiomiocituose [275], žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelėse [277], žmogaus vainikinių arterijų endotelio ląstelėse [278]. Kituose eksperimentuose buvo nustatyta, kad jau pati hipoksija gali sukelti reikšmingą H_2O_2 kiekio didėjimą, tiek ūmios hipoksijos atvejais (5 minučių trukmės) [271,282,283], tiek ilgalaikės (iki 48 val.) [279]. Didėjantis aktyvių deguonies junginių kiekis ląstelėse sukelia oksidacines pažeidas reaguodamas su įvairiomis makromolekulėmis, įskaitant membraninius lipidus, tokiu atveju didėja lipidų peroksidacijos produktų (malondialdehido,

4-HNE) kiekiai [20]. Šiame disertaciniame darbe parodyta, kad po hipoksijos/reoksigenacijos RPTEC ląstelėse reikšmingai padidėjo malondialdehido kiekis, tai koreliavo su padidėjusiu aktyvių deguonies junginių susidarymo greičiu. Toks rezultatas parodo, jog yra oksiduojami RPTEC ląstelių lipidai, tačiau neįrodo, kad yra oksiduojamas būtent kardiolipinas. Kadangi kardiolipino standartų įvairovė rinkoje yra ribota, šiame darbe nebuvo analizuojami konkretūs kardiolipino oksidacijos produktai RPTEC ląstelėse. Nors tokia analizė buvo atlikta su TLCL oksidacijos produktais iš žiurkės inkstų mitochondrijų, TLCL nėra dominuojantis RPTEC ląstelėse, todėl buvo netikslinga vertinti tik TLCL oksidacijos produktus ir buvo vertinama bendra lipidų oksidacija ląstelėse.

4.4. Hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* poveikio žmogaus inkstų RPTEC ląstelių kardiolipinui molekuliniai mechanizmai

Analizuojant kardiolipiną RPTEC ląstelėse pirmiausia buvo įvertintas bendras kardiolipino kiekis fluorimetriniu metodu naudojant kardiolipinui specifinį dažą NAO. Rezultatai parodė, jog po hipoksijos/reoksigenacijos bendras kardiolipino kiekis RPTEC ląstelėse reikšmingai didėjo. Panaudojant chromatografiją-masių spektrometriją buvo nustatyta, kad beveik visų individualių kardiolipinų santykiniai kiekiai reikšmingai didėjo jau po 24 val. hipoksijos, o po 24 val. reoksigenacijos didžiosios dalies kardiolipinų kiekiai sumažėjo, tačiau nepasiekė kontrolės lygio. Didelė dalis rezultatų aprašomi mokslinėje literatūroje rodo, jog *in vitro* hipoksija/reoksigenacija (ar *in vitro* išemija/reperfuzija) lemia kardiolipino kiekio mažėjimą. Tokius rezultatus gavo Sharma ir kt. kurie nustatė sumažėjusį NAO fluorescencijos intensyvumą H9C2 žiurkių kardiomiocituose po 5 val. hipoksijos/2 val. reoksigenacijos. Šie mokslininkai taip pat nustatė ląstelėse daugiau nei du kartus padidėjusį 4-HNE kiekį po hipoksijos/reoksigenacijos [275]. Zhou ir kt. izoliavo C54BL/6 pelių širdžių kraujagyslių endotelio ląsteles ir 30 minučių kultivavo jas hipoksinėmis sąlygomis imituojant išemiją (bedeguoninėje aplinkoje, druskų tirpale be serumo, rūgštiniame pH), tuomet buvo sukurta reoksigenacija/reperfuzija ląsteles kultivuojant įprastomis sąlygomis mitybinėje terpėje 2 valandas. Mokslininkai nustatė jog *in vitro* išemija/reperfuzija lėmė bendro kardiolipino kiekio sumažėjimą ir kardiolipino oksiduotų formų kiekio didėjimą [284]. Panašų *in vitro* modelį panaudojo Chu ir kt. su H9c2 kardiomiocitų linija ir nustatė, kad po 2 val. hipoksijos/1 val. reoksigenacijos kardiolipino kiekis taip pat buvo sumažėjęs [276]. Eleftheriadis ir kt. analizavo anoksijos/reoksigenacijos poveikį pirminėms žmogaus inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėms ląstelėms ir parodė, jog po 2 val. anoksijos ir 4 val. reoksigenacijos reikšmingai padidėjo aktyvių deguonies junginių, malondial-

dehido bei baltymų, modifikuotų 4-HNE, kiekiai, kas parodo suintensyvėjusią lipidų peroksidaciją [285]. Wu ir kt. parodė, kad po 4 val. hipoksijos/4 val. reoksigenacijos žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelėse didėjo aktyvių deguonies junginių kiekis, sumažėjo antioksidantų superoksido dismutazės, glutationo peroksidazės aktyvumas, taip pat sumažėjo glutationo kiekis bei mitochondrijų kardiopolipino kiekis [277]. Wiswedel ir kt. tyrė hipoksijos/reoksigenacijos poveikį izoliuotoms žiurkių smegenų mitochondrijoms. Po 10 minučių hipoksijos/5 minučių reoksigenacijos kardiopolipino kiekis mitochondrijose reikšmingai sumažėjo. Siekdamį imituoti išemijos/reperfuzijos sąlygas mokslininkai papildomai į terpę su mitochondrijomis pridėjo Ca^{2+} , jo koncentraciją terpėje didino iki $1,8 \mu\text{M}$ ir pastebėjo, kad didėjant Ca^{2+} koncentracijai, proporcingai mažėjo kardiopolipino kiekis po hipoksijos/reoksigenacijos [286]. Yra žinoma, jog išemijos/reperfuzijos metu didėja viduląstelinio Ca^{2+} kiekis, kuris ne tik sukelia mitochondrijų nespecifinio pralaidumo poros atsi-vėrimą bei membranos depoliarizaciją, tačiau taip pat prisideda prie aktyvių deguonies junginių susidarymo dėl kurio kardiopolipinas gali būti dar labiau oksiduojamas. Taip pat *in vitro* tyrimai parodė, jog padidėjusi kalcio jonų koncentracija gali keisti membranos lipidų, taip pat ir kardiopolipino, išsidėstymą, o tai lemia padidėjusį kardiopolipino jautrumą peroksidacijai [255,287]. Mūsų tyrimai parodė, kad po 24 val. reoksigenacijos, lyginant su hipoksijos grupe, labiausiai sumažėjo kardiopolipino su ilgos grandinės polinesočiosiomis riebalų rūgštimis, kurios yra labiausiai jautrios oksidacijai. Toks sumažėjimas gali vykti dėl oksidacijos aktyviais deguonies junginiais, tačiau taip pat ir dėl suaktyvėjusios hidrolizės. Mes parodėme, jog po 24 val. reoksigenacijos reikšmingai padidėja mitochondrijų fosfolipazės $\text{A}_2\gamma$ kiekis RPTEC ląstelėse, kuri gali hidrolizuoti kardiopolipiną ir taip lemti jo kiekio mažėjimą reoksigenacijos metu. Siekdamį išsiaiškinti kardiopolipino kiekio didėjimą hipoksijos/reoksigenacijos metu, atlikome kardiopolipino sintezės ir remodeliavimo fermentų (kardiopolipino sintazės, LCLAT1 ir tafazino) genų raiškos analizę, bei pačių fermentų kiekybinę analizę. Stebėjome tendenciją, kad hipoksijos metu didėjo kardiopolipino sintazės ir LCLAT1 fermentų genų raiška bei pačių fermentų kiekis, o po 24 val. reoksigenacijos šių fermentų genų raiška ir fermentų kiekis RPTEC ląstelėse buvo reikšmingai padidėję, lyginant su kontrole. Įdomu tai, kad tiek bendras kardiopolipino kiekis, tiek minėtų fermentų kiekiai ir jų genų raiška ėmė didėti jau hipoksijos metu, vadinasi jau esant deguonies trūkumui gali būti įjungiami apsauginiai mechanizmai, siekiant sumažinti kardiopolipino pažeidimą. Visgi padidėjusi LCLAT1 raiška nebūtinai gali reikšti apsauginį mechanizmą, nes mokslinėje literatūroje yra duomenų apie LCLAT1 fermento sąsajas su oksidaciniu stresu, nespecifiniu kardiopolipino remodeliavimu bei padidėjusia kardiopolipino oksidacija. Buvo nustatyta, kad padidėjusi LCLAT1 raiška lemia kardiopolipino su linolo rūgštimis kiekio

mažėjimą ir kardiolipino su ilgos grandinės riebalų rūgštimis kiekio didėjimą, taip pat intensyvesnę aktyvių deguonies junginių sintezę. Panašūs procesai stebimi ir miokardo infarkto metu [68,82,84,288,289]. Mūsų tyrimai taip pat parodė, jog reoksigenacijos metu didėja tiek LCLAT1 geno raiška, paties fermento kiekis kartu su H_2O_2 sintezės greičiu bei lipidų peroksidacijos produkto malondialdehido kiekis. Nors šie procesai per 24 val. reoksigenacijos trukmę neturėjo įtakos ląstelių žūčiai, mitochondrijų funkcija išliko pažeista. Yra galimybė, jog padidėjęs LCLAT1 aktyvumas galėjo lemti patologinį kardiolipino remodeliavimą, suformuojant RPTEC ląstelėms nebūdingas kardiolipino formas, kurių chromatografijos metu mes neidentifikavome, ir būtent dėl šių formų bendras kardiolipino kiekis galėjo išlikti padidėjęs po reoksigenacijos ir nulemti nuslopintą mitochondrijų funkciją.

Vienas svarbiausių iš veiksnių, kontroliuojančių ląstelių atsaką hipoksijos metu, yra HIF-1 α veiksnys, kuris lemia ląstelių prisitaikymą hipoksinėmis sąlygomis, keisdamas daugelio genų raišką [290]. Deja, nėra duomenų ar šis veiksnys valdo kardiolipino sintazės, LCLAT1 ar tafazino genų raišką. Šiame disertaciniame darbe buvo išanalizuotas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis HIF-1 α veiksnio kiekiui RPTEC ląstelėse, tačiau reikšmingų pokyčių nebuvo pastebėta, tik tendencija didėti reoksigenacijos metu. Mokslinėje literatūroje aprašomas įvairus HIF-1 α veiksnio atsakas į hipoksiją/reoksigenaciją. Pavyzdžiui kultivuojant žmogaus sinovijos mezenchimines kamienines ląsteles hipoksinėmis sąlygomis septynias dienas, buvo nustatyta padidėjusi HIF-1 α veiksnio raiška [270], tačiau pirminėse žmogaus placentos arterijų endotelio ląstelėse hipoksijos metu HIF-1 α baltymo kiekis didėjo pirmas dvi valandas, tuomet ėmė mažėti, o HIF-1 α geno raiška buvo taip pat stabili dvi valandas, bet po to ėmė mažėti [272]. Potteti ir kt. nustatė, jog pirminėse pelių inkstų proksimalinių kanalėlių epitelinėse ląstelėse po 30 minučių, 1 val., 2 val. ar net 12 val. hipoksijos HIF-1 α veiksnio kiekis padidėja, tačiau net ir po 12 val. hipoksijos HIF-1 α veiksnio geno raiška nekinta [291]. Kituose tyrimuose 15 minučių anoksija ir 10 minučių reoksigenacija turėjo skirtingą poveikį HIF-1 α geno raiškai kiaulių smilkininio raumens ir smegenų gumburo ląstelėse – hipoksija neturėjo poveikio HIF-1 α geno raiškai, o reoksigenacija padidino šio geno raišką raumenų ląstelėse, bet sumažino smegenų ląstelėse [281]. Nors nėra aišku, ar išvis HIF-1 α turi poveikį kardiolipino resintezei/remodeliavimui hipoksijos/reoksigenacijos metu, yra duomenų, kad sutrikęs kardiolipino remodeliavimas dėl tafazino trūkumo hipoksijos metu lemia HIF-1 α slopinimą ir dėl to sumažėjusį ląstelių atsaką į hipoksiją. Chowdhury ir kt. pelės embrioniniuose fibroblastuose sukėlė tafazino geno (*TAZ*) deleciją ir nustatė padidėjusį monolizokardiolipino kiekį, sumažėjusį mitochondrijų kvėpavimo grandinės superkompleksų stabilumą bei sumažėjusį mitochondrijų membranos potencialą. Hipoksijos metu (1 proc. O_2 , 24 val.) HIF-1 α

baltymo kiekis taip pat buvo sumažėjęs, lyginant su kontroline grupe (su funkcionali *TAZ* genu), kuriai buvo sukelta 24 val. hipoksija. HIF-1 α geno raiška ląstelėse su *TAZ* mutacija nesikeitė po 24 val. hipoksijos, o sveikose ląstelėse padidėjo daugiau nei du kartus. [224]. Kiti mokslininkai parodė, kad efektyviai HIF-1 α veiksnio raiškai reikalingas funkcionuojantis LCLAT1 (ALCAT1) kardiolipino remodeliavimo fermentas. Jia ir kt. nustatė, kad pirminiuose pelių kardiomiocituose bei H9c2 ląstelėse, kuriose LCLAT1 fermentas nuslopintas dafaglitapinu arba pašalintas LCLAT1 genas, HIF-1 α raiška yra ženkliai sumažėjusi, terpėje esant CoCl₂, kuris didino HIF-1 α raišką kontrolinėse ląstelėse [82]. Mūsų tyrimuose hipoksijos/reoksigenacijos metu *in vitro* nei tafazino geno raiška nei fermento kiekis RPTEC ląstelėse nekito, tačiau didėjo LCLAT1 geno raiška ir baltymo kiekis, todėl tokie pokyčiai galėjo turėti įtakos ir HIF-1 α atsakui RPTEC ląstelėse. HIF-1 α veiksnio vaidmuo kardiolipino sintezės/remodeliavimo procesuose gali pasireikšti ir kitokiais būdais. Pavyzdžiui, yra parodyta, jog HIF-1 α raiškos sumažėjimas lemia kardiolipino kiekio sumažėjimą HCT116 storosios žarnos vėžio ląstelėse. Tai buvo siejama su *ACSL5* geno, koduojančio fermentą acil-KoA sintetazės 5 raiška, kuri taip pat sumažėjo esant HIF-1 α trūkumui. Šis fermentas, ir kitos jo izoformos (pvz., *ACLS1*) dalyvauja fosfolipidų sintezėje formuojant aktyvuotas ilgos grandinės riebalų rūgštis (acil-KoA), tačiau taip pat yra siejamas su kardiolipino sintezės valdymu [292–295].

Verta turėti omenyje, jog mūsų pritaikytame hipoksijos/reoksigenacijos *in vitro* modelyje buvo keičiama tik atmosferos dujų sudėtis, tačiau ne mitybinės terpės sudėtis, todėl atliekant eksperimentus buvo vertinamas tik deguonies kiekio pokyčio poveikis. Hipoksijos/reoksigenacijos metu RPTEC ląstelėms buvo prieinamos visos mitybinės medžiagos energijai sintetinti, todėl nenuostabu, kad ir kardiolipino sintezė ir remodeliavimas vyko aktyviai. Inkstų ląstelėse, ypač proksimalinių kanalėlių epitelio ląstelėse, energijos sintezė (ATP sintezė) vyksta oksidacinio fosforilinimo būdu, labiausiai vykdant riebalų rūgščių β -oksidaciją, oksiduojant aminorūgštis, tačiau ne gliukozę, nors jose gliukozės koncentracija yra didelė. Įvairių inkstų pažeidimų metu, taip pat ir išemijos metu, riebalų rūgščių β -oksidacija yra slopinama, tačiau glikolizės intensyvumas gali didėti [296]. Viename iš tokių tyrimų Yang ir kt. inkubavo žmogaus inkstų HK-2 ląsteles hipoksinėmis sąlygomis (1 proc. O₂, terpėje be serumo ir gliukozės, 24 val.) ir vėliau perkėlė į įprastas auginimo sąlygas iki 24 val. Analizuodami ląstelių metabolizmą mokslininkai pastebėjo, kad po hipoksijos/reoksigenacijos HK-2 ląstelių energijos metabolizmas gali persijungti nuo riebalų rūgščių oksidacijos į aktyvesnę glikolizę. Lipidomikos analizė parodė, kad po hipoksijos/reoksigenacijos ląstelėse daugėjo fosfatidilglicerolio, kuris yra tarpinis kardiolipino sintezės *de novo* produktas [280,297]. Nors šiame darbe nebuvo tirtas RPTEC ląstelių glikolitinis akty-

vumas, inkstų ląstelių metabolizmo perprogramavimas į aktyvesnę glikolizę hipoksijos/reoksigenacijos metu galėtų palikti daugiau laisvų riebalų rūgščių, kurios galėtų būti panaudotos kardiopolipino sintezei ir/ar remodeliavimui. Įdomų dalyką nustatė mokslininkai, tyrinėję hipoksijos poveikį kardiopolipino kiekiui žiurkių kepenyse – O'Brien ir kt. laikė Sprague Dawley žiurkės 10 proc. deguonies atmosferoje 2 arba 14 dienų ir nustatė, kad po 2 dienų hipoksijos tetralinoleil-kardiopolipino kiekis žiurkių kepenyse reikšmingai padidėjo, tačiau po 14 dienų sumažėjo ir nesiskyrė nuo kontrolės lygio. Taip pat buvo pastebėta, kad po 2 dienų hipoksijos žiurkių kepenyse susidarė didesnis kiekis mitochondrijų kvėpavimo grandinės superkompleksų, lyginant su normoksija [298]. Deja, mokslininkai neanalizavo kitų kardiopolipinų bei tetralinoleil-kardiopolipino kiekio didėjimo priežasčių.

Kitoje mūsų eksperimentų serijoje buvo pritaikytas *in vitro* hipoksijos/reoksigenacijos metodas su 2-deoksi-D-gliukoze, kuri slopina glikolizės procesą RPTEC ląstelėse hipoksijos metu. Glikolizės procesas slopinamas, kai 2-dG yra fosforilinama fermento heksokinazės ir susidaręs 2-deoksi-D-gliukozės-6-fosfatas ima slopinti pačią heksokinazę ir kitą glikolizės fermentą gliukozės-6-fosfato izomerazę [226]. Ankstesni mūsų atlikti tyrimai parodė, jog 2-dG neturėjo poveikio kontrolinės grupės RPTEC ląstelių gyvybingumui, tačiau slopino proliferaciją bei mitochondrijų kvėpavimą fosforilinimo būsenoje, o hipoksijos/reoksigenacijos su 2-dG poveikis ląstelių gyvybingumui, proliferacijai ir mitochondrijų funkcijoms buvo toks pat kaip ir šiame darbe aprašytas hipoksijos/reoksigenacijos poveikis be 2-dG (rezultatai nepublikuoti). Šiame darbe pirmiausia buvo įvertintas 2-dG poveikis kontrolinių ląstelių kardiopolipinui ir buvo nustatyta, jog kontrolinėje RPTEC ląstelių grupėje po 24 val. inkubacijos su 2-dG bendras kardiopolipino kiekis (vertintas su NAO) nesikeitė, tačiau ženkliai didėjo individualių kardiopolipinų santykiniai kiekiai. Toks pokytis koreliavo su beveik dukart padidėjusiu tafazino kiekiu kontrolinėje RPTEC ląstelių grupėje su 2-dG, tačiau šio fermento geno raiška buvo nepakitusi. Literatūroje nėra daug informacijos apie 2-dG poveikį kardiopolipino kiekybiniais pokyčiams mitochondrijose ar poveikį kardiopolipino sintezei. Viena iš 2022 m. publikuotų tyrimų Aiestaran-Zelaia ir kt. parodė, jog pelių girdymas vandeni su 2-dG lėmė padidėjusį fermento citidino difosfato – diacilglicerolio sintazės 2 kiekį pelių širdyse. Šis fermentas yra vienas iš kardiopolipino sintezės *de novo* kelio fermentų [299]. Ankstesniuose tyrimuose Danos ir kt. inkubavo žiurkės širdies H9c2 ląsteles su 100 mM 2-dG ir nustatė, jog po 16 val. inkubacijos daugiau nei 50 proc. ląstelių žuvo, o išgyvenusiose ląstelėse nustatė, kad kardiopolipino *de novo* sintezės fermentų (kardiopolipino sintazės, citidino difosfato – diacilglicerolio sintazės ir fosfatidilglicerolio fosfato sintazės) aktyvumas nepakito, tačiau reikšmingai padidėjo mitochondrijų fosfolipazės A₂ ir monolizokardiopolipino aciltransferazės

aktyvumas, o ALCAT1 aktyvumas sumažėjo. Visgi, inkubacija su 2-dG nekeitė kardiolino kiekio ar riebalų rūgščių sudėties H9c2 ląstelių kardiolino [300]. Tokie tyrimai parodė, jog mūsų eksperimentuose didėjantis kardiolino kiekis gali būti susijęs su kitų, disertaciniame darbe netirtų, fermentų aktyvumu. Tiesa, nėra žinoma, kokie mechanizmai aktyvina šiuos fermentus ar kitus procesus, galinčius prisidėti prie kardiolino kiekio didėjimo – ar tai atsakas į glikolizės slopinimą per 2-deoksigliukozę, pačios 2-dG ar jos metabolito 2-dG-6-fosfato poveikis fermentams. Analizuojant hipoksijos/reoksigenacijos su 2-dG poveikį RPTEC ląstelių kardiolinui buvo nustatyta, kad po 24 val. hipoksijos su 2-dG tiek bendro kardiolino kiekis, tiek individualių kardiolinų kiekiai reikšmingai mažėjo. Kardiolino sumažėjimas hipoksijos su 2-dG metu galėjo būti susijęs su padidėjusiais H_2O_2 bei fosfolipazės $A_2\gamma$ kiekiais RPTEC ląstelėse, taip pat su sumažėjusiu kardiolino sintazės ir tafazino kiekiu. Tiesa, visose grupėse su 2-dG H_2O_2 susidarymo greitis yra padidėjęs, toks aktyvių deguonies junginių atsakas į 2-deoksigliukozę stebimas ir kituose tyrimuose, kartu nustatant ir kardiolino kiekio mažėjimą [301–303]. Reoksigenacija atstatė bendrą kardiolino kiekį iki kontrolės lygio, tai galėjo vykti dėl atsistatęs tafazino kiekio ląstelėse. Pastebėta tendencija, kad reoksigenacijos metu kardiolino sintazės ir lizokardiolino aciltransferazės 1 kiekiai taip pat ima didėti reoksigenacijos metu, kas taip pat galėjo prisidėti prie bendro kardiolino kiekio atsistatymo. RPTEC ląstelių atsakas į 2-deoksigliukozę kontrolinėje grupėje ir hipoksijos/reoksigenacijos metu skyrėsi nuo pirmiau naudoto *in vitro* hipoksijos/reoksigenacijos modelio. Tačiau parodo galimus kardiolino kiekybinių ir kokybinių pokyčių mechanizmus vykstančius *in vivo* išemijos/reperfuzijos metu.

Apibendrinant rezultatus, galima teigti, jog išemijos/reperfuzijos metu inkstuose vyksta kardiolino oksidacija ir jo kiekio mažėjimas, tačiau taip pat įjungiami kardiolino resintezės mechanizmai, kurie gali veikti kaip apsauginis atsakas į procesus, sukeliančius mitochondrijų ir ląstelių pažeidimą – kardiolino ir kitų fosfolipidų oksidaciją ir hidrolizę, aktyvių deguonies junginių kiekio didėjimą bei mitochondrijų funkcijų slopinimą. Šiame darbe panaudojant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos metodus buvo parodyta skirtinga kardiolino įvairovė tiek žiurkės inkstuose tiek žmogaus inkstų RPTEC/TERT1 ląstelių linijoje, tai leidžia dar labiau suprasti mitochondrijų lipidų metabolizmą. Pasitelkus *in vivo* žiurkės inkstų išemijos/reperfuzijos metodą parodyta, jog dominuojantis tetralino-leil-kardiolipinas inkstų mitochondrijose gali būti intensyviai oksiduojamas, o tai leidžia suprasti kardiolino pažeidimo mastą išemijos/reperfuzijos metu. *In vitro* tyrimai su žmogaus RPTEC ląstelėmis atskleidė kardiolino kiekybinių pokyčių mechanizmus hipoksijos/reoksigenacijos metu ir parodo potencialius taikinius biologiškai aktyviems apsauginiams junginiams, kurie

galėtų užkirsti kelią išemijos/reperfuzijos sukeliamai mitochondrijų ir ląstelės pažeidai. Metodiniu aspektu, *in vitro* tyrimai taip pat parodė poreikį vystyti išemijos/reperfuzijos *in vitro* modelius, kurie labiau atspindėtų *in vivo* sąlygas.



4.4.1 pav. Apibendrinanti schema apie išemijos/reperfuzijos poveikį inkstų mitochondrijų kardiolinui

IŠVADOS

1. Išemija ir išemija/reperfuzija *in vivo* reikšmingai sumažina visų tirtų kardiolipinų kiekį žiurkės inkstų mitochondrijose, išskyrus tetralino-leil-kardiolipino. Reperfuzija šio kardiolipino kiekį mitochondrijose padidina 1,8 karto.
2. Hipoksija/reoksigenacija *in vitro* didina kardiolipino kiekį žmogaus inkstų ląstelėse: hipoksijos metu individualių kardiolipino formų kiekis padidėja iki 22,5 karto, reoksigenacijos metu kardiolipino kiekis išlieka didesnis už kontrolę.
3. Išemija/reperfuzija sukelia tetralinoleil-kardiolipino oksidaciją žiurkės inkstų mitochondrijose, kardiolipinas oksiduojamas papildomai prijungiant nuo vieno iki aštuonių deguonies atomų.
4. Hipoksija/reoksigenacija sukelia visų lipidų peroksidaciją žmogaus inkstų ląstelėse: a) aktyvių deguonies junginių susidarymo greitis padidėja 1,8 karto; b) malondialdehido kiekis padidėja du kartus; c) fosfolipazės $A_2\gamma$, kuri hidrolizuoja oksiduotą kardiolipiną, kiekis išauga 2,2 karto.
5. Kardiolipino remodeliavimo fermento tafazino geno raiška padidėja po 60 minučių išemijos bei po 60 minučių išemijos/30 minučių reperfuzijos *in vivo* žiurkės inkstų mitochondrijose.
6. Hipoksija/reoksigenacija *in vitro* žmogaus inkstų ląstelėse aktyvina kardiolipino sintazės ir remodeliavimo fermento lizokardiolipino acil-transferazės 1 genų raišką, todėl šių fermentų kiekis taip pat didėja.

SUMMARY

INTRODUCTION

Cardiolipin is a unique phospholipid that has an intricate structure and is mostly found in the mitochondrial membranes of eucaryotic cells. The dimeric molecular structure of cardiolipin is composed of a central glycerol fragment that binds two phosphatidyl moieties, each of them containing two fatty acids. Such complicated structure allows cardiolipin to possess function-specific properties – the ability to form non-bilayer hexagonal structures in membranes, gain negative charge and interact with proteins [1,2]. This unique structure of cardiolipin is formed by the *de novo* synthesis mechanism and the composition of the fatty acids is controlled by the remodeling process which forms tissue/organ-specific cardiolipin [3]. During the remodeling of cardiolipin a variety of mono- and polyunsaturated fatty acids are incorporated, therefore, there is a great structural diversity of cardiolipins. However, it has been determined that in mammalian mitochondrial cardiolipin the predominant fatty acid is linoleic acid and tetra-linoleoyl cardiolipin (cardiolipin with four linoleic acids) is the dominant cardiolipin form [4]. Due to the specific molecular properties, cardiolipin has an important role in mitochondrial and cellular homeostasis. Cardiolipin is crucial during formation of mitochondrial cristae and is necessary in mitochondrial membrane dynamics – the process of mitochondrial membrane fission and fusion [5,6]. Cardiolipin is vital for the stability and optimal function of mitochondrial oxidative phosphorylation system complexes [7]. Cardiolipin plays an important role in mitochondrial autophagy as well as cellular apoptosis [8,9]. Changes in cardiolipin structure or its levels in the mitochondria results in impaired mitochondrial function which leads to further damage in the cells, tissues and organs [10]. Since cardiolipin is located with mitochondrial electron transport chain complexes, which generate reactive oxygen species, and due to the polyunsaturated fatty acids, that are present in its structure, cardiolipin can become the first target for oxidation during pathology. Cardiolipin structure, properties and interaction with proteins are altered during its oxidation which leads to impaired mitochondrial function [11,12]. Cardiolipin oxidation generates a variety of products that also include the products of the fragmentation of oxidized cardiolipin which can induce further damage to mitochondria and cells [13]. Intensive oxidation of cardiolipin occurs during oxidative stress when the generation of reactive oxygen species is substantially elevated in the mitochondria. Oxidative stress is especially involved in ischemia/reperfusion injury [14]. During ischemia, when arterial blood flow is compromised, the

lack of oxygen and nutrients in the cells cause damage to mitochondrial structure and function which can be irreversible, depending on the duration of ischemia. When the blood flow is restored during reperfusion the oxidative damage is exacerbated which can lead to cell death [15]. Like the heart, kidneys are metabolically active organs, and their function depends on an effective energy metabolism in aerobic conditions. Therefore, impaired arterial blood flow and lack of oxygen supply to the kidneys during ischemia/reperfusion may lead to long-term renal damage. Renal proximal tubules are especially sensitive to alterations in oxygen levels since they have limited capacity to generate energy in the absence oxygen [16,17]. Ischemia/reperfusion injury in the kidneys occurs not only in pathological conditions like impaired heart rhythm, shock, sepsis or trauma, but also it is induced during surgeries such as kidney transplantation. Ischemia/reperfusion in the kidneys may lead to cell death, atrophy of renal structures, tissue fibrosis, long-term functional impairment and even death. Acute kidney injury caused by ischemia/reperfusion remains a big problem with few effective treatments and not many options for prevention [18,19]. There is almost no data on cardiolipin alterations during renal ischemia/reperfusion. There are data on experimental research of cardiolipin alterations in other organs like the heart and the brain, however, there is still a lack of information about renal cardiolipins and their structural and quantitative alterations during renal ischemia/reperfusion. Also, some research show that cardiolipin level is unchanged during ischemia/reperfusion despite increasing amounts of cardiolipin oxidation products [20–23]. This indicates that certain molecular mechanisms can be activated during ischemia/reperfusion in order to sustain cardiolipin levels in the mitochondria and to protect cardiolipin and mitochondria from ischemia/reperfusion injury. However, there is no information about the molecular mechanisms of cardiolipin resynthesis during ischemia/reperfusion. Comprehensive analysis is needed to reveal the molecular mechanisms implicated in structural and quantitative alterations of cardiolipin in renal mitochondria during ischemia/reperfusion.

In this work we analyze the effect of ischemia/reperfusion *in vitro* and *in vivo* on the alterations of cardiolipin structure and levels in renal mitochondria as well as the molecular mechanisms involved in cardiolipin injury and resynthesis. The investigation was carried out using rat kidney ischemia/reperfusion *in vivo* model and hypoxia/reoxygenation *in vitro* model with human renal cells, which also allowed us to compare the mechanisms of cardiolipin injury in the mitochondria of different organisms.

Aim

To investigate the effect of ischemia and ischemia/reperfusion on the molecular mechanisms involved in quantitative and qualitative alterations of cardiolipin in kidney mitochondria.

Objectives:

1. To investigate the effect of ischemia and ischemia/reperfusion *in vivo* and *in vitro* on the alterations in cardiolipin levels in kidney mitochondria.
2. To evaluate the effect of ischemia and ischemia/reperfusion on cardiolipin oxidation and determine possible oxidation products.
3. To assess the effect of ischemia and ischemia/reperfusion on cardiolipin resynthesis.

The novelty of the scientific work

The effect of ischemia/reperfusion on cardiolipin alterations in the mitochondria of heart and brain is still under investigation; however, it is known that the level of damage caused by ischemia/reperfusion varies among different organs. Therefore, damage to cardiolipin during ischemia/reperfusion may not be the same in different organs [20,24,25]. The molecular mechanisms of cardiolipin alterations during renal ischemia/reperfusion are not sufficiently investigated. In this work we showed for the first time that already during renal ischemia *in vivo* in rat kidney mitochondria tetralinoleoyl cardiolipin is oxidated by adding one to eight oxygen atoms. We also showed that tetra-linoleoyl cardiolipin oxidation products significantly increase during ischemia *in vivo*. Our analysis showed that the levels of all cardiolipin species significantly decrease in rat kidney mitochondria after *in vivo* ischemia. It was determined that after ischemia/reperfusion *in vivo* in rat kidney mitochondria the levels of all cardiolipin species significantly decrease; however, the level of tetra-linoleoyl cardiolipin significantly increases. In this work it was shown for the first time that cardiolipin remodeling enzyme tafazzin gene expression increases during 60-min ischemia and 60-min ischemia/30-min reperfusion *in vivo*. During the analysis of the effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on human renal proximal tubule epithelial cells (RPTEC/TERT1) for the first time we revealed the composition of cardiolipin species in these cells and compared it with cardiolipin species found in rat kidney mitochondria. In this work it was shown for the first time that cardiolipin levels increase during hypoxia *in vitro* in human renal cells, but they decrease after reoxygenation, however, still remaining

higher than control levels. Analysis of molecular mechanisms involved in cardiolipin alterations during hypoxia/reoxygenation *in vitro* showed for the first time that the gene expression and protein levels of cardiolipin synthase and lysocardiolipin acyltransferase 1 increase during hypoxia/reoxygenation *in vitro*. It was also shown that levels of reactive oxygen species and lipid peroxidation increase during hypoxia/reoxygenation *in vitro* in human renal cells. Our analysis reveals that even though oxidative stress is increased during ischemia/reperfusion *in vivo* and hypoxia/reoxygenation *in vitro*, the molecular mechanisms of cardiolipin synthesis and remodeling are activated.

Practical significance

This data on the qualitative and quantitative alterations of cardiolipin and the molecular mechanisms that are involved in these alterations during renal ischemia/reperfusion provides new knowledge on the pathophysiology of ischemia/reperfusion. Information on the activation of cardiolipin synthesis and remodeling during ischemia/reperfusion can be useful in search for new molecular targets and search and/or development of new biologically active compounds which could be used to protect kidney mitochondria and cardiolipin from damage induced by ischemia/reperfusion.

2. METHODS

Experimental procedures with laboratory animals were carried out in accordance with order No. B1-866 by the Director of the Lithuanian State Food and Veterinary Service “On the approval of requirements for the keeping, care, and use of animals for scientific and educational purposes”. Experimental procedures were carried out with permission from the Lithuanian Ethics Committee on the Use of Laboratory Animals under the State Food and Veterinary Service (No. G2-170, 2021-03-02). Male Wistar rats of 2–3 months, weighing around 250 grams, were used for the experiments. Experimental groups are described in section 2.1. Renal model of *in vivo* ischemia/reperfusion. Laboratory animals were bred and kept in the Vivarium of the Lithuanian University of Health Sciences, the experimental procedures with the animals were performed in the Laboratory of Molecular neurobiology, Neuroscience institute, Lithuanian University of Health Sciences.

Reagents for cell cultures were obtained from Thermo Fisher Scientific (USA). All other reagents were obtained from Sigma Aldrich (USA), if not mentioned otherwise.

2.1. Renal model of *in vivo* ischemia/reperfusion

General anesthesia was induced to Wistar male rats after an intraperitoneal injection of ketamine 90 mg/kg and xylazine 12 mg/kg. The effect of anesthesia was verified by observing no retraction of the hind paw in response to toe pinching. Abdomen was opened, then renal arteries were separated and clamped using microvascular clamps. Renal ischemia was confirmed by observing color change of the kidney (kidneys begin to lighten at the start of ischemia, later they turn dark purple). After 30, 40 or 60 minutes of ischemia the microvascular clamps are removed, and the kidneys are allowed to perfuse for 30 minutes (reperfusion was confirmed by observing kidney color change from dark purple to red). Sham-control group underwent the same exact procedures except for clamping arteries, they were kept under anesthesia for 90 minutes. During the procedure all animals were kept on a heated pad, the abdomen was covered and kept wet with saline. After the surgical procedure (ischemia/reperfusion) cervical dislocation was performed and kidneys were removed. Kidneys were immediately used for mitochondrial isolation or RNA extraction. All animals were separated into the following groups – sham control, ischemia 30 min, ischemia 40 min, ischemia 60 min, ischemia 30 min and reperfusion 30 min, ischemia 40 min and reperfusion 30 min, ischemia 60 min and reperfusion 30 min. Each group contained 3–7 animals.

2.2. Renal mitochondria isolation

Rat kidneys were washed from blood with 4 °C KCl and placed on a petri dish on ice. The renal capsule was removed, the kidneys were cut and connective tissue including renal calyx was removed. Kidneys were finely chopped, mixed with 4 °C mitochondrial isolation buffer (250 mM saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl, pH 7.4) and homogenized for 4–5 seconds using an electric homogenizer IKA T25 digital Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany) at $20,6 \times 10^3$ rpm. Homogenized tissue was further diluted with isolation buffer up to 15 mL and centrifuged at $750 \times g$, for 5 minutes at 4 °C using centrifuge Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, USA). After the centrifugation supernatant was transferred to a clean test tube and centrifuged again at $6800 \times g$, for 10 minutes at 4 °C. After centrifugation the supernatant was removed, and the mitochondria pellet was carefully collected with an automatic pipette and resuspended with 150 μ L isolation buffer. Mitochondria suspension was mixed well, part of it was used for protein determination, the rest of it was stored at –80 °C until lipid extraction.

2.3. Cell Culture

Experiments with cell culture was carried out using an immortalized human renal proximal tubule epithelial cell line (RPTEC/TERT1, further called RPTEC cells; Evercyte GmbH, Vienna, Austria). Cells were cultured in a sterile environment (laminar flow hood Herasafe KS, Thermo Scientific, USA) according to the recommendations from the cell culture provider. Cells were grown in 25–75 cm² cell culture flasks with DMEM/F12 growth medium supplemented with 2 mM Glutamax, 10 µg/mL human epidermal growth factor, 25 µg/mL hydrocortisone, 6.7 µg/mL sodium selenite, 5 µg/mL transferrin, 10 µg/mL insulin, 100 µg/mL geneticin (G418) and 4 % fetal bovine serum. Cell cultures were kept in a Heracell 150i incubator (Thermo Scientific, USA) at 37 °C, 5 % CO₂. During passaging of cells, the growth medium was removed, cells were washed with sterile phosphate buffer saline and incubated with trypsin analogue Tryple solution 25 µL/cm² for 4–6 minutes. Cell dissociation was confirmed visually and using a microscope, cells were resuspended in a culture medium and centrifuged at 170 × g for 5 minutes at room temperature using Eppendorf 5810 R centrifuge (Eppendorf, Germany). After the centrifugation the cells are resuspended in 1 mL of fresh growth medium and counted using 0.4 % Trypan Blue solution and counting chamber. For counting, 20 µL of cell suspension is mixed with 20 µL of Trypan Blue solution and spread on the hemocytometer Fuchs-Rosenthal (Marienfeld, Germany), then the cells are counted using a microscope. Cells are seeded at density of 6–8 × 10⁴ cells/cm² in a fresh growth medium at 240 µL/cm².

2.4. *In vitro* model of hypoxia reoxygenation

Hypoxia/reoxygenation was induced using Baker Ruskinn InVivo2 humidified hypoxia workstation (Baker Co., Bridgend, UK). The atmosphere in the workstation was set at 2 % O₂ and 5 % CO₂ concentration, 37 °C temperature and 70 % humidity. Fresh growth medium was kept in the workstation overnight (hypoxic medium) before inducing hypoxia. The cells were transferred to the workstation and the growth medium was replaced by the hypoxic medium. The cells were kept in hypoxic conditions for 24 hours. Then the cells were collected, counted and used for experiments or stored at –80 °C for further analysis (Hypoxia 24h group). To induce reoxygenation the cells were removed from the hypoxia station, the hypoxic medium was replaced by a normal growth medium, and the cells were kept in the normal incubator for another 24 hours. Then the cells were collected, counted and

used for experiments or stored at -80°C for further analysis (Reoxygenation 24h group).

For hypoxia/reoxygenation model with glycolysis inhibition, 2-deoxy-D-glucose (2-dG) was used. *In vitro* hypoxia/reoxygenation was induced as described previously; however hypoxic medium was supplemented with 17.53 mM 2-dG (a concentration equal to glucose concentration in the normal growth medium).

2.5. Protein amount determination in the mitochondria suspension and cell lysates

Protein amount determination in kidney mitochondria suspension was performed by Biuret method [217]. 25 μL of mitochondria suspension was mixed with 975 μL 0.33 % deoxycholate solution and 4 mL Biuret reagent (0.15 % CuSO_4 , 0.6 % sodium-potassium tartrate and 0.75 M NaOH). For control 1000 μL of 0.33 % deoxycholate solution and 4 mL of Biuret reagent were mixed. The test tubes were covered and incubated at 37°C for 30 minutes. Light absorption of the samples was measured at 536 nm wavelength using Nanophotometer Pearl (Implen, Germany). Protein amount was calculated from the calibration curve, which was made using standard solutions of bovine serum albumin (BSA).

Protein amount in RPTEC cell lysates was determined using Bradford reagent according to manufacturer's instruction. Cell lysis was performed by freezing the pellet at -80°C and by thawing at room temperature and vortexing. This was performed three times. After lysis the cells were centrifuged at $8000 \times g$ for 10 minutes, at 4°C temperature. The supernatant was used for protein determination, the protein amount was calculated using calibration curve.

2.6. Evaluation of cell viability and proliferation

Cell viability was evaluated using fluorescence microscopy. The cell nuclei were stained with fluorescent stains bisbenzimidazole H33342 trichloride (Hoechst 33342) and propidium iodide (PI), that bind to nucleic acids. Cell membrane is permeable to Hoechst 33342 therefore all nuclei emit blue fluorescence under the microscope. The nuclei of viable cells appear homogenous with smooth edges, while the nuclei of apoptotic cells are condensed, fragmented and more intense in fluorescence. Cell membrane is not permeable to PI, therefore, only the nuclei of necrotic cells are stained and emit red fluorescence under the microscope. During the procedure the cell cultures were incubated with 4 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 and 7 μM PI for 15 min at 37°C . Visualization was performed using fluorescent microscope

Olympus IX71S1F-3 (Japan). Cells were observed under 200x magnification and counted in five random microscopic fields. Cell counting was performed using ImageJ 1.53k software. An average number of living, apoptotic and necrotic cells from five microscopic fields was calculated and viability was expressed as percentage of live, apoptotic and necrotic cells in relation to the total amount of cells.

Cell proliferation was evaluated by calculating cell numbers before seeding the cells and after hypoxia/reoxygenation as well as after the incubation for equal time periods of culturing for control groups. Cell counting was performed using hemocytometer and Trypan Blue solution as described earlier (section 2.3). Cell proliferation was expressed as an increase of cell numbers in percentage in relation to the number of cells that were seeded before the experiment and compared between hypoxia/reoxygenation and control groups cultured for an equal amount of time.

2.7. Measurement of mitochondrial respiration rate

Mitochondrial respiration rate was analyzed in permeabilized RPTEC cells by measuring oxygen consumption rate using high-resolution oxygraph Oroboros O2k (Innsbruck, Austria). During the analysis 2 million cells were incubated with respiration buffer in a 2 mL oxygraph cuvette at 37 °C under constant stirring with a magnetic stirrer at 750 rpm. The composition of respiration buffer: 3 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM EGTA, 60 mM α -lactobionate, 20 mM taurine, 10 mM KH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 110 mM sucrose, (pH 7.1 and 37 °C). Mitochondrial respiration was measured as follows:

1. The cells were added to the oxygraph cuvette along with 5 mM glutamate and 7.5 mM malate, substrates for complex I of mitochondrial respiratory chain. Digitonin 12.15 μM was added to permeabilize the cells. Oxygen consumption rate in leak state was measured (L(I));
2. Adenosine diphosphate (ADP) 2 mM was added to the cuvette, oxygen consumption rate in oxidative phosphorylation state was registered (P(I));
3. Succinate 12.5 mM, a substrate for complex II of mitochondrial respiratory chain was added. Maximal oxygen consumption rate in oxidative phosphorylation state was registered (P(I+II));
4. Cytochrome C 35 μM was added, oxygen consumption rate was registered (P(I+II+CytC)). Mitochondrial outer membrane is non-permeable to cytochrome C, therefore by adding exogenous cytochrome C changes in mitochondrial outer membrane permeability can be assessed. Cytochrome C effect is calculated $\text{P(I+II+CytC)/P(I+II)}$, this ratio is equal

to 1 in normal mitochondria, but increases if the permeability of the outer membrane is increased;

5. Carboxyatractyloside 1 μM (Cat) is added, which is an inhibitor for adenine nucleotide carrier. Oxygen consumption rate is registered in leak state ($L(I+II+Cat)$). Mitochondrial inner membrane impairment and changes in permeability can be assessed in this respiratory state;
6. Dinitrophenol 45 μM is added, which increases permeability of the inner mitochondrial membrane and uncouples phosphorylation from electron transfer. Oxygen consumption rate at maximal electron transfer capacity is registered (E);
7. Sodium azide 10 mM (NaN_3) is added to inhibit mitochondrial respiratory chain complex IV; therefore, inhibiting mitochondrial respiration. Oxygen consumption rate that is independent from mitochondria is registered (A).

During data analysis oxygen consumption rate A is subtracted from all other oxygen consumption rates; therefore, only mitochondrial oxygen consumption rate is evaluated which is expressed in pmol/s per one million cells. Below is a typical curve that is obtained during registration of mitochondrial respiration (Fig 2.7.1).

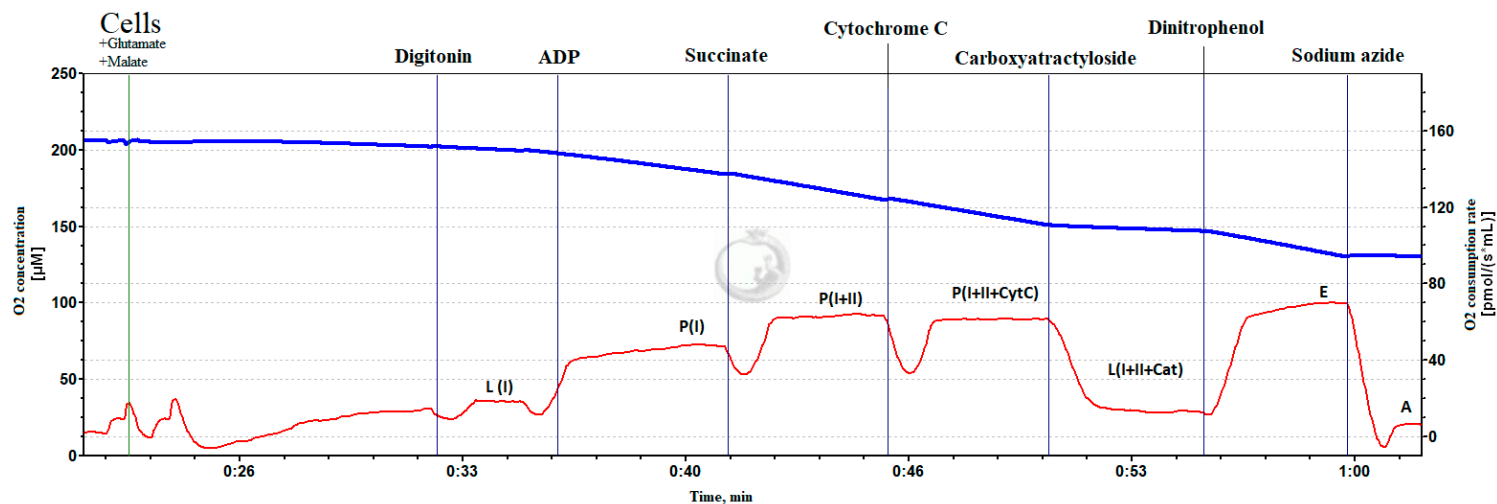


Fig. 2.7.1. Typical graph of the assessment of mitochondrial respiration in human RPTEC cells

2.8. Measurement of hydrogen peroxide generation rate in RPTEC cells

Hydrogen peroxide generation rate in RPTEC cells was measured using AmplexRed reagent, which upon reacting with H_2O_2 and horseradish peroxidase turns into a fluorescent compound resorufin. Cells were suspended in HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*) with 30 $\mu\text{g/mL}$ horseradish peroxidase and 15 μM AmplexRed (7.3×10^5 cells/mL) and placed in 96-well black plate. Resorufin fluorescence was measured every 5 minutes for 30 minutes at 544 nm excitation and 590 nm emission wavelengths using fluorimeter Fluoroscan Ascent (Thermo Scientific, JAV). Hydrogen peroxide generation rate was calculated using calibration curve and expressed as H_2O_2 $\mu\text{M}/1$ min per 1 million cells.

2.9. Fluorometric analysis of total cardiolipin in RPTEC cells

Total cardiolipin amount in RPTEC cells was analyzed using cardiolipin-specific fluorescent stain 10-N-nonyl acridine orange (NAO). Cells were suspended in growth medium with 1 μM NAO stain and incubated for 30 minutes at 37 °C. After incubation cells were centrifuged and resuspended in phosphate saline buffer at 10^6 cells/mL. Cell suspension was placed in 96-well black plates and fluorescence was immediately measured at 485 nm excitation and 538 nm emission wavelengths. The results were expressed in relative units as fluorescence intensity (cardiolipin amount) per 1 million cells.

2.10. Lipid extraction

Lipid extraction from RPTEC cells and rat kidney mitochondria was performed using a modified Folch method [218] with a mixture of chloroform and methanol. About 4 million cells or 5 milligrams of rat kidney mitochondria was mixed with deionized water, methanol and chloroform at volume ratio 1:2:4. Cardiolipin internal standard CL (C14:0)₄ (Avanti polar lipids, USA) is added as a final concentration of 40 $\mu\text{g/mL}$ (for 600 μL final lipid suspension). The components are mixed well and centrifuged at 2000 rpm for 5 min at room temperature. After centrifugation the top layer with methanol and water is removed, the bottom chloroform layer with lipids is separated into a glass tube and placed into a thermoblock at ~50 °C under nitrogen gas, to prevent lipids from oxidation by atmospheric oxygen. Next steps are repeated three times: the methanol/water layer that was removed is mixed with two parts of fresh chloroform and centrifuged, after centrifugation the chloroform/lipid layer is separated and added to the same glass tube for evaporation. When chloroform is completely evaporated the lipids are resuspended with 600 μL

of chloroform:2-propanol mixture (volume ratio 1:5), filtered through a 0.22 μm pore syringe filter and stored in an amber glass vial at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperature until chromatographic analysis.

2.11. Oxidation of cardiolipin standard

Cardiolipin standard (cardiolipin sodium salt from bovine heart, Sigma Aldrich, USA) was oxidized using methodology according to Kagan et al. [130] and Tyurina et al. [219]. Cardiolipin standard was mixed with phosphate buffer (K_2HPO_4 50 mM, KH_2PO_4 50 mM, pH 7.4) and sonicated for 3 minutes to form micelles. Cytochrome C 30 μM and H_2O_2 400 μM was added and the mixture was incubated for 60 minutes at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. H_2O_2 400 μM was added in portions of 100 μM every 15 minutes during incubation, a total of four times. After the incubation lipids were extracted as described in section 2.10. Products of cardiolipin oxidation were analyzed using chromatography-mass spectrometry.

2.12. Qualitative and quantitative analysis of cardiolipin using chromatography-mass spectrometry

Qualitative and quantitative analysis of cardiolipin and its forms in lipid fractions from rat kidney mitochondria and RPTEC cells was performed using Ultraperformance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) based on methodology described by Kim et al. [187]. Waters Acquity UPLC chromatograph coupled with Xevo TQD (triple quadrupole) mass spectrometer (Waters, USA) was used for analysis.

During chromatography, lipid separation was carried out using reversed-phase gradient elution method with two mobile phases – A (450 mL acetonitrile, 50 mL deionized H_2O , 2.5 mL glacial acetic acid and 2.5 mL triethylamine) and B (450 mL 2-propanol, 50 mL deionized H_2O , 2.5 mL glacial acetic acid and 2.5 mL triethylamine). Gradient elution program is presented in table 2.12.1. The mixture of mobile phases ensured effective separation of cardiolipins in the chromatographic column as well as created the environment in which cardiolipin molecule gains one negative charge $[\text{M}-\text{H}^+]^-$. Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm column was used for chromatographic separation. Sample injection volume was 10 μL , temperature of the chromatographic column was set at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Table 2.12.1. *Gradient elution program used during UPLC analysis*

Elution time, min	Mobile phase A, %	Mobile phase B, %	Flow rate, mL/min
Initial	100	0	0.5
10	50	50	0.5
20	20	80	0.35
21	0	100	0.2
24	100	0	0.2
26	100	0	0.5

During mass spectrometry lipids were ionized using electrospray ionization, ions were scanned in a negative mode at 200 – 1650 m/z. Other settings for mass spectrometry: capillary voltage 2.5 kV, cone voltage 120 V, source temperature 150 °C, desolvation temperature 600 °C, collision energy 80 V. During ionization cardiolipin gained one negative charge, therefore, the m/z value was the same as molecular mass of cardiolipin or its fragment. During tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring (MRM) was applied, cardiolipin and its fragments were analyzed, and according to the obtained data different species of cardiolipins were identified.

Qualitative analysis of cardiolipin was based on the retention times, m/z value and fragmentation patterns. Quantitative analysis of cardiolipin was performed by integrating chromatographic peaks, calculating the peak area and adjusting to internal standard chromatographic peak area. The amount of cardiolipin was calculated using the calibration curve or expressed as relative units based on chromatographic peak area if the cardiolipin standards were unavailable. Quantitative analysis of TLCL (tetra-linoleoyl cardiolipin) oxidation products was carried out by calculating the ratio of the peak area of oxidized TLCL form and the sum of peak areas of all oxidized TLCL forms including non-oxidized TLCL. UPLC-MS/MS data was processed and analyzed using MassLynx 4.0 software (Waters, USA).

2.13. Total RNA isolation from RPTEC cells and rat kidneys

Total RNA from RPTEC cells and rat kidneys was isolated and purified using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, USA) according to manufacturer's protocol. Cell suspension was mixed with 0.5 mL TRIzol reagent and incubated at room temperature for 5 minutes. Chloroform 0.1 mL was added, the solution was vortexed, incubated for 2–3 minutes, and centrifugated at $12000 \times g$ for 15 minutes at 4 °C in Heraeus Megafuge 16R centrifuge (Thermo Scientific, USA). After centrifugation the water layer is separated, mixed with 0.25 mL 2-propanol, incubated for 10 minutes at room temperature and then centrifuged at $12000 \times g$ for 10 minutes at

4 °C. Supernatant was removed, RNA pellet was resuspended with 0.5 mL 75 % ethanol, mixed and centrifuged at $7500 \times g$ for 5 minutes at 4 °C. After centrifugation the RNA pellet was resuspended in ethanol again and centrifuged. After centrifugation the supernatant was removed, the RNA pellet is dried for 5-10 minutes and resuspended with 40 μ L ultrapure H₂O without nucleases. RNA amount and purity was assessed spectrophotometrically using Nanophotometer Pearl (Implen, Germany) with integrated function for RNA amount and purity determination. RNA samples were stored at –80 °C.

Rat kidneys were washed with 4 °C KCl solution, chopped finely and homogenized for 10–15 seconds with an electric homogenizer IKA T25 digital Ultra-Turrax (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Germany) at 20.6×10^3 rpm. About 60 mg of homogenized tissue was mixed with 1 mL TRIzol and homogenized again for 10 seconds. The mixture was incubated for 2–3 minutes and centrifuged at $12000 \times g$ for 15 minutes at 4 °C. The rest of the procedure is identical to the RPTEC cells, but the amounts of reagents used were two times greater (0.2 mL chloroform, 0.5 mL 2-propanol, 1 mL 75 % ethanol, 80 μ L of ultrapure H₂O).

2.14. Synthesis of cDNA

Synthesis of cDNA was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) according to manufacturer's instructions. Reaction mixtures were prepared on a cooling rack to keep the temperature low. The components of the reaction mixture for cDNA synthesis are listed below in table 2.14.1. Total volume per reaction was 20 μ L, the amount of RNA used per reaction was 600 ng.

Table 2.14.1. Reaction components for cDNA synthesis

Reaction component	Volume per reaction, μ L
10x reverse transcription buffer	2
25x deoxynucleoside triphosphate mixture (dNTP)	0.8
10x reverse transcription random primers	2
“Multiscribe” reverse transcriptase	1
Ribonuclease inhibitor	1
H ₂ O without nucleases	3.2
RNA sample	10 (60 ng/ μ L)

Reaction components (except for RNA sample and H₂O without nucleases) are from High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA).

Synthesis of cDNA was carried out using Biometra T Personal 48 Thermocycler (Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Analytic Jena,

Germany) according to set conditions: 10 min at 25 °C, 120 min at 37 °C, 5 min at 85 °C. After the procedure the samples were stored at –80 °C until analysis of gene expression.

2.15. Gene expression analysis using real-time polymerase chain reaction

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out using TaqMan Universal Master Mix II with UNG (Applied Biosystems, USA) and TaqMan Gene Expression Assay FAM (Applied Biosystems, USA) with labeled primers. Target genes and TaqMan gene expression assay IDs: *CRLS1*/Hs00219512_m1, *TAZ*/Hs00902887_g1, *LCLAT1*/Hs00699427_m1. RT-PCR reaction components are listed in Table 2.15.1. Reaction volume was 10 µL, reactions were carried out in duplicates.

Table 2.15.1. RT-PCR assay components

Reaction component	Volume per reaction, µL
TaqMan Universal Master Mix II with UNG, 2x	5
TaqMan Gene Expression Assay, 20x	0.5
cDNA (10 ng/µL)	2
H ₂ O without nucleases	2.5

RT-PCR was carried out in 0.1 mL microcentrifuge tubes (Nerbe Plus GmbH & Co. KG, Germany) using Quiagen Rotor Gene Q 5plex HRM RT-PCR thermocycler (Quiagen, Germany) according to set conditions: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 40 cycles – 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Amplification of cDNA was evaluated based on the fluorescence intensity, cycle of threshold was registered (C_T). Data analysis was performed using Rotor-Gene Q Series Software V2.3.1 (Quiagen, Germany). C_T values were normalized to the value of the housekeeping-gene *HPRT1* (Assay ID Hs99999909_m1, Applied Biosystems, USA). Relative gene expression was calculated using $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.

2.16. Analysis of cardiolipin synthesis/remodeling enzyme and HIF-1α amounts in RPTEC cells

Amounts of cardiolipin synthase (CRLS1), lysocardiolipin acyltransferase 1 (LCLAT1), tafazzin and hypoxia-inducible factor (HIF-1α) was carried out using RPTEC cell lysates and ELISA kits: Human Cardiolipin Synthase (CRLS1) ELISA Kit (Abbexa, England), Human Lysocardiolipin Acyltransferase 1 (LCLAT1) ELISA Kit (Abbexa, England), Human Tafazzin/

TAZ ELISA Kit (Antibodies.com, England), Human HIF-1 alpha Total ELISA Kit (Invitrogen, Thermo Scientific, USA). Analysis was performed according to manufacturer's instructions.

2.17. Quantitative analysis of phospholipase A₂γ in RPTEC cells

Analysis of phospholipase A₂γ (iPLA₂γ) amount in RPTEC cells was performed by Western Blot method using antibodies against iPLA₂γ anti-PNPLA8 (anti-Patatin like phospholipase domain containing 8, Abbexa, England) and an antibody against housekeeping protein ACTB (anti-actin beta, Abbexa, England). Cell lysates were prepared, and their protein amount was measured using Bradford reagent as described before (see section 2.5.). For sample preparation 15 µg of cell lysate was used and mixed with NuPAGE LDS Sample Buffer and 10 % mercaptoethanol, the sample was heated at 100 °C for 5 minutes. XCell 4 SureLock Midi-cell Electrophoresis System (Thermo Scientific, USA) was prepared – a 10 % polyacrylamide gel was inserted, the system was then filled with electrophoresis buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 1 % SDS). Samples were loaded to the gel and electrophoresis was started – 90 V for 30 minutes, 150 V for 60 minutes. After electrophoresis gel was washed with transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20 % methanol) for 15 minutes. Proteins were transferred to a 0.45 µm polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using Invitrogen Semi-Dry Electroblotter system (Invitrogen, USA) and the transfer buffer, the transfer duration was 60 minutes at 20 V. The membrane was incubated with blocking solution TBST (15 mM Tris-HCl, 4.6 mM Tris, 153 mM NaCl, 0.1 % Tween) with 5 % BSA for 1 hour at room temperature, then the membrane was incubated with primary antibodies overnight at 4 °C. Primary anti-ACTB and anti-PNPLA8 antibodies were diluted at a ratio 1:1000 with TBST + 5 % BSA buffer. After incubation the membrane was washed with TBST buffer for 10 minutes three times and then incubated with secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Donkey Anti-Rabbit IgG Antibody (HRP), Abbexa, England) for 1 hour at room temperature. After incubation the membrane was washed twice for 10 minutes and once for 5 minutes with PBS. The membrane was incubated with Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA) for 2 minutes and visualization of the membrane was performed using Biospectrum 600 system (UVP, USA) and Vision WorksLS (UVP, USA) software. During visualization PNPLA8 protein fragmentation was observed; therefore, the most prominent band with ~20 kDa mass was chosen for quantification. Protein band density analysis was performed using ImageJ 1.53k software.

2.18. Determination of malondialdehyde amount in RPTEC cells

Determination of malondialdehyde amount was performed using Lipid Peroxidation (LPO) assay kit (Abbexa, England). All procedures were carried out according to the manufacturer's instructions.

2.19. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 29.0 (IBM, USA) and Microsoft Excel (Microsoft 365 MSO, Microsoft, USA) softwares. Data are presented as means with standard error of mean. Student t test was used to compare the means of two groups and for comparing means of three and more groups one-way ANOVA combined with Fisher LSD test was used. If the data was not normally distributed (Shapiro-Wilk test), non-parametric tests were used. The differences of means were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Identification of cardiolipin and its oxidation products using UPLC-MS/MS

3.1.1. Standard cardiolipin analysis

Cardiolipin amount, its structure and structural alterations can be determined using chromatography and mass spectrometry; however, for effective analysis purified standard solutions are needed which only a few are commercially available. There is a lack of information about renal cardiolipins; however it is known that the dominant cardiolipin species in mammals is TLCL [4,220]. Firstly, cardiolipin from standard bovine cardiolipin mixture was identified. The mixture of cardiolipins in this standard contains 90 % of linoleic acid (18:2), 5 % oleic acid (18:1) and 5 % others, therefore the dominant cardiolipin is TLCL. UPLC-MS/MS analysis showed that the retention time for TLCL is 17.92 min (Fig. 3.1.1.1 A) which was determined according to m/z 1448 that was shown in mass spectrum (Fig. 3.1.1.1 B). Another chromatographic peak was observed at 19.19 min (Fig. 3.1.1.1 A) which corresponded to CL (18:2)₃(18:1). Typical TLCL fragments were identified after mass spectrum analysis – linoleic acid m/z 279, monoacylglycerol phosphate m/z 415, diacylglycerol phosphate m/z 696 and diacylglycerol phosphate with glycerol m/z 752. Another fragment is seen with m/z 303 which corresponds to linoleic acid with Na⁺ (Fig. 3.1.1.1 C). A scheme of typical TLCL fragmentation is presented in figure 3.1.1.1 D. Such fragmentation patterns are common to

all cardiolipin species, despite their fatty acid composition, therefore other cardiolipin species were analyzed according to these fragmentation patterns.

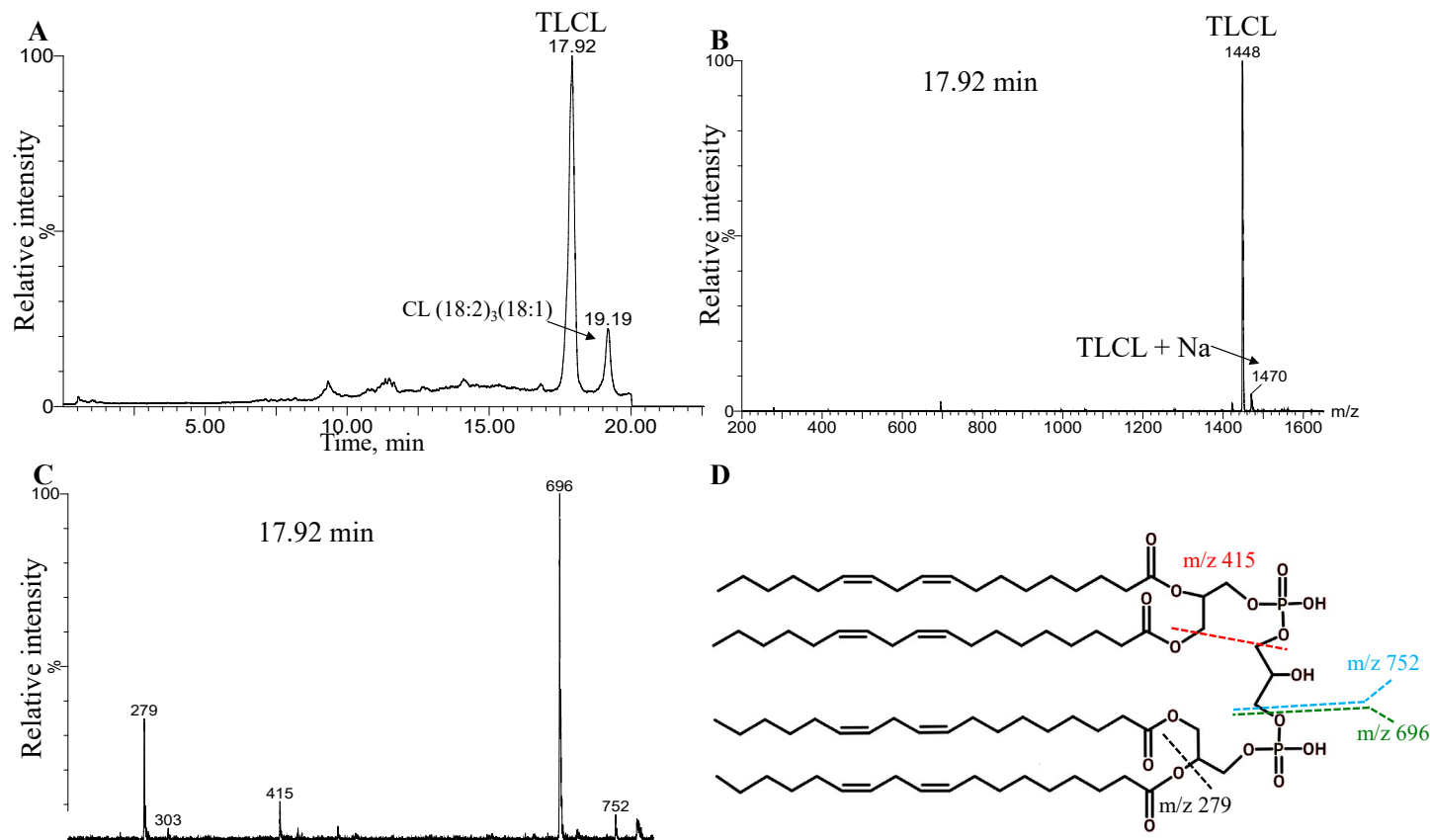


Fig. 3.1.1.1. UPLC-MS/MS analysis of cardiolipin standard. Typical chromatogram (A), mass spectra (B and C) and fragmentation scheme of tetra-linoleoyl cardiolipin (D)

TLCL – tetra-linoleoyl cardiolipin; m/z – mass-to-charge ratio.

Next, we analyzed possible TLCL oxidation products after standard cardiolipin oxidation which was performed using H_2O_2 and cytochrome C to imitate one of the cardiolipin oxidation pathways in the mitochondria when cytochrome C exerts peroxidase activity upon binding to cardiolipin [221]. UPLC-MS/MS revealed new chromatographic peaks (Fig. 3.1.1.2 A compared with 3.1.1.1 A) which corresponded to eight new TLCL oxidation products. Mass spectrum showed new masses that were larger than m/z 1448 of TLCL with mass increase in increments of 16 atomic units which correspond to the addition of oxygen atoms (Fig. 3.1.1.2 B compared to 3.1.1.2 C).

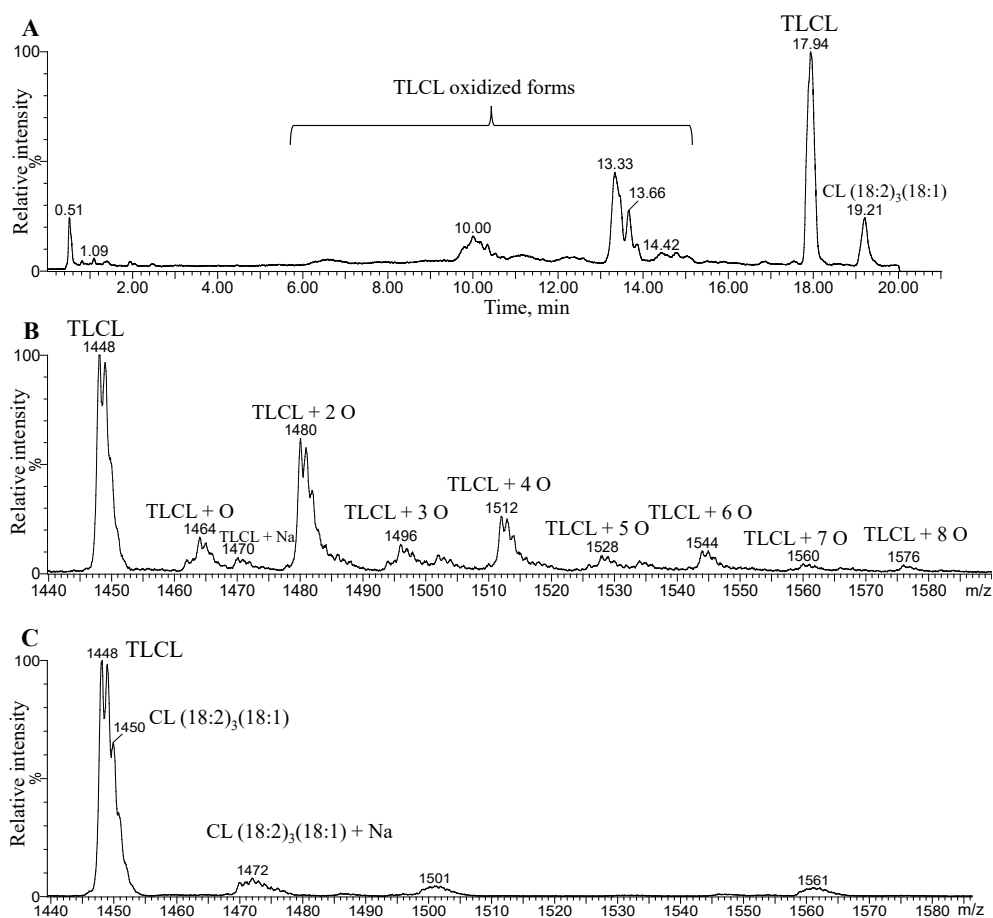


Fig. 3.1.1.2. UPLC-MS/MS typical chromatogram of oxidized cardiolipin standard (A) and typical mass spectrum, m/z 1440 to 1580 mass range is shown (B), mass spectrum of non-oxidized cardiolipin standard, m/z 1440 to 1580 mass range is shown (C)

TLCL – tetra-linoleoyl cardiolipin; m/z – mass-to-charge ratio.

To confirm that the new observed masses after cardiolipin standard oxidation are in fact TLCL oxidized forms, fragment analysis was performed based on typical cardiolipin fragmentation that is described in literature [187,222]. Linoleic acid and diacylglycerol phosphate fragments with additional oxygen atoms and their mass-to-charge ratios were determined. Also, we noticed that some of the fragments were getting dehydrated ($m/z - 18$) during mass spectrometry which is typical to lipid hydroperoxides. TLCL with one extra oxygen atom m/z 1464 eluted at 15.21 min. with observed fragments m/z 279 linoleic acid, m/z 295 linoleic acid with additional oxygen atom (m/z 279 + 16), m/z 712 diacylglycerol phosphate with additional oxygen atom (m/z 696 + 16). TLCL with two extra oxygen atoms m/z 1480 eluted around 13.30-14.00 with observed fragments m/z 311 linoleic acid hydroperoxide, m/z 293 dehydrated form of linoleic acid hydroperoxide (m/z 311 - 18), m/z 710 dehydrated form of diacylglycerol phosphate hydroperoxide, m/z 1392 corresponding to TLCL hydroperoxide after removal of five-carbon fragment. TLCL with three extra oxygen atoms m/z 1496 eluted at 12.20 min with observed fragments m/z 326 linoleic acid with three extra oxygen atoms, m/z 744 diacylglycerol phosphate with three extra oxygen atoms and its dehydrated form m/z 726. TLCL with four extra oxygen atoms m/z 1512 was eluted at 10.18 min with observed fragments m/z 311 linoleic acid with two extra oxygen atoms and its dehydrated form m/z 293, m/z 712 and m/z 728 corresponding to diacylglycerol phosphate with one and two additional oxygen atoms respectively, also m/z 1424 possibly corresponding to oxidized TLCL after a loss of five-carbon moiety. TLCL with five additional oxygen atoms m/z eluted at 8.87 min with similar observed fragments as mentioned before m/z 293, 295 and 311, larger fragments m/z 728 and 744 correspond to diacylglycerol phosphates with additional two and three oxygen atoms respectively, also fragments m/z 344 and 307 correspond to linoleic acid with two hydroperoxyl groups and double dehydrated form respectively. TLCL with six additional oxygen atoms m/z 1544 eluted at 6.80 min with observed linoleic acid fragments m/z 293, 295, 311, 327 and 344. TLCL with seven additional oxygen atoms m/z 1560 eluted at 5.30 min with observed fragments m/z 293, 311, 712, 728 and 742, the latter corresponds to dehydrated form of diacylglycerol phosphate with two hydroperoxyl groups. TLCL with eight additional oxygen atoms eluted at 4.30 min with observed oxidized linoleic fragments m/z 293, 295, 311, 328 and larger fragments m/z 712, 728, 760 and dehydrated form 742. The variety of fragments in each of these TLCL oxidized forms show that multiple isomers are formed during oxidation. Also decreased hydrophobicity is observed along with an increase of additional oxygen atoms as the more oxidized TLCL forms elute earlier. We observed a lower signal-to-noise ratio in some mass spectra of TLCL that were more

oxidized, therefore, large number of non-specific masses could have interfered with the general interpretation of these TLCL oxidation products. The highest amounts of oxidized TLCL species were observed of TLCL with additional one, two and four oxygen atoms (Fig. 3.1.1.2 B). Retention factors were calculated based on the retention times of oxidized TLCL forms in relation to non-oxidized TLCL retention time. These retention factors were later used for determination of TLCL oxidation products in biological samples.

3.1.2. Qualitative analysis of cardiolipin in rat kidney mitochondria and RPTEC cells.

After performing UPLC-MS/MS analysis of standard cardiolipin solutions we analyzed lipid fractions derived from rat kidney mitochondria and RPTEC cells. We observed cardiolipins that were eluted between 16 and 26 minutes (Fig. 3.1.2.1 A and B).

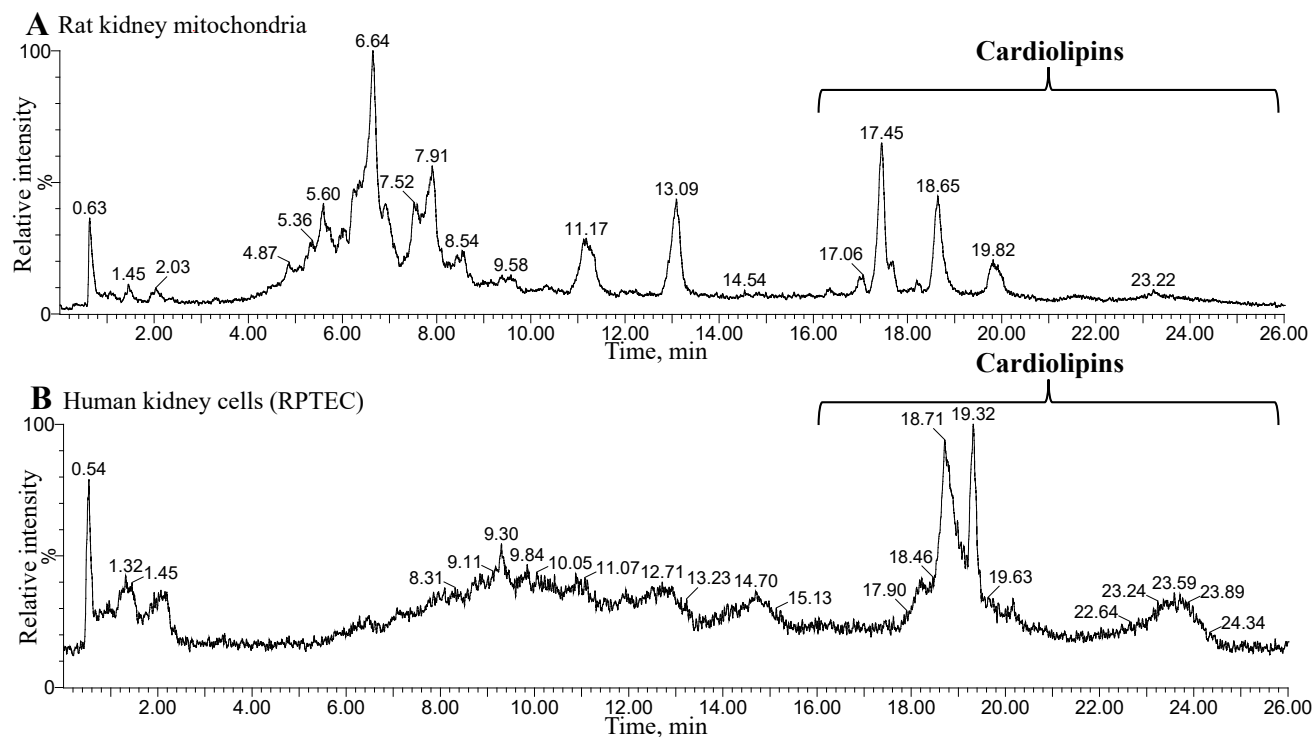


Fig. 3.1.2.1. Typical chromatograms acquired during analysis of lipid fractions from rat kidney mitochondria (A) and human RPTEC cells (B)

Mass spectrometry revealed cardiolipins with masses from m/z 1400 to 1500. Differences in mass intensities of individual cardiolipins between rat kidney mitochondria and RPTEC cell cardiolipin profiles were observed. Highest signal of m/z 1448 corresponding to TLCL was observed in rat kidney mitochondria mass spectrum while TLCL was not so prominent in RPTEC cell mass spectrum. In rat kidney mass spectrum, we observed clusters of masses with highest intensities of m/z 1424, 1448, 1474, 1498 (Fig. 3.1.2.2 A). While in RPTEC cell mass spectrum the highest intensities in mass clusters were m/z 1400, 1428, 1450, 1476, 1502 (Fig. 3.1.2.2 B).

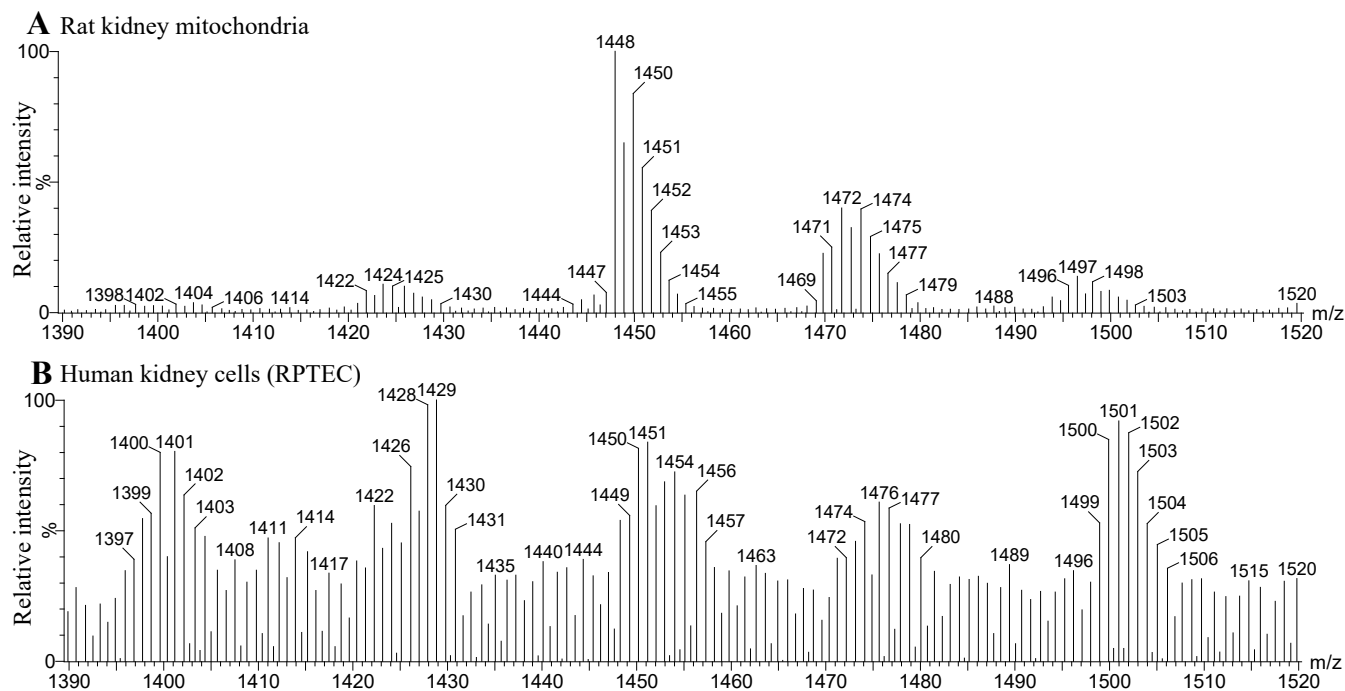


Fig. 3.1.2.2. Typical mass spectra acquired during analysis of lipid fractions from rat kidney mitochondria (A) and human RPTEC cells (B)

Mass range between m/z 1390 and 1520 is shown in chromatographic retention time between 16 and 26 min.

Fragmentation analysis was performed on the observed cardiolipins, and preliminary structures were assigned to 16 individual cardiolipin species. Retention factors were calculated for each mass (ratio of cardiolipin retention time with internal standard retention time). It was observed that linoleic acid was predominant in most cardiolipin species; however there were multiple species with palmitic acid (C16:0) as well. Cardiolipins with long chain fatty acids such as arachidonic (C20:4), docosahexaenoic (C22:6) or docosatetraenoic acids (C22:4) were observed. Quantitative analysis revealed TLCL to be predominant in rat kidney mitochondria with lesser amounts of CL (18:2)₃(18:1), CL (18:2)₃(18:0), CL (18:2)₂(18:1)(20:4). Cardiolipins with long chain fatty acids CL (18:2)₃(22:6), CL (18:2)(18:1)₂(22:6), CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:6) were in the least amounts (Fig. 3.1.2.3 A). Different cardiolipin species were dominant in human RPTEC cells – CL (18:2)₂(18:1)(16:0), CL (18:2)(18:1)₂(16:0) and CL (18:1)(18:2)(16:0)(16:1), which were almost undetectable in rat kidney cardiolipin profile (Fig. 3.1.2.3 B).

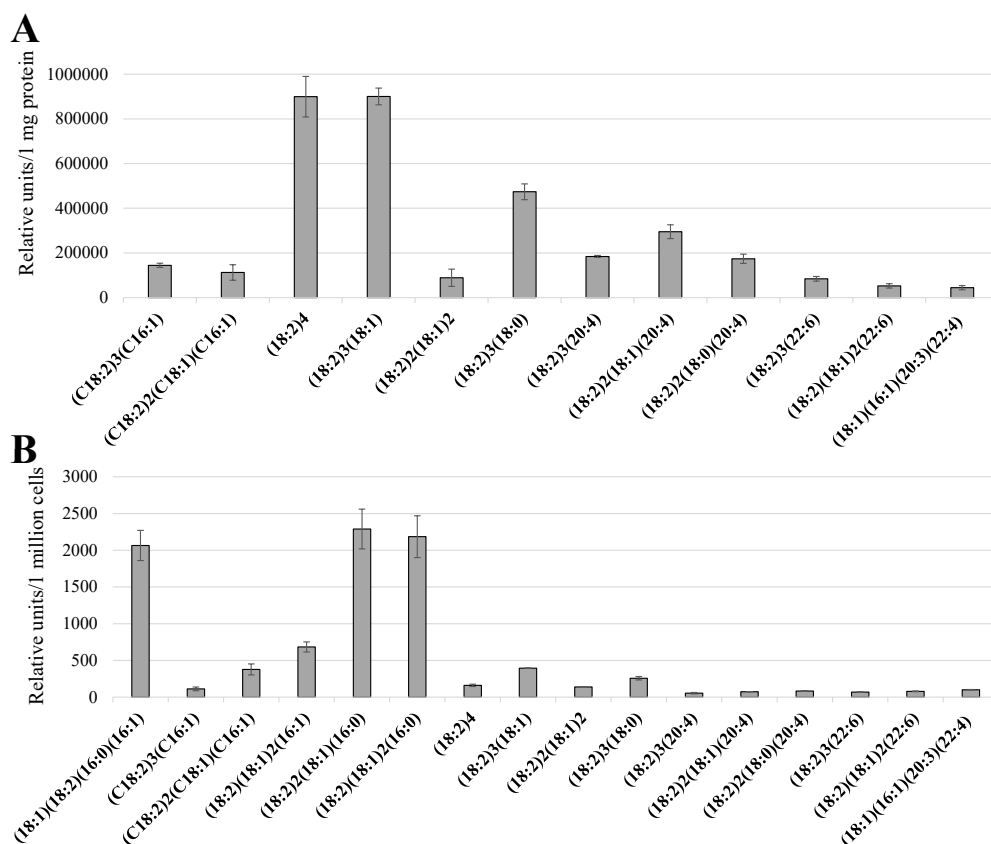


Fig. 3.1.2.3. Relative amounts of different cardiolipin species in rat kidney mitochondria (A) and human RPTEC cells (B)

n = 3 (A); n = 4 (B).

3.2. Effect of ischemia/reperfusion *in vivo* on rat kidney mitochondrial cardiolipins

Ischemia/reperfusion causes oxidative stress in tissues – increase in reactive oxygen species (ROS) generation which causes oxidation of cellular lipids, proteins and nucleic acids [14]. One of the biggest sources of ROS are the mitochondrial electron transport chain complexes. Since cardiolipin is localized with these complexes it becomes the first target for oxidation which leads to hydrolysis of oxidized cardiolipin, its dissociation from mitochondrial proteins, impairment of mitochondrial and cellular functions and eventually cell death [20].

3.2.1. Effect of ischemia *in vivo* on the amounts of rat kidney cardiolipin and TLCL oxidation products

Using the *in vivo* model of rat kidney ischemia, it was determined that after 30-min renal ischemia *in vivo* TLCL amount decreased by 47 % ($p < 0.05$) and further decreased after 40- and 60-min ischemia by 68 % and 74 % respectively compared to control ($p < 0.05$). After 60-min ischemia TLCL amount was 51 % and 40 % lower than 30-min and 40-min ischemia groups respectively ($p < 0.05$) (Fig. 3.2.1.1.).

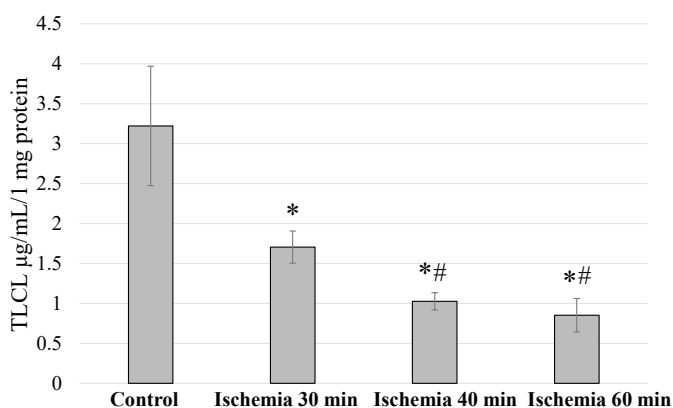


Fig. 3.2.1.1. The effect of ischemia *in vivo* on the level of dominant cardiolipin TLCL in rat kidney mitochondria

$n = 3-7$; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to ischemia 30 min ($p < 0.05$).

While analyzing other cardiolipins it was observed that after 30-min renal ischemia the amounts of six cardiolipin species were on average 58 % lower than control ($p < 0.05$). After 40-min ischemia the amounts of seven cardiolipin species were on average 71 % lower compared to control ($p < 0.05$) and after 60-min ischemia the amounts of six cardiolipin species were 65 % lower than control levels ($p < 0.05$) (Fig. 3.2.1.2.).

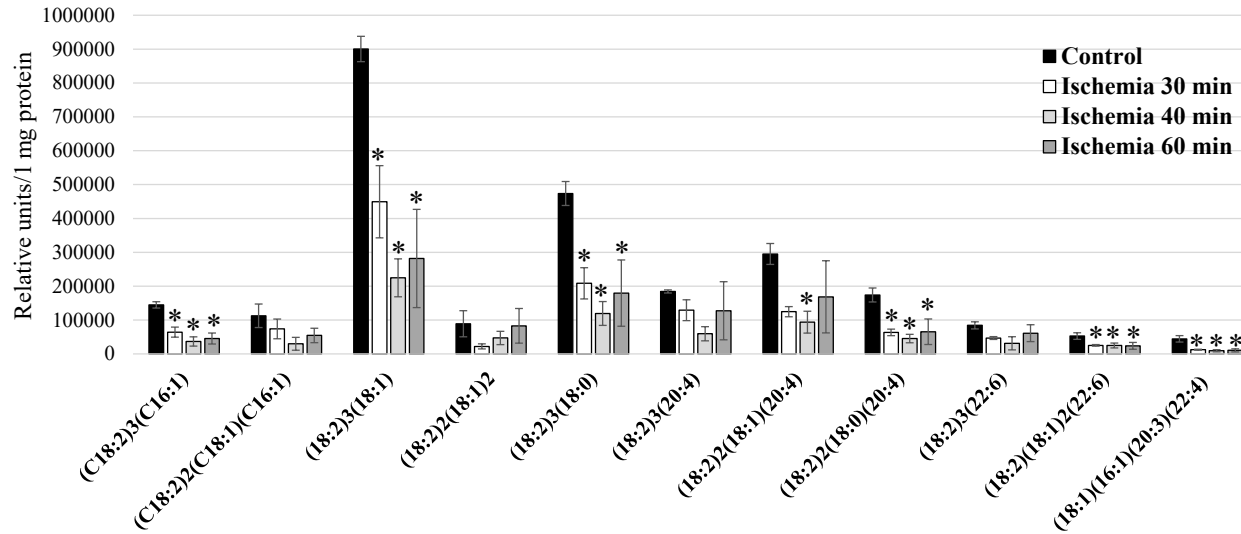


Fig. 3.2.1.2. The effect of ischemia in vivo on the levels of different cardiolipin species (cardiolipins with different fatty acid composition) in rat kidney mitochondria
 n = 3; * statistically significant difference compared to control (p < 0.05).

During analysis of TLCL oxidation products the same eight species that were observed during cardiolipin standard oxidation were determined in rat kidney mitochondria. TLCL with additional five oxygen atoms predominated among these forms while TLCL with additional three oxygen atoms was virtually undetectable in control mitochondrial lipids (Fig 3.2.1.3.).

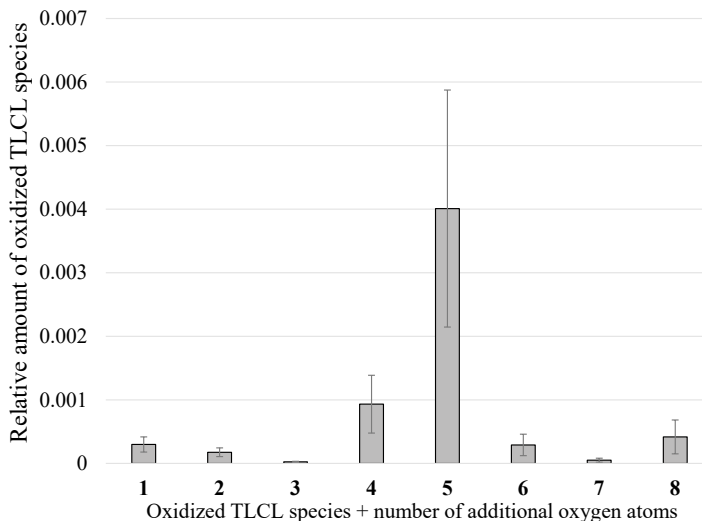


Fig. 3.2.1.3. *Relative amounts of TLCL oxidized forms in control rat kidney mitochondria*

Eight TLCL oxidized forms are presented, the number below the columns indicates the number of additional oxygen atoms on TLCL; n = 7.

Quantitative analysis showed that the amounts of all TLCL oxidized species increased on average three times after 30-min ischemia and on average 6.9 times after 40-min ischemia *in vivo* (Fig. 3.2.1.4.). After 60-min ischemia the amount of TLCL with additional one and two oxygen atoms increased 27 and 38 times respectively, although the difference was not significant compared to control. Also, there was a tendency for the remaining TLCL oxidized species to decrease after 60-min ischemia compared to 40-min ischemia.

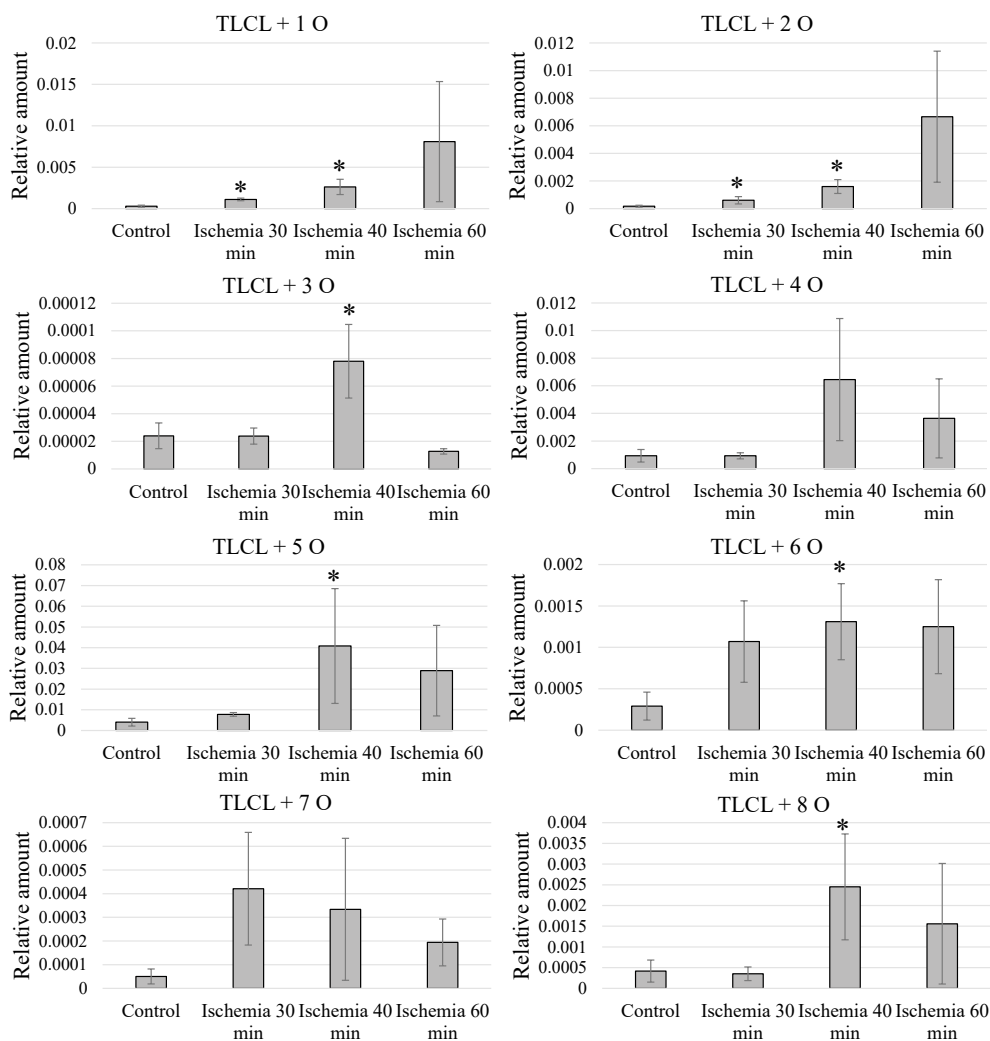


Fig. 3.2.1.4. The effect of ischemia *in vivo* on the levels of oxidized TLCL forms with additional one to eight oxygen atoms in rat kidney mitochondria TLCL + number of oxygen atoms; n = 3; * statistically significant difference compared to control (p < 0.05).

3.2.2. Effect of ischemia/reperfusion *in vivo* on the amounts of rat kidney cardiolipin and TLCL oxidation products

Quantitative analysis of TLCL in rat kidney mitochondria showed that TLCL amounts did not change during 30-min and 40-min ischemia with 30-min reperfusion; however, after 60-min ischemia and 30-min reperfusion TLCL amount increased 1.8 times compared to control and I30R30 group (p < 0.05) (Fig. 3.2.2.1.).

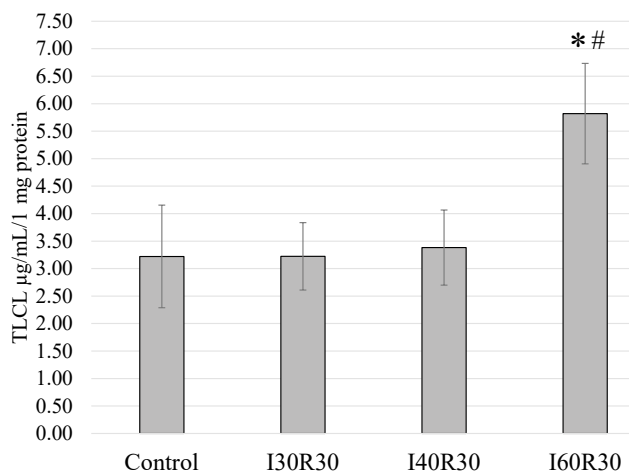


Fig. 3.2.2.1. *The effect of ischemia/reperfusion in vivo on the level of dominant cardiolipin TLCL in rat kidney mitochondria*

n = 3-5; I30R30 – 30-min ischemia and 30-min reperfusion; I40R30 – 40-min ischemia and 30-min reperfusion; I60R30 – 60-min ischemia and 30-min reperfusion; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to I30R30 ($p < 0.05$).

Then we analyzed the rest of cardiolipin forms, and we observed that after 30-min ischemia and 30-min reperfusion the amounts of six cardiolipin species decreased on average 57 % compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.2.2.2.). The most significant decrease was of CL (18:2)₃(20:4) and CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:6) which was 65 % and 63 % respectively ($p < 0.05$). After 40-min ischemia and 30-min reperfusion the amounts of nine cardiolipins decreased on average 62 % compared to control ($p < 0.05$). The most significant decrease was of the same cardiolipins CL (18:2)₃(20:4) and CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:6) which was 81 % and 80 % lower respectively compared to control ($p < 0.05$). After 60-min ischemia and 30-min reperfusion the amount of ten cardiolipin species decreased on average 59 % compared to control ($p < 0.05$). The most significant decrease was of CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:4) which was 81 % lower compared to control ($p < 0.05$).

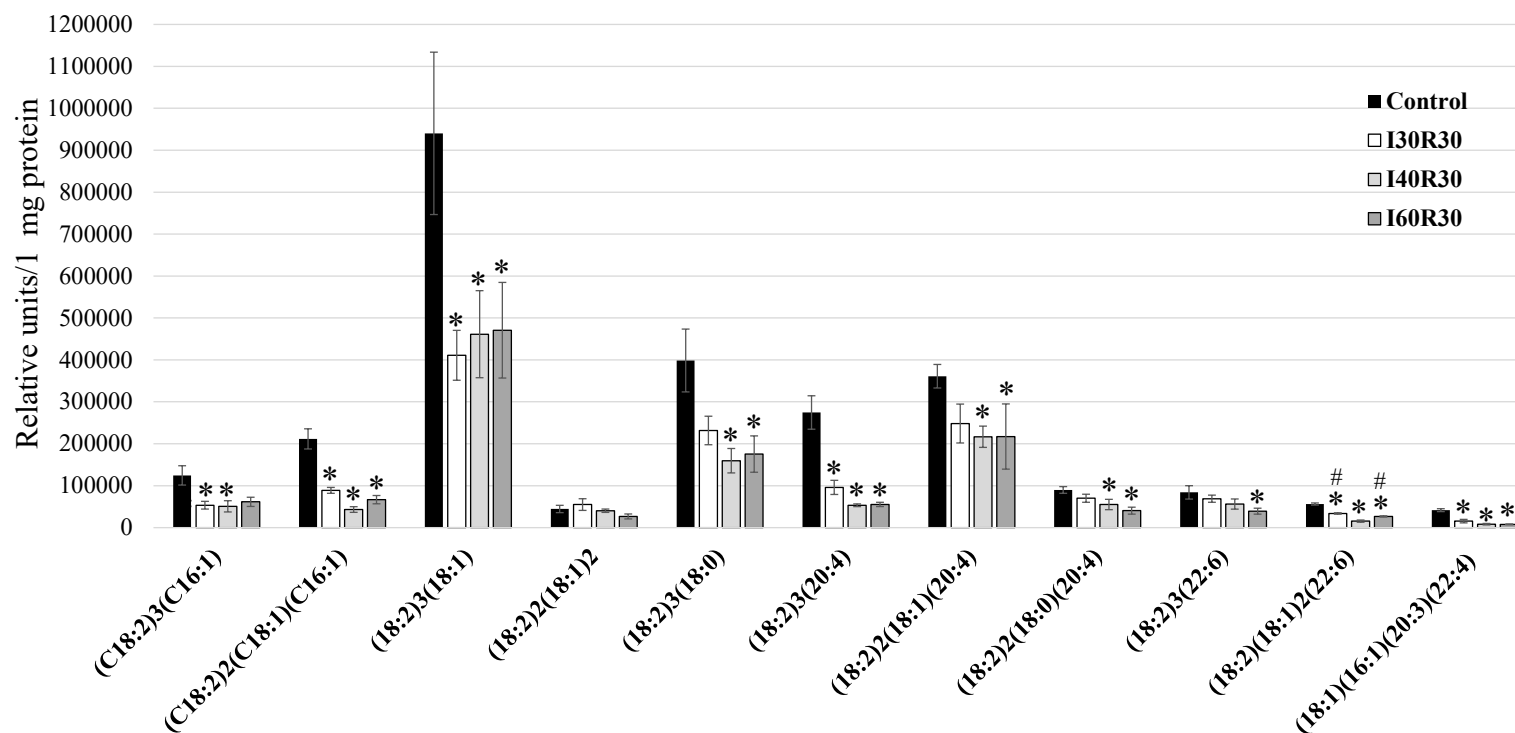


Fig. 3.2.2.2. The effect of ischemia/reperfusion *in vivo* on the levels of different cardiolipin species (cardiolipins with different fatty acid composition) in rat kidney mitochondria

n = 3-6; I30R30 – 30-min ischemia and 30-min reperfusion; I40R30 – 40-min ischemia and 30-min reperfusion; I60R30 – 60-min ischemia and 30-min reperfusion; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to I40R30 ($p < 0.05$).

Analysis of TLCL oxidation products revealed that almost all species increased on average 9.8 times after 60-min ischemia and 30-min reperfusion compared to control (Fig. 3.2.2.3.). The most significant increase was observed of TLCL with two and three additional oxygen atoms that was 28.2 and 23.6 times greater compared to control ($p < 0.05$). The amounts of TLCL with additional 1 and 4 oxygen atoms after 60-min ischemia and 30-min reperfusion were 8.3 and 7.7 times higher compared to control ($p < 0.05$). After 60-min ischemia and 30-min reperfusion the amount of TLCL with additional 6 atoms was 3.5 times higher compared to control ($p < 0.05$).

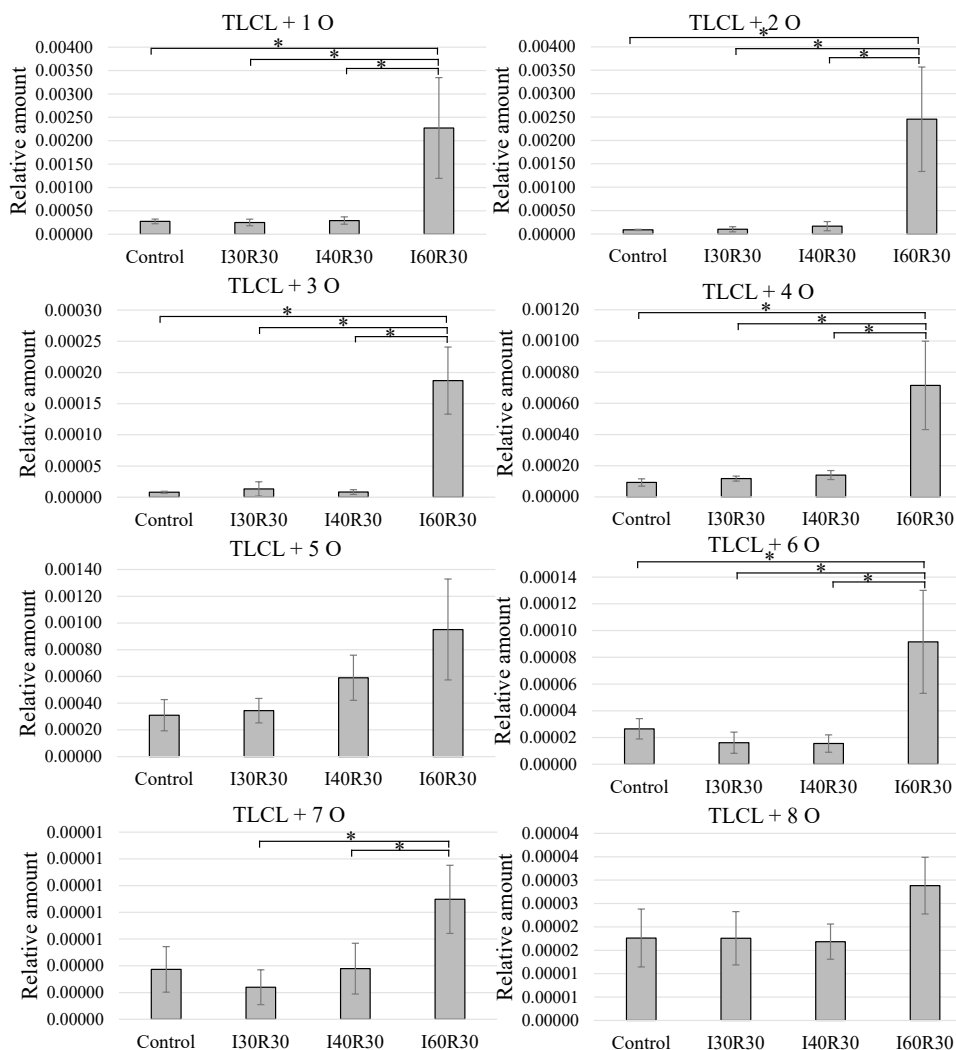


Fig. 3.2.2.3. The effect of ischemia/reperfusion *in vivo* on the levels of oxidized TLCL forms with additional one to eight oxygen atoms in rat kidney mitochondria

TLCL + number of oxygen atoms; n = 5; I30R30 – 30-min ischemia and 30-min reperfusion; I40R30 – 40-min ischemia and 30-min reperfusion; I60R30 – 60-min ischemia and 30-min reperfusion; * statistically significant difference between marked groups ($p < 0.05$).

Overall, the results show that after ischemia/reperfusion the amounts of most cardiolipin species decreased; however, the dominant TLCL amount increased after 60-min ischemia and 30-min reperfusion. In order to assess the reasons behind this increase we analyzed molecular mechanisms of cardiolipin resynthesis and remodeling.

3.2.3. The effect of ischemia/reperfusion *in vivo* on the gene expression of cardiolipin synthesis and remodeling enzymes in rat kidneys

Cardiolipin synthesis *de novo* occurs on the inner mitochondrial membrane where immature cardiolipin is synthesized. After *de novo* synthesis cardiolipin is remodeled – composition of its fatty acids is changed, therefore, generating mature and tissue-specific cardiolipin. We performed gene expression analysis of three enzymes implicated in cardiolipin synthesis and remodeling: 1. *CRLS1* gene of cardiolipin synthase, last enzyme of *de novo* synthesis pathway; 2. *TAZ* gene of remodeling enzyme tafazzin; 3. *LCLAT1* gene of lysocardiolipin acyltransferase 1, another remodeling enzyme [223].

Analysis of gene expression of these three genes in ischemia and control groups revealed that after 60-min ischemia *TAZ* gene expression increased 1.8-fold compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.2.3.1.). After 60-min ischemia gene expression of *CRLS1* decreased by 32 % compared to 30-min ischemia ($p < 0.05$), and *LCLAT1* decreased by 45 % compared to 40-min ischemia ($p < 0.05$).

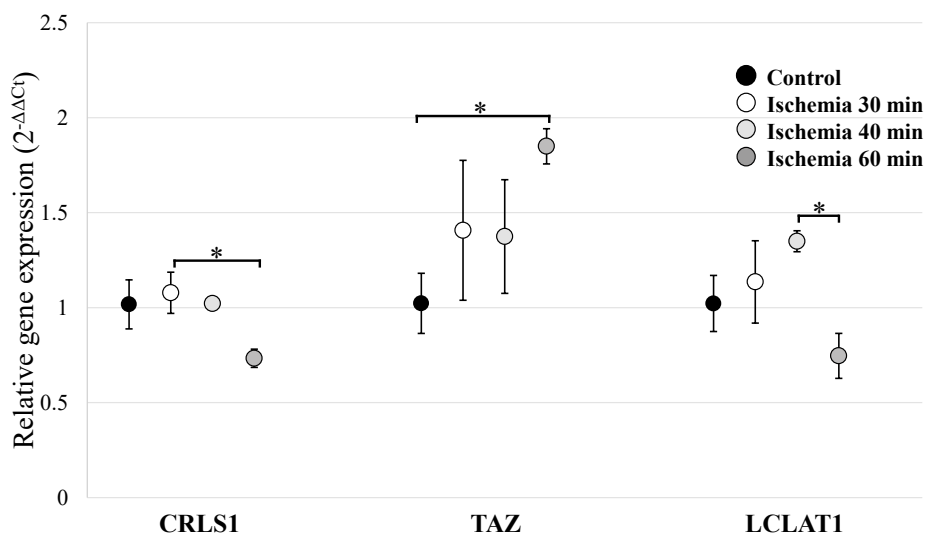


Fig. 3.2.3.1. The effect of ischemia *in vivo* on the gene expression of cardiolipin synthase (*CRLS1*), tafazzin (*TAZ*) and lysocardiolipin acyltransferase 1 (*LCLAT1*) in rat kidneys

n = 3; I30R30 – 30-min ischemia and 30-min reperfusion; I40R30 – 40-min ischemia and 30-min reperfusion; I60R30 – 60-min ischemia and 30-min reperfusion * statistically significant difference between marked groups ($p < 0.05$).

Later we analyzed gene expression in ischemia/reperfusion groups. Results showed that 30-min ischemia/30-reperfusion significantly decreased *CRLS1*, *TAZ*, *LCLAT1* gene expression by 79 % ($p < 0.05$), 58 % and 66 % ($p < 0.05$) respectively compared to control (Fig. 3.2.3.2.). After 40-min ischemia/30-min reperfusion gene expression of *CRLS1* and *LCLAT1* was decreased 55 % and 47 % respectively compared to control ($p < 0.05$). After 60-min ischemia/30-min reperfusion *TAZ* gene expression was 1.5-fold greater than control ($p < 0.05$) and 3.6-fold greater compared to 30-min ischemia/30-min reperfusion group ($p < 0.05$) while *LCLAT1* gene expression remained 57 % lower compared to control ($p < 0.05$). When comparing ischemia groups with the same duration ischemia and reperfusion group we observed that reperfusion itself caused a significant decrease of *CRLS1* and *TAZ* gene expression after 30-min and 40-min ischemia.

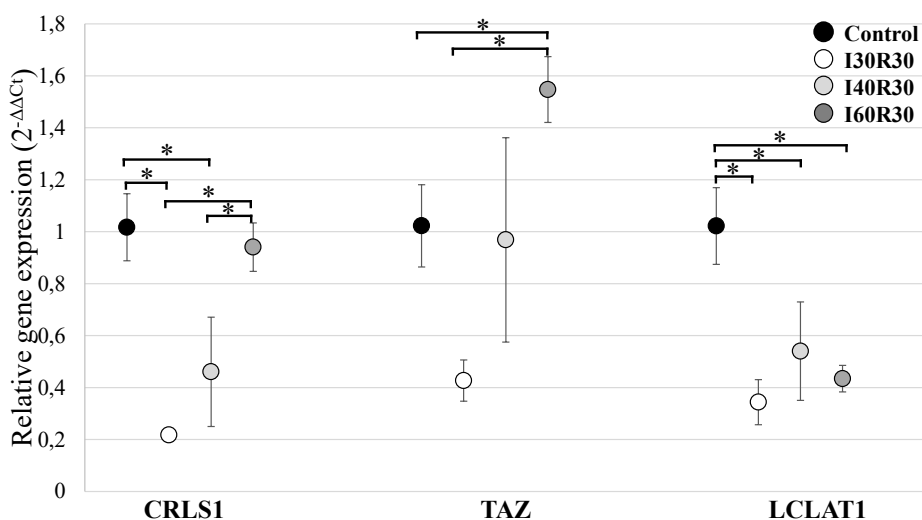


Fig. 3.2.3.2. The effect of ischemia/reperfusion in vivo on the gene expression of cardiolipin synthase (*CRLS1*), tafazzin (*TAZ*) and lysocardiolipin acyltransferase 1 (*LCLAT1*) in rat kidneys

$n = 3-4$; I30R30 – 30-min ischemia and 30-min reperfusion; I40R30 – 40-min ischemia and 30-min reperfusion; I60R30 – 60-min ischemia and 30-min reperfusion; * statistically significant difference between marked groups ($p < 0.05$).

Results indicate that cardiolipin amount increase after 60-min ischemia/30-min reperfusion could have occurred due to an increase of tafazzin gene expression.

3.3. The effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on human RPTEC cell viability, mitochondrial function, changes in cardiolipin amounts and associated molecular mechanisms

Further analysis on the effects of ischemia/reperfusion on cardiolipin alterations and associated molecular mechanisms was performed using *in vitro* models with human kidney RPTEC cell line – immortalized human renal proximal tubule epithelial cell line (RPTEC/TERT1). Renal proximal tubule cells are rich in mitochondria and use a lot of oxygen to supply the cells with enough ATP for active reabsorption. These cells are sensitive to oxygen fluctuations that occur during ischemia/reperfusion, therefore they can be a useful *in vitro* model to analyze ischemia/reperfusion-associated damage to cells [209]. We induced *in vitro* hypoxia by placing cells in a chamber in which atmospheric oxygen concentration was reduced to 2 % (hypoxic conditions), for reoxygenation the growth medium was replaced with fresh growth medium, and the cells were kept in normal conditions. Therefore, in this model only atmospheric oxygen concentration was altered.

3.3.1 The effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on human RPTEC cell viability and mitochondrial function

Before performing cardiolipin analysis in RPTEC cells we analyzed the effect of hypoxia/reoxygenation on the viability, proliferation, mitochondrial respiration and H_2O_2 generation rate. We observed no effect of *in vitro* hypoxia reoxygenation on cell viability which remained above 97.4 % in all groups (Fig. 3.3.1.1.).

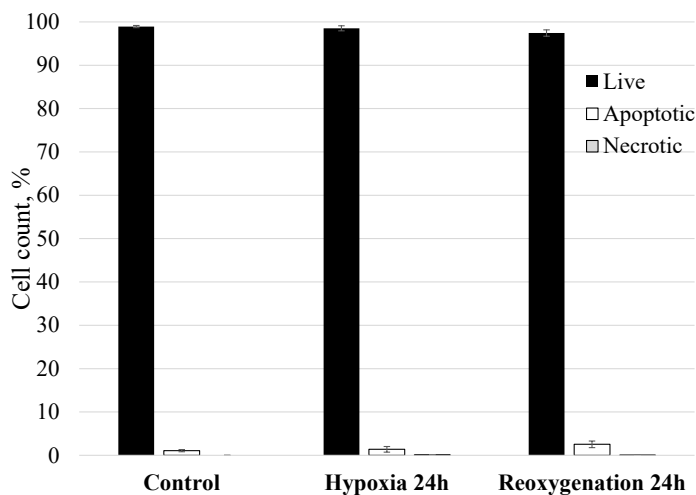


Fig. 3.3.1.1. *The effect of hypoxia/reoxygenation in vitro on the viability of human RPTEC cells*
n = 3.

We observed a decrease in RPTEC cell proliferation after hypoxia and reoxygenation by 41.5 % and 44.5 % respectively compared to control groups that were incubated for the same amount of time in normal conditions ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.1.2.).

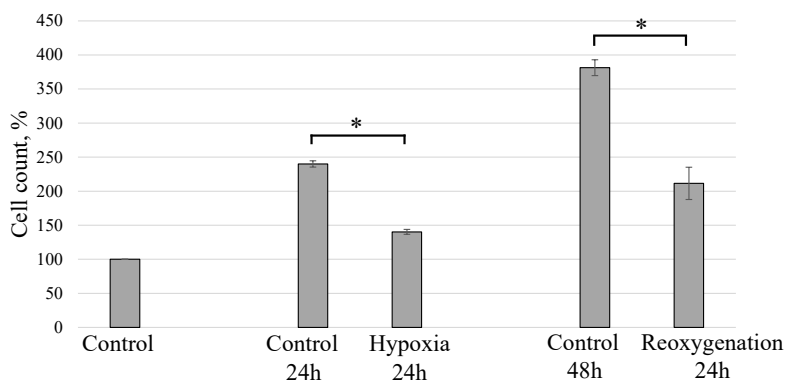


Fig. 3.3.1.2. *The effect of hypoxia/reoxygenation in vitro on the proliferation of human RPTEC cells*
n = 3; * statistically significant difference between marked groups ($p < 0.05$).

Next, we analyzed the effect of hypoxia/reoxygenation on mitochondrial respiration (oxygen consumption rate) and H_2O_2 generation rate in RPTEC cells. Mitochondrial oxygen consumption rate in leak state with glutamate/malate, substrates for complex I (L (I)), was increased 2,34 times after

24h reoxygenation compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.1.3.). Oxygen consumption rate in phosphorylation state (P(I)) decreased by 25 % after 24h hypoxia compared to control ($p < 0.05$) and increased by 27 % after 24h reoxygenation compared to 24h hypoxia group ($p < 0.05$). Mitochondrial oxygen consumption rate in the phosphorylation state with complex II substrate succinate (P(I+II)) was decreased by 32 % compared to control ($p < 0.05$), it increased by 23 % after 24h reoxygenation compared to hypoxia 24h group ($p < 0.05$); however, it still remained 19 % lower compared to control ($p < 0.05$). After adding cytochrome C, the oxygen consumption rate was measured (P (I+II+CytC)) and outer mitochondrial membrane permeability was evaluated but no effect of was observed in all groups. When carboxyatractyloside was added oxygen consumption rate in leak state (L (I+II+Cat)) was registered and inner mitochondrial membrane permeability was evaluated but no significant differences were registered among all groups. Finally, maximal electron transport capacity was evaluated after adding uncoupler dinitrophenol, it was observed that oxygen consumption rate in this state (E) decreased by 29 % after 24h hypoxia compared to control ($p < 0.05$). After 24h reoxygenation the oxygen consumption rate increased by 22 % compared to 24h hypoxia group ($p < 0.05$).

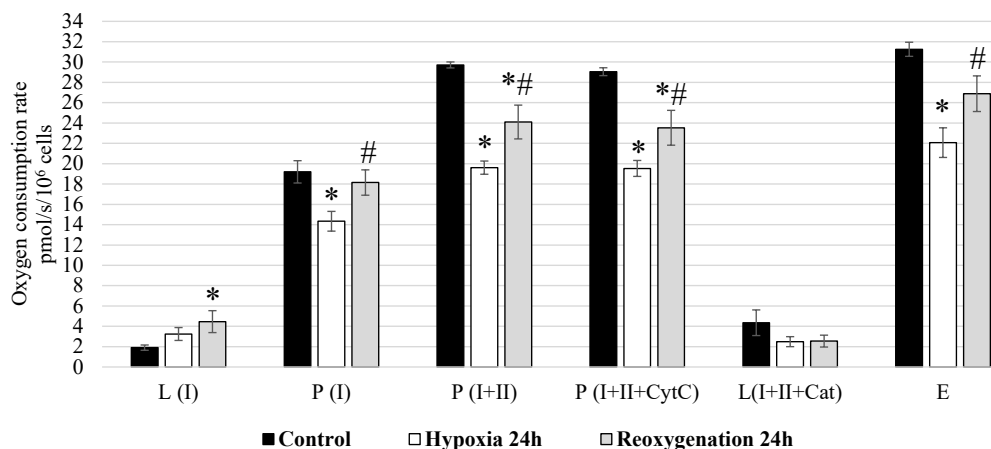


Fig. 3.3.1.3. *The effect of hypoxia/reoxygenation in vitro on the mitochondrial respiration in human RPTEC cells*

$n = 4$; L (I) – leak state with complex I substrates glutamate and malate; P (I) – phosphorylation state with complex I substrates glutamate and malate; P (I+II) – phosphorylation state with complex I and II substrates glutamate, malate and succinate; P (I+II+CytC) – phosphorylation state with complex I and II substrates glutamate, malate and succinate and with exogenous cytochrome C; L (I+II+Cat) – leak state with complex I and II substrates glutamate, malate and succinate and with carboxyatractyloside; E – maximal electron transport capacity; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to hypoxia 24h ($p < 0.05$).

Cytochrome C effect was calculated which shows alterations in mitochondrial outer membrane permeability; however, it remained lower than 1 in all groups indicating that outer mitochondrial membrane integrity was not damaged during hypoxia/reoxygenation (Fig. 3.3.1.4 A). Also, respiratory control index was calculated which shows phosphorylation capacity and it was observed that respiratory control index decreased significantly after 24h hypoxia and after 24h reoxygenation by 51 % and 53 % respectively ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.1.4 B).

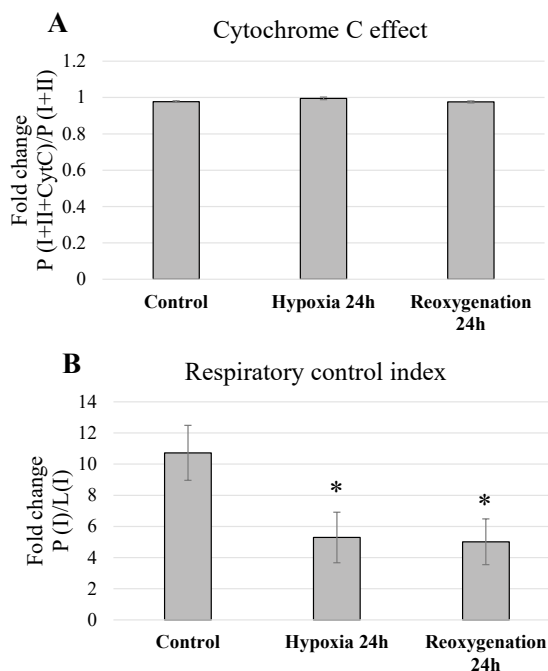


Fig. 3.3.1.4. *The effect of hypoxia/reoxygenation on cytochrome C effect and respiratory control index in human RPTEC cells*

$n = 4$; P (I+II+CytC) – mitochondrial oxygen consumption rate in phosphorylation state with complex I and II substrates glutamate, malate and succinate and with exogenous cytochrome C; P (I+II) – mitochondrial oxygen consumption rate in phosphorylation state with complex I and II substrates glutamate, malate and succinate; P (I) – mitochondrial oxygen consumption rate in phosphorylation state with complex I substrates glutamate and malate; L (I) – mitochondrial oxygen consumption rate in leak state with complex I substrates glutamate and malate; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$).

Next, we analyzed H_2O_2 generation rate in RPTEC cells and observed a 1.8-fold increase after 24h reoxygenation compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.1.5.).

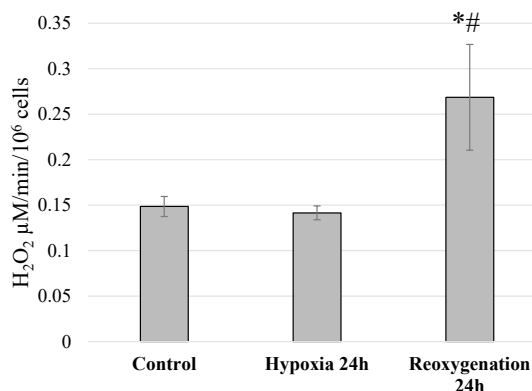


Fig. 3.3.1.5. *The effect of hypoxia/reoxygenation in vitro on H₂O₂ generation rate in human RPTEC cells*

n = 3; * statistically significant difference compared to control (p < 0.05); # statistically significant difference compared to hypoxia 24h (p < 0.05).

To summarize, the results show that hypoxia/reoxygenation did not affect RPTEC cell viability, but it reduced cell proliferation, mitochondrial respiration and increased H₂O₂ generation rate.

3.3.2. The effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on the amount of cardiolipin in RPTEC cells

In the next series of experiments, we analyzed human RPTEC cell cardiolipins and their alterations during hypoxia/reoxygenation. Firstly, total cardiolipin amount was analyzed in RPTEC cells using cardiolipin-specific fluorescent stain 10-N-nonylacridine orange (NAO). Fluorometric analysis revealed that NAO fluorescence intensity increased 1.7-fold after 24h reoxygenation compared to control (p < 0.05) (Fig. 3.3.2.1).

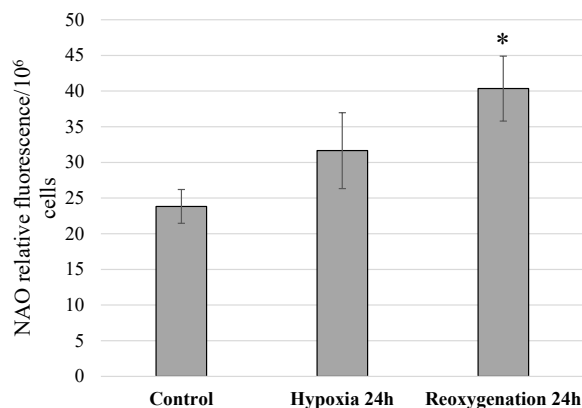


Fig. 3.3.2.1. *The effect of hypoxia/reoxygenation on NAO fluorescence intensity-total cardiolipin level in human RPTEC cells*

n = 5-6; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$).

Next, quantitative analysis of individual cardiolipin species was performed. The results in figure 3.3.2.2 show that after 24h hypoxia the levels of almost all cardiolipin species increased 1.4-22.5 times compared to control. The most significant increase after 24h hypoxia was observed in cardiolipins CL (18:2)₃(20:4), CL (18:2)₂(18:1)(20:4), CL (18:2)(18:1)₂(22:6) and CL (18:1)(16:1)(20:3)(22:4) which increased 22.5, 22.1, 21.6 and 19.4 respectively compared to control ($p < 0.05$). After 24h reoxygenation the amounts of most cardiolipins decreased compared to 24h hypoxia, but cardiolipins CL (18:2)(18:1)₂(16:1), CL (18:2)₃(18:1) and CL (18:2)₃(18:0) remained significantly increased compared to control ($p < 0.05$). After 24h reoxygenation the amounts of cardiolipins CL (18:2)₃(20:4), CL (18:2)₂(18:1)(20:4), CL (18:2)₃(22:6) and CL (18:2)(18:1)₂(22:6) substantially decreased 4.7, 5.6, 2.3 and 3.5 times respectively compared to 24h hypoxia. Despite the decrease, the amounts of these cardiolipin species remained significantly higher compared to control.

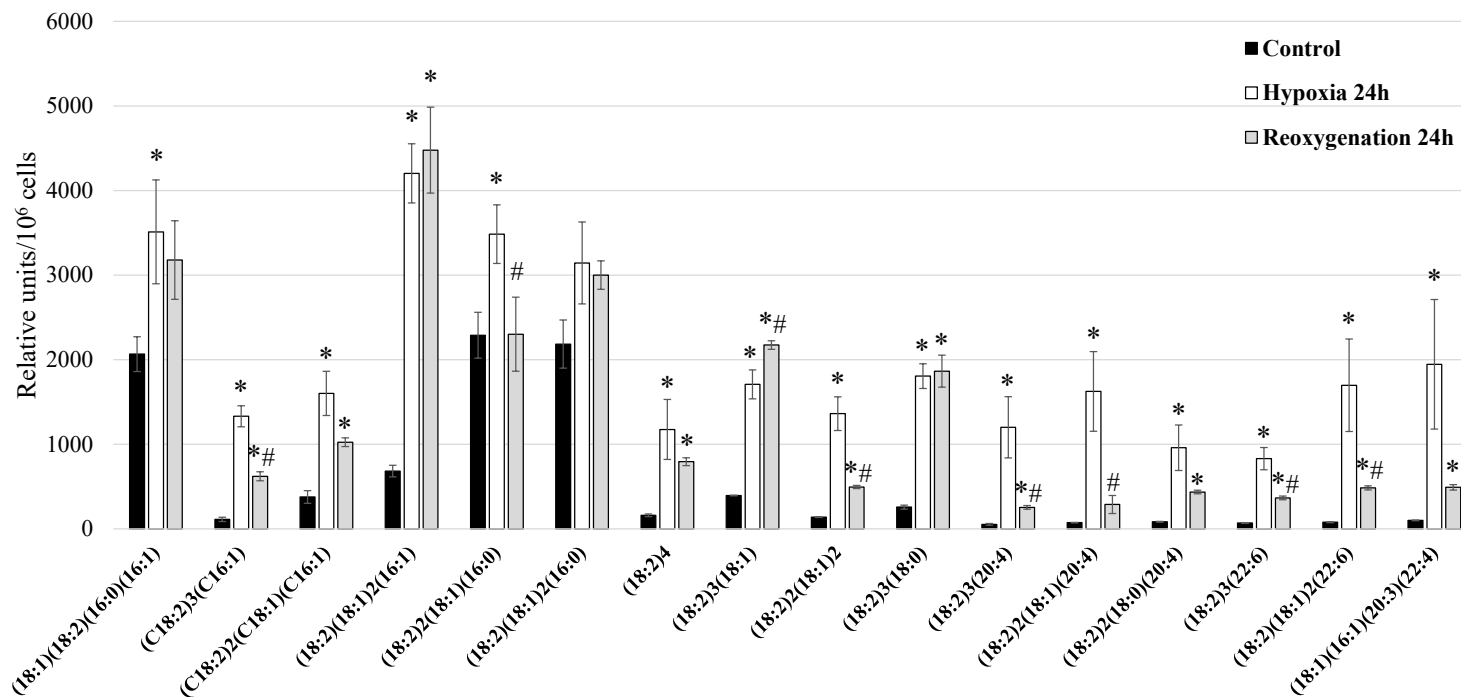


Fig. 3.3.2.2. The effect of hypoxia reoxygenation in vitro on levels of individual cardiolipin species in human RPTEC cells

n = 3-4; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$);

statistically significant difference compared to hypoxia 24h ($p < 0.05$).

3.3.3. The effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on the amounts of cardiolipin synthesis/remodeling enzymes, their gene expression and the amount of HIF-1 α in human RPTEC cells

After observing an increase in the amount of cardiolipin after hypoxia/reoxygenation in human RPTEC cells we further analyzed possible molecular mechanisms behind these changes. First, we evaluated the gene expression of previously mentioned enzymes implicated in cardiolipin synthesis and remodeling (see section 3.2.3.). It was determined that after 24h reoxygenation the gene expression of *CRLS1* and *LCLAT1* significantly increased 2.8 and 3.7 times compared to control ($p < 0.05$); however, it tended to increase during 24h hypoxia as well (Fig. 3.3.3.1.). *TAZ* gene expression was unaffected during hypoxia reoxygenation.

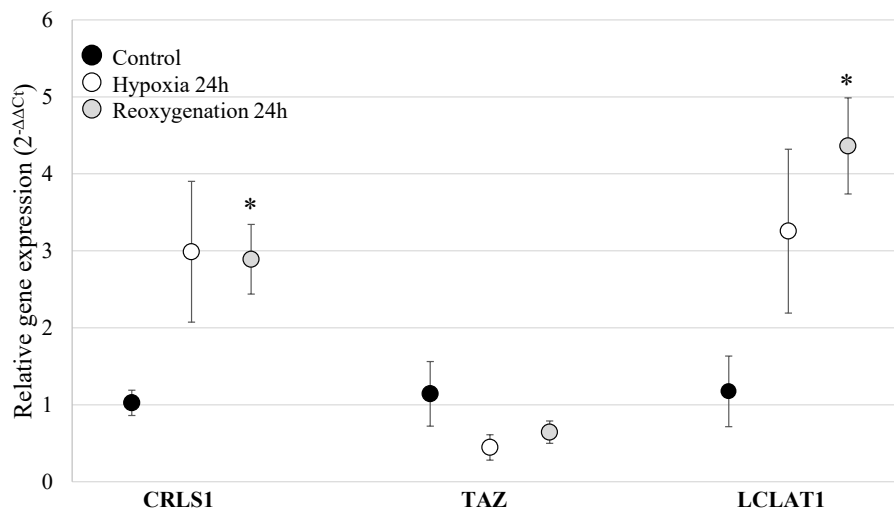


Fig. 3.3.3.1. The effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on cardiolipin synthase (*CRLS1*), tafazzin (*TAZ*) and lysocardiolipin acyltransferase 1 (*LCLAT1*) gene expression in human RPTEC cells

n = 3-4; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$).

Next, we analyzed the levels of cardiolipin synthesis/remodeling enzymes in RPTEC cell lysates. Again, there was a non-significant tendency for *CRLS1* and *LCLAT1* enzymes to increase after 24h hypoxia, but after 24h reoxygenation we observed a significant increase in the amounts of these enzymes 1.5 and 1.8 times respectively compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.3.2.). The amount of tafazzin was unaffected by hypoxia/reoxygenation. These results correlated with gene expression results.

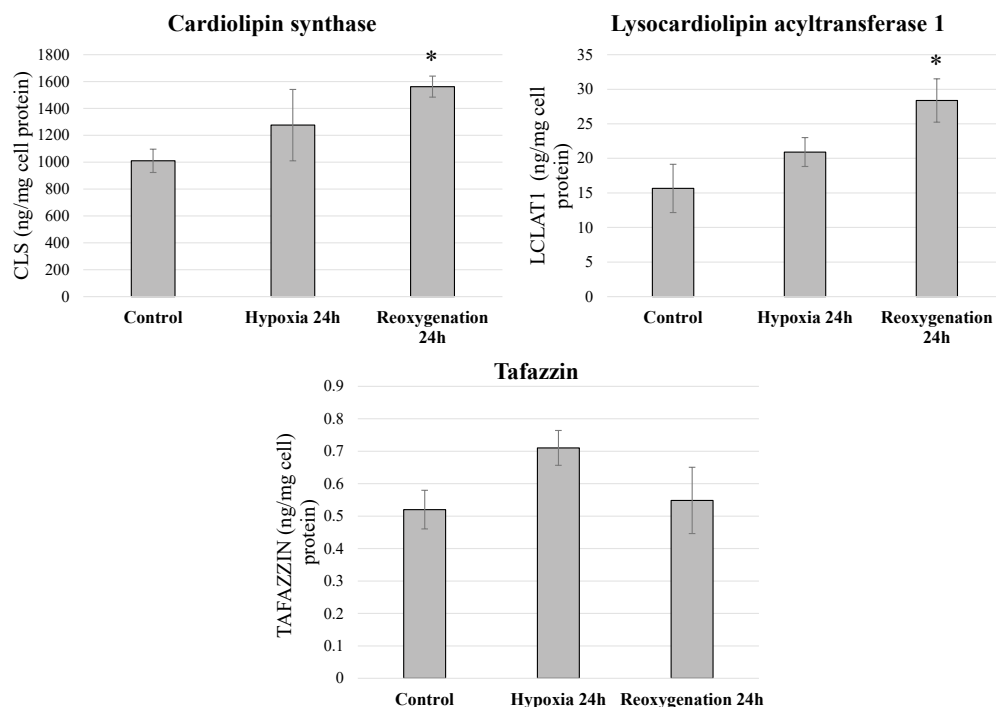


Fig. 3.3.3.2. Effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on the levels of cardiolipin synthase (CLS), tafazzin and lysocardiolipin acyltransferase 1 (LCLAT1) in human RPTEC cells

n = 3; * statistically significant difference compared to control (p < 0.05).

It is known that during hypoxia/reoxygenation the expression of many genes is modulated by hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) which increases during hypoxia due to decrease in its degradation [224]. To find out whether gene expression of cardiolipin synthesis/remodeling enzymes could have been modulated by HIF-1 α during hypoxia/reoxygenation we evaluated the effect of hypoxia/reoxygenation on the amount of HIF-1 α in RPTEC cell. There was only a tendency for HIF-1 α amount to increase after 24h reoxygenation, but no other significant changes were observed after hypoxia/reoxygenation (Fig. 3.3.3.3.).

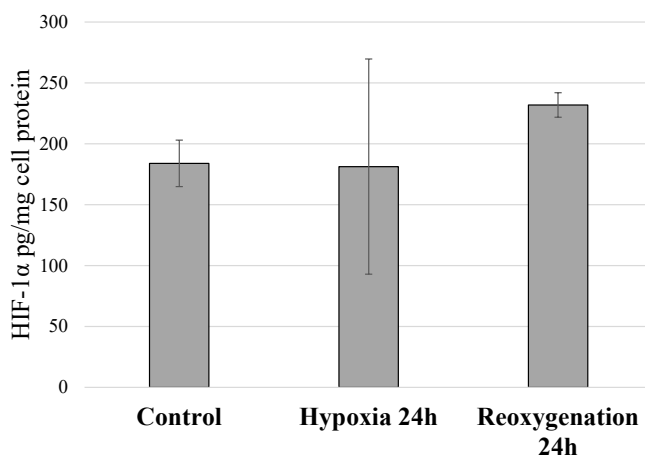


Fig. 3.3.3.3. *The effect of hypoxia/reoxygenation in vitro on the level of HIF-1α in human RPTEC cells*

n = 3.

3.3.4. The effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on lipid peroxidation and hydrolysis in human RPTEC cells

UPLC-MS/MS analysis of cardiolipins showed that during reoxygenation the levels of several individual cardiolipin species decrease, and the most significant decrease was observed among cardiolipins with long-chain polyunsaturated fatty acids. It was also determined that after 24h reoxygenation H_2O_2 generation increases which could induce oxidation of the mentioned cardiolipins, therefore, we wanted to determine the amount of lipid peroxidation products. One of such products is malondialdehyde, a final product of polyunsaturated fatty acid peroxidation, which is considered a marker of oxidative stress [193]. Analysis showed that the amount of malondialdehyde increased around 2-fold after 24h reoxygenation compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.4.1.).

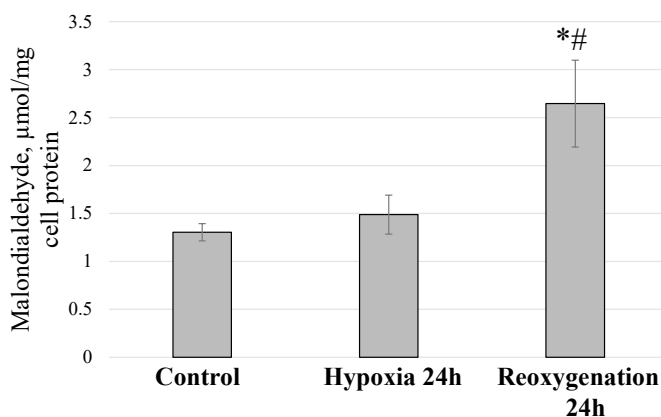


Fig. 3.3.4.1. *The effect of hypoxia/reoxygenation in vitro on the level of malondialdehyde in human RPTEC cells*

$n = 4$; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to hypoxia 24h ($p < 0.05$).

The decrease in cardiolipin individual species during reoxygenation could also happen due to their hydrolysis. It is known that mitochondrial calcium-independent phospholipase $A_2\gamma$ (iPLA $_2\gamma$, also known as PNPLA8 (patatin-like phospholipase domain-containing 8), is a membrane-bound enzyme that is responsible for hydrolysis of glycerophospholipids and homeostasis of membrane phospholipids. Also, there are data showing that this phospholipase hydrolyzes oxidized cardiolipin [198,225]. To find out if the decrease of individual cardiolipin species could have occurred due to their hydrolysis we evaluated the effect of hypoxia/reoxygenation on iPLA $_2\gamma$ amount in human RPTEC cells using Western Blot method. We observed that after 24h reoxygenation PNPLA8 relative amount was increased 2.2-fold compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.4.2.).

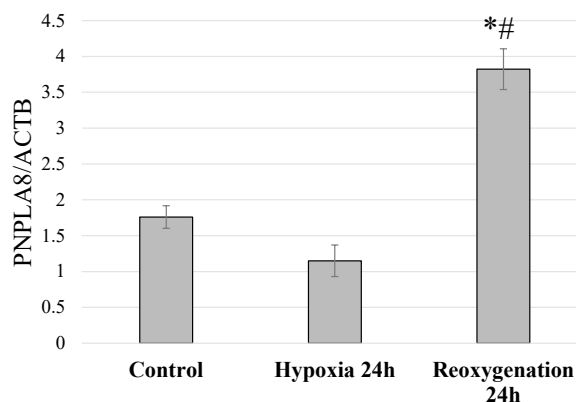


Fig. 3.3.4.2. The effect of hypoxia/reoxygenation *in vitro* on the relative amount of phospholipase $A_{2\gamma}$ (PNPLA8) in human RPTEC cells

n = 3-4; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to hypoxia 24h ($p < 0.05$).

3.3.5. The effect of hypoxia/reoxygenation and 2-deoxy-D-glucose *in vitro* on cardiolipin metabolism in human RPTEC cells

During ischemia/reperfusion in the kidneys along with the decrease of oxygen there is also a decrease in nutrients. One of the *in vitro* models to analyze the effect of ischemia/reperfusion is oxygen-glucose deprivation model [211], which was also used in our experiments. We performed the same *in vitro* hypoxia/reoxygenation model as described before and during hypoxia we added 2-deoxy-D-glucose (2-dG), which is an inhibitor of a glycolytic enzyme hexokinase [226]. Firstly, we analyzed total cardiolipin amount with NAO and observed that after 24h hypoxia with 2-dG total cardiolipin amount was 31 % lower comparing to control ($p < 0.05$) and it was also 38 % and 37 % lower compared to control + 2-dG and reoxygenation 24h + 2-dG respectively ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.5.1.).

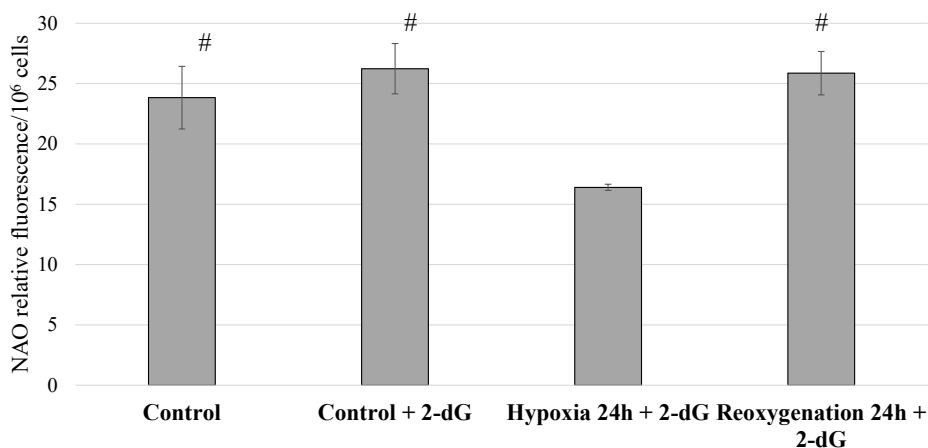


Fig. 3.3.5.1. *The effect of hypoxia/reoxygenation and 2-deoxy-D-glucose on NAO fluorescence intensity-total cardiolipin level in human RPTEC cells*
n = 4-6; # statistically significant difference compared to hypoxia 24h + 2-dG (p < 0.05).

Next, the levels of individual cardiolipin species were analyzed using UPLC-MS/MS. It was observed that 2-dG itself significantly increased the amounts of all cardiolipin species in control cells (incubated with 2-dG), the increase was on average 23-fold compared to control (p < 0.05) (Fig.3.3.5.2). The biggest increase was observed with cardiolipins CL (18:2)₃(18:0) and CL (C18:2)₄, that increased 43 and 42 times respectively compared to control (p < 0.05). After 24h hypoxia with 2-dG the levels of cardiolipins were higher than control levels but several species with smaller masses (with only C18 and C16 fatty acids) decreased comparing to control + 2-dG. The biggest decrease was observed with cardiolipins CL (C18:2)₂(C18:1)(C16:1) and CL (18:2)₂(18:1)(16:0) which decreased by 73 % and 69 % respectively compared to control + 2-dG (p < 0.05). After 24h reoxygenation + 2-dG the amounts of most cardiolipins remained higher than control levels but they were also lower than control + 2-dG. The amounts of cardiolipins CL (18:2)₄, CL (18:2)₃(18:1) and CL (18:2)₃(18:0) decreased after 24h reoxygenation + 2-dG by 74 %, 69 % and 29 % respectively compared to control + 2-dG (p < 0.05). In summary, it was determined that 2-deoxy-D-glucose increased individual cardiolipin levels in control cells; however, after hypoxia/reoxygenation the levels decreased compared to control + 2-dG.

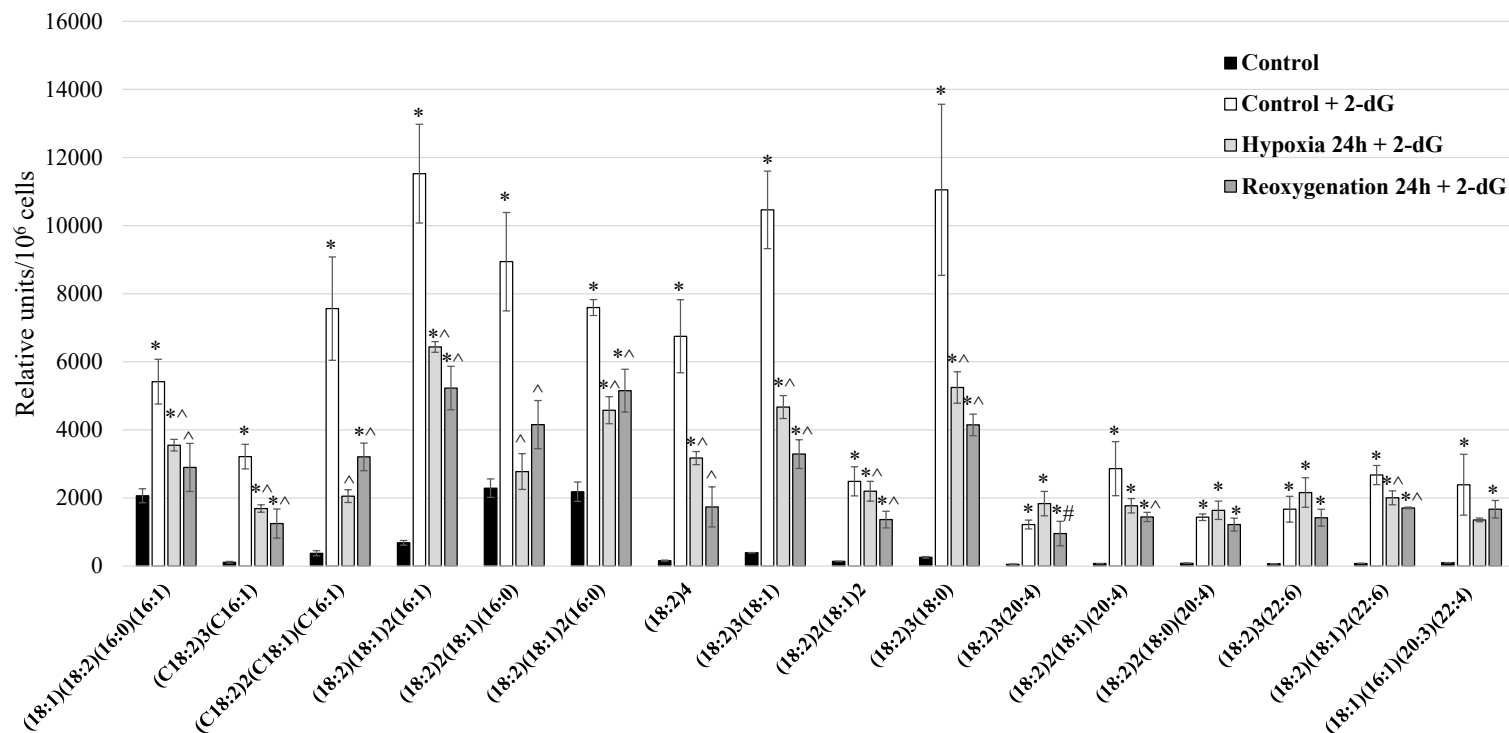


Fig. 3.3.5.2. The effect of hypoxia reoxygenation and 2-deoxy-D-glucose in vitro on levels of individual cardiolipin species in human RPTEC cells

n = 3-4; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); ^ statistically significant difference compared to control + 2-dG ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to hypoxia 24h + 2-dG 24h ($p < 0.05$).

Then, gene expression analysis was performed. No significant changes among the experimental groups were observed; however, *TAZ* expression decreased by 61 % after 24h reoxygenation + 2-dG compared to control (p < 0.05) (Fig. 3.3.5.3.).

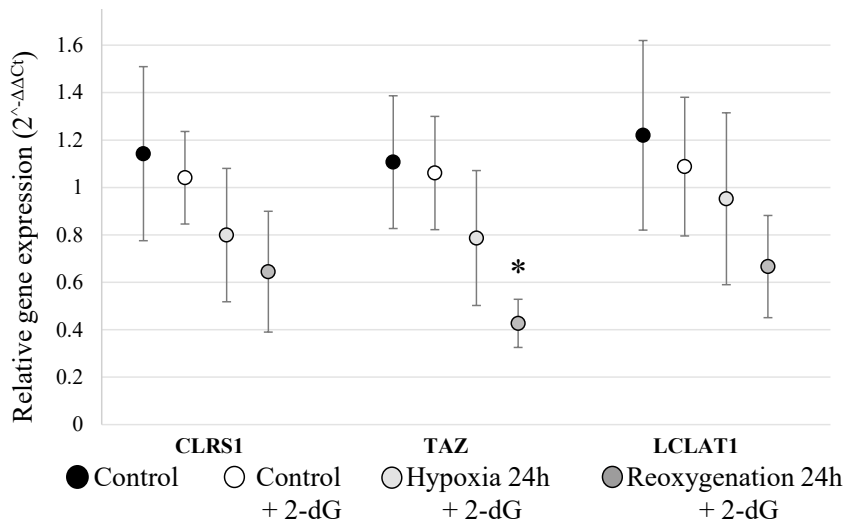


Fig. 3.3.5.3. The effect of hypoxia/reoxygenation and 2-deoxy-D-glucose *in vitro* on cardiolipin synthase (*CLRS1*), tafazzin (*TAZ*) and lysocardiolipin acyltransferase 1 (*LCLAT1*) gene expression in human RPTEC cells

n = 3-4; * statistically significant difference compared to control (p < 0.05).

After gene expression analysis we evaluated the levels of cardiolipin synthesis/remodeling enzymes in RPTEC cell lysates. It was observed that tafazzin amount increased 1.9-fold in control + 2-dG group compared to control (p < 0.05) (Fig. 3.3.5.4.). After 24h hypoxia + 2-dG cardiolipin synthase and tafazzin levels decreased by 56 % and 90 % respectively compared to control (p < 0.05) and by 87 % and 97 % respectively compared to control + 2-dG (p < 0.05). After 24h reoxygenation + 2-dG cardiolipin synthase level was almost restored to control level, while lysocardiolipin acyltransferase 1 levels tended to increase. The amount of tafazzin increased 9.1-fold after 24h reoxygenation + 2-dG compared to 24h hypoxia + 2-dG (p < 0.05); however, it was still 54 % less compared to control + 2-dG (p < 0.05).

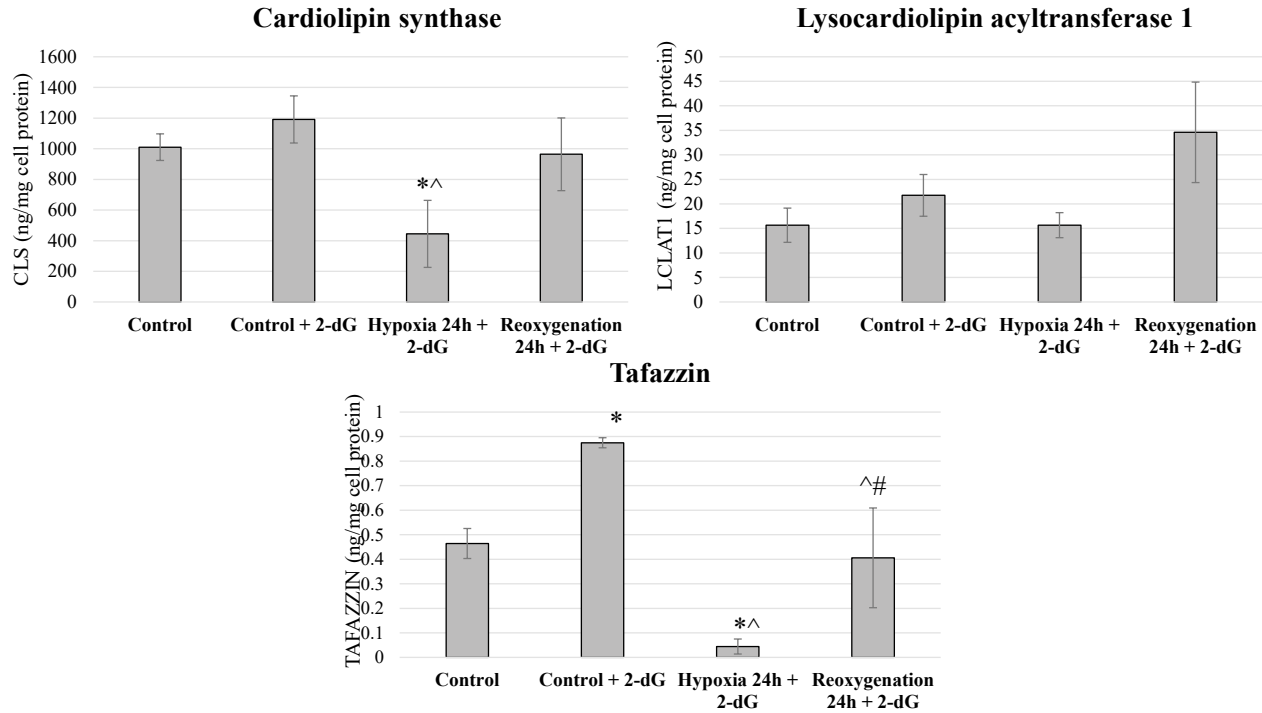


Fig. 3.3.5.4. Effect of hypoxia/reoxygenation and 2-deoxy-D-glucose in vitro on the levels of cardiolipin synthase (CLS), tafazzin and lysocardiolipin acyltransferase 1 (LCLAT1) in human RPTEC cells

n = 3; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$); ^ statistically significant difference compared to control + 2-dG ($p < 0.05$); # statistically significant difference compared to hypoxia 24h + 2-dG ($p < 0.05$).

Next, H_2O_2 generation rate was evaluated, and it was observed that in groups with 2-deoxy-D-glucose H_2O_2 generation rate was significantly elevated – it was 1.8-fold, 1.5-fold and 1.7-fold higher in control + 2-dG, 24h hypoxia + 2-dG and 24h reoxygenation + 2-dG respectively compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.5.5.).

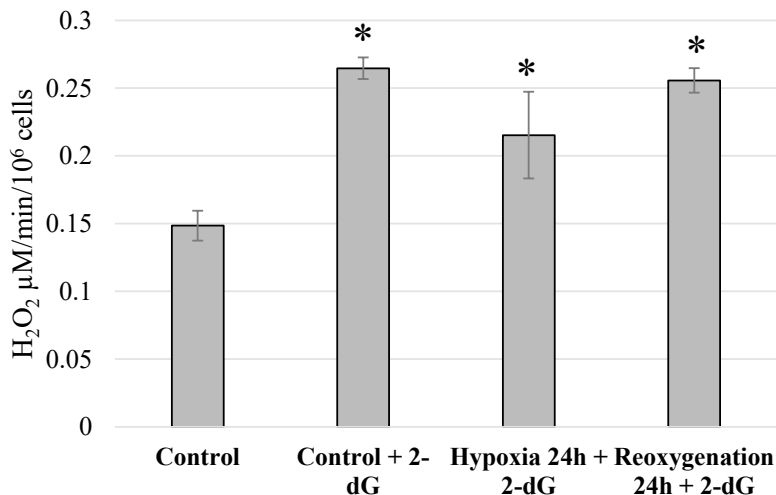


Fig. 3.3.5.5. *The effect of hypoxia/reoxygenation and 2-deoxyglucose in vitro on H_2O_2 generation rate in human RPTEC cells*

$n = 3$; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$).

And finally, we evaluated $iPLA_2\gamma$ levels in RPTEC cells and saw that $iPLA_2\gamma$ amount was elevated 2-fold after 24h hypoxia + 2-dG compared to control ($p < 0.05$) (Fig. 3.3.5.6.). No other significant changes were observed among experimental groups.

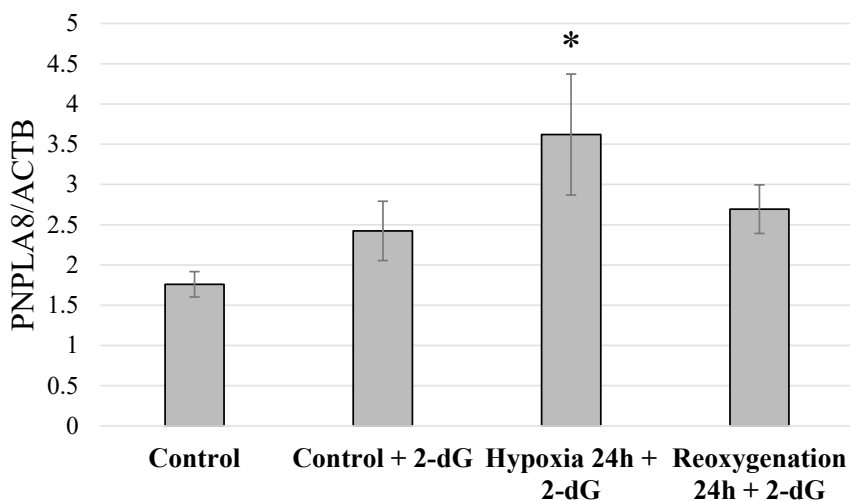


Fig. 3.3.5.6. The effect of hypoxia/reoxygenation and 2-deoxy-D-glucose *in vitro* on the relative amount of phospholipase $A_2\gamma$ (PNPLA8) in human RPTEC cells

n = 3-4; * statistically significant difference compared to control ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS

1. Ischemia and ischemia/reperfusion *in vivo* decrease the levels of all investigated cardiolipin species except for tetra-linoleoyl cardiolipin, which significantly increases 1.8-fold during reperfusion in rat kidney mitochondria.
2. Hypoxia/reoxygenation *in vitro* increases cardiolipin levels in human kidney cells: levels of individual cardiolipin species increase up to 22.5-fold during hypoxia, after reoxygenation cardiolipin levels remain higher than control.
3. Ischemia/reperfusion *in vivo* induces tetra-linoleoyl cardiolipin oxidation in rat kidney mitochondria, cardiolipin is oxidized by addition of one to eight extra oxygen atoms.
4. Hypoxia/reoxygenation *in vitro* induces peroxidation of all lipids in human kidney cells: a) reactive oxygen species generation rate increases 1.8-fold; b) level of malondialdehyde increases 2-fold; c) the level of phospholipase $A_2\gamma$, which hydrolyses oxidized cardiolipins, increases 2.2-fold.

5. The gene expression of cardiolipin remodeling enzyme tafazzin increases after 60-minute ischemia and after 60-minute ischemia/30-minute reperfusion *in vivo* in rat kidney mitochondria.
6. Hypoxia/reoxygenation *in vitro* increases gene expression of cardiolipin synthase and lysocardiolipin acyltransferase 1, therefore increasing the amounts of these enzymes in human kidney cells.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Schlame M. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. Vol. 49, *Journal of Lipid Research*. 2008. p. 1607–20.
- Unsay JD, Cosentino K, Subburaj Y, García-Sáez AJ. Cardiolipin effects on membrane structure and dynamics. *Langmuir*. 2013;29(51):15878–87.
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res*. 2000;39(3):257–88.
- Bradley RM, Stark KD, Duncan RE. Influence of tissue, diet, and enzymatic remodeling on cardiolipin fatty acyl profile. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60:1804–18.
- Venkatraman K, Budin I. Cardiolipin remodeling maintains the inner mitochondrial membrane in cells with saturated lipidomes. *J Lipid Res* [Internet]. 2024;65(8):100601. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2024.100601>
- Kameoka S, Adachi Y, Okamoto K, Iijima M, Sesaki H. Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends Cell Biol*. 2018;28(1):67–76.
- Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2014;1837(4):408–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006>
- Kagan VE, Chu CT, Tyurina YY, Cheikhi A, Bayir H. Cardiolipin asymmetry, oxidation and signaling. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2014;179:64–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.11.010>
- Li XX, Tsoi B, Li YF, Kurihara H, He RR. Cardiolipin and Its Different Properties in Mitophagy and Apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(5):301–11.
- Shilovsky GA, Putyatina TS, Ashapkin V V., Yamskova O V., Lyubetsky VA, Sorokina E V., et al. Biological Diversity and Remodeling of Cardiolipin in Oxidative Stress and Age-Related Pathologies. *Biochem*. 2019;84(12–13):1469–83.
- Shen Z, Ye C, McCain K, Greenberg ML. The Role of Cardiolipin in Cardiovascular Health. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
- Vähäheikkilä M, Peltomaa T, Róg T, Vazdar M, Pöyry S, Vattulainen I. How cardiolipin peroxidation alters the properties of the inner mitochondrial membrane? *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2018;214(May):15–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.04.005>
- Yin H, Zhu M. Free radical oxidation of cardiolipin: Chemical mechanisms, detection and implication in apoptosis, mitochondrial dysfunction and human diseases. *Free Radic Res*. 2012;46(8):959–74.
- Zhou T, Prather ER, Garrison DE, Zuo L. Interplay between ROS and antioxidants during ischemia-reperfusion injuries in cardiac and skeletal muscle. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
- Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-E-Silva O. Ischemia/reperfusion injury revisited: An overview of the latest pharmacological strategies. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
- Gronda E, Palazzuoli A, Iacoviello M, Benevenuto M, Gabrielli D, Arduini A. Renal Oxygen Demand and Nephron Function: Is Glucose a Friend or Foe? *Int J Mol Sci*. 2023;24(12).
- Li C, Yu Y, Zhu S, Hu Y, Ling X, Xu L, et al. The emerging role of regulated cell death in ischemia and reperfusion-induced acute kidney injury: current evidence and future perspectives. *Cell Death Discov*. 2024;10(1):1–10.
- Zhao H, Alam A, Soo AP, George AJT, Ma D. Ischemia-Reperfusion Injury Reduces Long Term Renal Graft Survival: Mechanism and Beyond. *EBioMedicine* [Internet]. 2018;28:31–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.025>

19. Han SJ, Thomas Lee H. Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury. *Kidney Res Clin Pract.* 2019;38(4):427–40.
20. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Cardiolipin alterations and mitochondrial dysfunction in heart ischemia/reperfusion injury. *Clin Lipidol.* 2015;10(5):415–29.
21. Ji J, Baart S, Vikulina AS, Clark RSB, Anthonymuthu TS, Tyurin VA, et al. Deciphering of mitochondrial cardiolipin oxidative signaling in cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015;35(2):319–28.
22. Shao H, Li J, Zhou Y, Ge Z, Fan J, Shao Z, et al. Dose-dependent protective effect of propofol against mitochondrial dysfunction in ischaemic/reperfused rat heart: Role of cardiolipin. *Br J Pharmacol.* 2008;153(8):1641–9.
23. Lapi D, Stornaiuolo M, Sabatino L, Sommella E, Tenore G, Daglia M, et al. The Pomace Extract Taurisolo Protects Rat Brain From Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Cell Neurosci.* 2020;14(January):1–13.
24. Kim J, Perales Villarreal JP, Zhang W, Yin T, Shinozaki K, Hong A, et al. The responses of tissues from the brain, heart, kidney, and liver to resuscitation following prolonged cardiac arrest by examining mitochondrial respiration in rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016.
25. Tam J, Hong A, Naranjo PM, Yin T, Shinozaki K, Lampe JW, et al. The role of decreased cardiolipin and impaired electron transport chain in brain damage due to cardiac arrest. 2018;120:200–5.
26. Wadsworth AB, Pangborn MC. A New Serologically Active Phospholipid from Beef Heart . 1941;1939–41.
27. Pangborn MC. Isolation and Purification of a Serologically Active Phospholipid From Beef Heart. *J Biol Chem [Internet].* 1942;143(1):247–56. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)72683-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)72683-5)
28. Wriessnegger T, Gübitz G, Leitner E, Ingolic E, Cregg J, de la Cruz BJ, et al. Lipid composition of peroxisomes from the yeast *Pichia pastoris* grown on different carbon sources. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2007;1771(4):455–61.
29. Albert CJ, Anbukumar DS, Monda JK, Eckelkamp JT, Ford DA. Myocardial Lipidomics. Developments in myocardial nuclear lipidomics. *Front Biosci.* 2007;(12):2750–60.
30. Gold VAM, Robson A, Bao H, Romantsov T, Duong F, Collinson I. The action of cardiolipin on the bacterial translocon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(22):10044–9.
31. Dudek J. Role of cardiolipin in mitochondrial signaling pathways. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5(SEP):1–17.
32. Simbeni R, Pon L, Zinser E, Paltauf F, Daum G. Mitochondrial membrane contact sites of yeast: Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J Biol Chem [Internet].* 1991;266(16):10047–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99184-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99184-2)
33. Daum G, Vance JE. Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res.* 1997;36(2–3):103–30.
34. Gebert N, Joshi AS, Kutik S, Becker T, McKenzie M, Guan XL, et al. Mitochondrial Cardiolipin Involved in Outer-Membrane Protein Biogenesis: Implications for Barth Syndrome. *Curr Biol [Internet].* 2009;19(24):2133–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.074>
35. De Kroon AIPM, Dolis D, Mayer A, Lill R, De Kruijff B. Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1997;1325(1):108–16.

36. Olofsson G, Sparr E. Ionization Constants pKa of Cardiolipin. *PLoS One*. 2013;8(9).
37. Sathappa M, Alder NN. The ionization properties of cardiolipin and its variants in model bilayers. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1858(6):1362–72.
38. Malyska D, Pandiscia LA, Schweitzer-Stenner R. Cardiolipin containing liposomes are fully ionized at physiological pH. An FT-IR study of phosphate group ionization. *Vib Spectrosc [Internet]*. 2014;75:86–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2014.10.003>
39. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*. 2019;8(7):728.
40. Planas-Iglesias J, Dwarakanath H, Mohammadyani D, Yanamala N, Kagan VE, Klein-Seetharaman J. Cardiolipin Interactions with Proteins. *Biophys J [Internet]*. 2015;109(6):1282–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.07.034>
41. Boyd KJ, Alder NN, May ER. Buckling under Pressure: Curvature-Based Lipid Segregation and Stability Modulation in Cardiolipin-Containing Bilayers. *Langmuir*. 2017;33(27):6937–46.
42. Elías-Wolff F, Lindén M, Lyubartsev AP, Brandt EG. Curvature sensing by cardiolipin in simulated buckled membranes. *Soft Matter*. 2019;15(4):792–802.
43. Diagne A, Fauvel J, Record M, Chap H, Douste-Blazy L. Studies on ether phospholipids. II. Comparative composition of various tissues from human, rat and guinea pig. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1984;793(2):221–31.
44. Wang ZM, Ying Z, Bosy-Westphal A, Zhang J, Schautz B, Later W, et al. Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: Evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(6):1369–77.
45. Xu L, Schmitt M V., Ruan H, Jiao Y, Wang X, Wang Y, et al. Systematic analysis of the whole-body tissue distribution and fatty acid compositions of membrane lipids in CD1 and NMRI mice and Wistar rats. *Int J Anal Chem*. 2020;2020.
46. Getz GS, Bartley W, Lurie D, Notton BM. The phospholipids of various sheep organs, rat liver and of their subcellular fractions. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1968;152(2):325–39.
47. Pangborn MC. The composition of cardiolipin. *J Biol Chem [Internet]*. 1947;168(1):351–61. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)35123-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)35123-2)
48. Schlame M, Otten D. Analysis of cardiolipin molecular species by high-performance liquid chromatography of its derivative 1,3-bisphosphatidyl-2-benzoyl-sn-glycerol dimethyl ester. *Anal Biochem*. 1991;195(2):290–5.
49. Oemer G, Lackner K, Muigg K, Krumschnabel G, Watschinger K, Sailer S, et al. Molecular structural diversity of mitochondrial cardiolipins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(16):4158–63.
50. Wang HYJ, Jackson SN, Woods AS. Direct MALDI-MS Analysis of Cardiolipin from Rat Organs Sections. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2007;18(3):567–77.
51. Han X, Yang K, Yang J, Cheng H, Gross RW. Shotgun lipidomics of cardiolipin molecular species in lipid extracts of biological samples. *J Lipid Res*. 2006;47(4):864–79.
52. Schlame M, Ren M, Xu Y, Greenberg ML, Haller I. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins. *Chem Phys Lipids*. 2005;138(1–2):38–49.
53. Kiebish MA, Han X, Cheng H, Chuang JH, Seyfried TN. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: Lipidomic evidence supporting the Warburg theory of cancer. *J Lipid Res*. 2008;49(12):2545–56.
54. Ren M, Xu Y, Erdjument-Bromage H, Donelian A, Phoon CKL, Terada N, et al. Extramitochondrial cardiolipin suggests a novel function of mitochondria in spermatogenesis. *J Cell Biol*. 2019;218(5):1491–502.

55. Lee HJ, Mayette J, Rapoport SI, Bazinet RP. Selective remodeling of cardiolipin fatty acids in the aged rat heart. *Lipids Health Dis.* 2006;5:1–4.
56. Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(16):2493–506.
57. Tatsuta T, Langer T. Intramitochondrial phospholipid trafficking. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2017;1862(1):81–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.08.006>
58. Miliara X, Garnett JA, Tatsuta T, Abid Ali F, Baldie H, Pérez-Dorado I, et al. Structural insight into the TRIAP 1/ PRELI -like domain family of mitochondrial phospholipid transfer complexes . *EMBO Rep.* 2015;16(7):824–35.
59. Ye C, Shen Z, Greenberg ML. Cardiolipin remodeling: a regulatory hub for modulating cardiolipin metabolism and function. *Physiol Behav.* 2016;48(2):113–23.
60. Ridgway ND. Phospholipid Synthesis in Mammalian Cells [Internet]. Sixth Edit. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes: Sixth Edition.* Elsevier; 2016. 209–236 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63438-2.00007-9>
61. Blunsom NJ, Cockcroft S. CDP-Diacylglycerol Synthases (CDS): Gateway to Phosphatidylinositol and Cardiolipin Synthesis. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(February).
62. He Q, Greenberg ML. Post-translational regulation of phosphatidylglycerolphosphate synthase in response to inositol. *Mol Microbiol.* 2004;53(4):1243–9.
63. Gaynor PM, Hubbell S, Schmidt AJ, Lina RA, Minskoff SA, Greenberg ML. Regulation of phosphatidylglycerolphosphate synthase in *Saccharomyces cerevisiae* by factors affecting mitochondrial development. *J Bacteriol.* 1991;173(19):6124–31.
64. Chen D, Zhang XY, Shi Y. Identification and functional characterization of hCLS1, a human cardiolipin synthase localized in mitochondria. *Biochem J.* 2006;398(2):169–76.
65. Shi Y. Emerging roles of cardiolipin remodeling in mitochondrial dysfunction associated with diabetes, obesity, and cardiovascular diseases. *J Biomed Res.* 2010;24(1):6–15.
66. Schlame M. Cardiolipin remodeling and the function of tafazzin. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2013;1831(3):582–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.11.007>
67. Cao J, Liu Y, Lockwood J, Burn P, Shi Y. A novel cardiolipin-remodeling pathway revealed by a gene encoding an endoplasmic reticulum-associated acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) in mouse. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(30):31727–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M402930200>
68. Li J, Romestaing C, Han X, Li Y, Hao X, Wu Y, et al. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links oxidative stress and mitochondrial dysfunction to obesity. *Cell Metab.* 2010;12(2):154–65.
69. Taylor WA, Hatch GM. Purification and characterization of monolysocardiolipin acyltransferase from pig liver mitochondria. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(15):12716–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210329200>
70. Taylor WA, Hatch GM. Identification of the human mitochondrial linoleoyl-coenzyme a monolysocardiolipin acyltransferase (MLCL AT-1). *J Biol Chem* [Internet]. 2009;284(44):30360–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.048322>
71. Taylor WA, Mejia EM, Mitchell RW, Choy PC, Sparagna GC, Hatch GM. Human Trifunctional Protein Alpha Links Cardiolipin Remodeling to Beta-Oxidation. *PLoS One.* 2012;7(11).
72. Xia C, Fu Z, Battaile KP, Kim JJP. Crystal structure of human mitochondrial trifunctional protein, a fatty acid β -oxidation metabolon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(13):6069–74.

73. Vieira Neto E, Wang M, Szuminsky AJ, Ferraro L, Koppes E, Wang Y, et al. Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin remodeling abnormalities in mitochondrial trifunctional protein deficiency. *JCI insight*. 2024;9(17):1–22.
74. Miklas JW, Clark E, Levy S, Detraux D, Leonard A, Beussman K, et al. TFPA/HADHA is required for fatty acid beta-oxidation and cardiolipin re-modeling in human cardiomyocytes. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12482-1>
75. Bradley RM, Hashemi A, Aristizabal-Henao JJ, Stark KD, Duncan RE. PLAAT1 Exhibits Phosphatidylcholine:Monolysocardiolipin Transacylase Activity. *Int J Mol Sci*. 2022;23(12):1–12.
76. Abe M, Hasegawa Y, Oku M, Sawada Y, Tanaka E, Sakai Y, et al. Mechanism for remodeling of the acyl chain composition of cardiolipin catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* tafazzin. *J Biol Chem* [Internet]. 2016;291(30):15491–502. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.718510>
77. Schlame M, Acehan D, Berno B, Xu Y, Valvo S, Ren M, et al. The physical state of lipid substrates provides transacylation specificity for tafazzin. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2012;8(10):862–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1064>
78. Schlame M, Xu Y, Ren M. The basis for acyl specificity in the tafazzin reaction. *J Biol Chem*. 2017;292(13):5499–506.
79. Vreken P, Valianpour F, Nijtmans LG, Grivell LA, Plecko B, Wanders RJA, et al. Defective remodeling of cardiolipin and phosphatidylglycerol in Barth syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279(2):378–82.
80. Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van Der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IEM, Van'T Veer-Korthof ET, et al. An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci*. 1983;62(1–3):327–55.
81. Houtkooper RH, Rodenburg RJ, Thiels C, Lenthe H van, Stet F, Poll-The BT, et al. Cardiolipin and monolysocardiolipin analysis in fibroblasts, lymphocytes, and tissues using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry as a diagnostic test for Barth syndrome. *Anal Biochem* [Internet]. 2009;387(2):230–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.032>
82. Jia D, Zhang J, Nie J, Andersen JP, Rendon S, Zheng Y, et al. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links hypoxia to coronary artery disease by promoting mitochondrial dysfunction. *Mol Ther*. 2021;29(12):3498–511.
83. Liu X, Zhang J, Li J, Song C, Shi Y. Pharmacological inhibition of ALCAT1 mitigates amyotrophic lateral sclerosis by attenuating SOD1 protein aggregation. *Mol Metab* [Internet]. 2022;63(June):101536. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101536>
84. Hao Y, Fan Y, Feng J, Zhu Z, Luo Z, Hu H, et al. ALCAT1-mediated abnormal cardiolipin remodelling promotes mitochondrial injury in podocytes in diabetic kidney disease. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2024;22(1):1–20. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01399-4>
85. Zhang L, Feng L, Zhao Y, Geng Y, Liu R, Ma Y, et al. Lack of ALCAT1 enhances the protective effects of aerobic exercise on kidney in HFpEF mice. *Life Sci*. 2025;366–367(November 2024).
86. Xu Y, Anjaneyulu M, Donelian A, Yu W, Greenberg ML, Ren M, et al. Assembly of the complexes of oxidative phosphorylation triggers the remodeling of cardiolipin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(23):11235–40.
87. Mileykovskaya E, Dowhan W. Cardiolipin membrane domains in prokaryotes and eukaryotes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2009;1788(10):2084–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.04.003>

88. Polo CC, Fonseca-Alaniz MH, Chen JH, Ekman A, McDermott G, Meneau F, et al. Three-dimensional imaging of mitochondrial cristae complexity using cryo-soft X-ray tomography. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78150-3>
89. Ikon N, Ryan RO. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2017;1859(6):1156–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.013>
90. Allen ME, Pennington ER, Perry JB, Dadoo S, Makrecka-Kuka M, Dambrova M, et al. The cardiolipin-binding peptide elamipretide mitigates fragmentation of cristae networks following cardiac ischemia reperfusion in rats. *Commun Biol* [Internet]. 2020;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-1101-3>
91. Liu S, Soong Y, Seshan S V., Szeto HH. Novel cardiolipin therapeutic protects endothelial mitochondria during renal ischemia and mitigates microvascular rarefaction, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2014;306(9):970–80.
92. Acehan D, Malhotra A, Xu Y, Ren M, Stokes DL, Schlame M. Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophys J* [Internet]. 2011;100(9):2184–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2011.03.031>
93. Kojima R, Kakimoto Y, Furuta S, Itoh K, Sesaki H, Endo T, et al. Maintenance of Cardiolipin and Crista Structure Requires Cooperative Functions of Mitochondrial Dynamics and Phospholipid Transport. *Cell Rep* [Internet]. 2019;26(3):518–528.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.070>
94. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018;62(3):341–60.
95. Frohman MA. Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. *J Mol Med*. 2015;93(3):263–9.
96. Francy CA, Clinton RW, Fröhlich C, Murphy C, Mears JA. Cryo-EM Studies of Drp1 Reveal Cardiolipin Interactions that Activate the Helical Oligomer. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
97. Ban T, Kohno H, Ishihara T, Ishihara N. Relationship between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial inner-membrane fusion. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2018;1859(9):951–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.016>
98. Ban T, Ishihara T, Kohno H, Saita S, Ichimura A, Maenaka K, et al. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat Cell Biol*. 2017;19(7):856–63.
99. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*. 2013;15(10):1197–205.
100. Sabouny R, Shutt TE. Reciprocal Regulation of Mitochondrial Fission and Fusion. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2020;45(7):564–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.03.009>
101. Tang JX, Thompson K, Taylor RW, Oláhová M. Mitochondrial OXPHOS biogenesis: Co-regulation of protein synthesis, import, and assembly pathways. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):1–32.
102. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes [Internet]. Vol. 13, *BMC Biology*. BioMed Central Ltd.; 2015 [cited 2020 Dec 11]. p. 89. Available from: <http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-015-0201-x>
103. Zhao RZ, Jiang S, Zhang L, Yu Z Bin. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) [Internet]. Vol. 44, *International Journal of Molecular Medicine*. Spandidos Publications; 2019 [cited 2021 Feb 15]. p. 3–15.

- Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2019.4188/abstract>
104. Fry M, Green DE. Cardiolipin requirement by cytochrome oxidase and the catalytic role of phospholipid. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980;93(4):1238–46.
 105. Fry M, Green DE. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem* [Internet]. 1981;256(4):1874–80. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69888-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69888-1)
 106. Sharpley MS, Shannon RJ, Draghi F, Hirst J. Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondrial. *Biochemistry*. 2006;45(1):241–8.
 107. Agip ANA, Blaza JN, Bridges HR, Viscomi C, Rawson S, Muench SP, et al. Cryo-em structures of complex I from mouse heart mitochondria in two biochemically defined states. *Nat Struct Mol Biol*. 2018;25(7):548–56.
 108. Fiedorczuk K, Letts JA, Degliesposti G, Kaszuba K, Skehel M, Sazanov LA. Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature*. 2016;538(7625):406–10.
 109. Jussupow A, Di Luca A, Kaila VRI. How cardiolipin modulates the dynamics of respiratory complex I. *Sci Adv*. 2019;5(3):1–7.
 110. Vos M, Geens A, Böhm C, Deaulmerie L, Swerts J, Rossi M, et al. Cardiolipin promotes electron transport between ubiquinone and complex I to rescue PINK1 deficiency. *J Cell Biol*. 2017;216(3):1–14.
 111. Schwall CT, Greenwood VL, Alder NN. The stability and activity of respiratory Complex II is cardiolipin-dependent. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2012;1817(9):1588–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbambio.2012.04.015>
 112. Arnarez C, Mazat JP, Elezgaray J, Marrink SJ, Periole X. Evidence for cardiolipin binding sites on the membrane-exposed surface of the cytochrome bc1. *J Am Chem Soc*. 2013;135(8):3112–20.
 113. Petrosillo G, Ruggiero FM, Di Venosa N, Paradies G. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J*. 2003;17(6):714–6.
 114. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in Mitochondrial Complex I Activity in Ischemic/Reperfused Rat Heart: Involvement of Reactive Oxygen Species and Cardiolipin. *Circ Res*. 2004;94(1):53–9.
 115. Arnarez C, Marrink SJ, Periole X. Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels. *Sci Rep*. 2013;3:1–9.
 116. Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*. 2000;19(8):1777–83.
 117. Greggio C, Jha P, Kulkarni SS, Lagarrigue S, Broskey NT, Boutant M, et al. Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metab*. 2017;25(2):301–11.
 118. Hryc CF, Mallampalli VKPS, Bovshik EI, Azinas S, Fan G, Serysheva II, et al. Structural insights into cardiolipin replacement by phosphatidylglycerol in a cardiolipin-lacking yeast respiratory supercomplex. *Nat Commun*. 2023;14(1).
 119. Mileykovskaya E, Zhang M, Dowhan W. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochem*. 2005 Feb;70(2):154–8.
 120. Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W. Gluing the respiratory chain together: Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2002;277(46):43553–6.
 121. Corey RA, Harrison N, Stansfeld PJ, Sansom MSP, Duncan AL. Cardiolipin, and not monolysocardiolipin, preferentially binds to the interface of complexes III and IV. *Chem Sci*. 2022;13(45):13489–98.

122. Mehdipour AR, Hummer G. Cardiolipin puts the seal on ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(31):8568–70.
123. Duncan AL, Robinson AJ, Walker JE. Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(31):8687–92.
124. Haines TH, Dencher NA. Cardiolipin: A proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*. 2002;528(1–3):35–9.
125. Domitin S, Puff N, Pilot-Storck F, Tiret L, Joubert F. Role of cardiolipin in proton transmembrane flux and localization. *Biophys J* [Internet]. 2025;124(2):408–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349524040761>
126. Senoo N, Kandasamy S, Ogunbona OB, Baile MG, Lu Y, Claypool SM. Cardiolipin, conformation, and respiratory complex-dependent oligomerization of the major mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast. *Sci Adv*. 2020;6(35):1–14.
127. Claypool SM, Oktay Y, Boonthueung P, Loo JA, Koehler CM. Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*. 2008;182(5):937–50.
128. Díaz-Quintana A, Pérez-Mejías G, Guerra-Castellano A, De La Rosa MA, Díaz-Moreno I. Wheel and Deal in the Mitochondrial Inner Membranes: The Tale of Cytochrome c and Cardiolipin. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020.
129. Miyamoto S, Nantes IL, Faria PA, Cunha D, Ronsein GE, Medeiros MHG, et al. Cytochrome c-promoted cardiolipin oxidation generates singlet molecular oxygen. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11(10):1536–46.
130. Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, et al. Cytochrome C Acts As A Cardiolipin Oxygenase Required for Release of Proapoptotic Factors. *Nat Chem Biol*. 2005;1(4):223–32.
131. Fiorucci L, Erba F, Santucci R, Sinibaldi F. Cytochrome c Interaction with Cardiolipin Plays a Key Role in Cell Apoptosis: Implications for Human Diseases. *Symmetry (Basel)*. 2022;14(4):1–17.
132. Elmer-Dixon MM, Xie Z, Alverson JB, Priestley ND, Bowler BE. Curvature-Dependent Binding of Cytochrome c to Cardiolipin. *J Am Chem Soc*. 2020;142(46):19532–9.
133. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495–516.
134. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, Ahmad W, Siddiqui S, Alam M, et al. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications. *Cells*. 2024;13(22):1–29.
135. Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. *Cell Res*. 2007;17(9):759–71.
136. Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(5).
137. Lopez J, Tait SWG. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *Br J Cancer*. 2015;112(January):957–62.
138. Dewson G, Kluck RM. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci*. 2009;122(16):2801–8.
139. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2011;1813(4):558–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.026>
140. Huang K, Zhang J, O'Neill KL, Gurumurthy CB, Quadros RM, Tu Y, et al. Cleavage by caspase 8 and mitochondrial membrane association activate the BH3-only protein bid during TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2016;291(22):11843–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.711051>

141. Gonzalez F, Schug ZT, Houtkooper RH, MacKenzie ED, Brooks DG, Wanders RJA, et al. Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J Cell Biol*. 2008;183(4):681–96.
142. Schenkel LC, Bakovic M. Formation and regulation of mitochondrial membranes. *Int J Cell Biol* [Internet]. 2014;2014(Imm). Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/709828>
143. Lutter M, Fang M, Luo X, Nishijima M, Xie XS, Wang X. Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria. *Nat Cell Biol*. 2000;2(10):754–6.
144. Lai YC, Li CC, Sung TC, Chang CW, Lan YJ, Chiang YW. The role of cardiolipin in promoting the membrane pore-forming activity of BAX oligomers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2019;1861(1):268–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.06.014>
145. Dadsena S, Cuevas Arenas R, Vieira G, Brodesser S, Melo MN, García-Sáez AJ. Lipid unsaturation promotes BAX and BAK pore activity during apoptosis. *Nat Commun* [Internet]. 2024;15(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-49067-6>
146. Ding WX, Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*. 2012;393(7):547–64.
147. Chen G, Kroemer G, Kepp O. Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(March):1–15.
148. Huang W, Choi W, Hu W, Mi N, Guo Q, Ma M, et al. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein. *Cell Res*. 2012;22(3):473–89.
149. Manganelli V, Capozzi A, Recalchi S, Riitano G, Mattei V, Longo A, et al. The role of cardiolipin as a scaffold mitochondrial phospholipid in autophagosome formation: In vitro evidence. *Biomolecules*. 2021;11(2):1–14.
150. Chu CT, Bayir H, Kagan VE. LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: Implications for Parkinson disease. *Autophagy*. 2014;10(2):376–8.
151. Iriando MN, Etxaniz A, Varela YR, Ballesteros U, Hervás JH, Montes LR, et al. LC3 subfamily in cardiolipin-mediated mitophagy: a comparison of the LC3A, LC3B and LC3C homologs. *Autophagy* [Internet]. 2022;18(12):2985–3003. Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2062111>
152. Chao H, Lin C, Zuo Q, Liu Y, Xiao M, Xu X, et al. Cardiolipin-dependent mitophagy guides outcome after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2019;39(10):1930–43.
153. Beleznai Z, Janscik V. Role of cardiolipin in the functioning of mitochondrial L-glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;159(1):132–9.
154. Müller M, Cheneval D, Carafoli E. The Mitochondrial Creatine Phosphokinase is Associated with Inner Membrane Cardiolipin. In: Brautbar N, editor. *Myocardial and Skeletal Muscle Bioenergetics* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 1986. p. 151–6. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5107-8_12
155. Müller M, Moser R, Cheneval D, Carafoli E. Cardiolipid is the membrane receptor for mitochondrial creatine phosphokinase. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3839–43.
156. Brandt M ann, Powers-Lee SG. The interaction of cardiolipin with rat liver carbamoyl phosphate synthetase I. *Arch Biochem Biophys*. 1991;290(1):14–20.
157. Pember SO, Powell GL, Lambeth JD. Cytochrome P-450(scc)-phospholipid interactions: Evidence for a cardiolipin binding site and thermodynamics of enzyme interactions with cardiolipin, cholesterol, and adrenodoxin. *J Biol Chem*. 1983;258(5):3198–206.
158. Nałecz KA, Bolli R, Wojtczak L, Azzi A. The monocarboxylate carrier from bovine heart mitochondria: Partial purification and its substrate-transporting properties in a reconstituted system. *BBA - Bioenerg*. 1986;851(1):29–37.

159. Noël H, Pande S V. An essential requirement of cardiolipin for mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase activity. *Eur J Biochem* [Internet]. 1986;155(1):99–102. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09463.x>
160. Indiveri C, Tonazzi A, Prezioso G, Palmieri F. Kinetic characterization of the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *BBA - Bioenerg* [Internet]. 1991;1065(2):231–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90235-Z](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90235-Z).
161. Ryan T, Bamm V V., Stykel MG, Coackley CL, Humphries KM, Jamieson-Williams R, et al. Cardiolipin exposure on the outer mitochondrial membrane modulates α -synuclein. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03241-9>
162. Malhotra K, Modak A, Nangia S, Daman TH, Gunsell U, Robinson VL, et al. Cardiolipin mediates membrane and channel interactions of the mitochondrial TIM23 protein import complex receptor Tim50. *Sci Adv*. 2017;3(9):26–8.
163. Ghosh S, Ball WB, Madaris TR, Srikantan S, Madesh M, Mootha VK, et al. An essential role for cardiolipin in the stability and function of the mitochondrial calcium uniporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(28):16383–90.
164. Lee RG, Gao J, Siira SJ, Shearwood AM, Ermer JA, Hofferek V, et al. Cardiolipin is required for membrane docking of mitochondrial ribosomes and protein synthesis. *J Cell Sci*. 2020;133(14):1–18.
165. Fox CA, Ryan RO. Studies of the cardiolipin interactome. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2022;88(August):101195. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101195>
166. Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. Mitochondrial bioenergetics and cardiolipin alterations in myocardial ischemia-reperfusion injury: Implications for pharmacological cardioprotection. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2018;315(5):H1341–52.
167. Zhang G, Zhang J, DeHoog RJ, Pennathur S, Anderton CR, Venkatachalam MA, et al. DESI-MSI and METASPACE indicates lipid abnormalities and altered mitochondrial membrane components in diabetic renal proximal tubules. *Metabolomics*. 2020;16(1):1–20.
168. Tan SM, Ziemann M, Thallas-Bonke V, Snelson M, Kumar V, Laskowski A, et al. Complement C5a induces renal injury in diabetic kidney disease by disrupting mitochondrial metabolic agility. *Diabetes*. 2020;69(1):83–98.
169. Han X, Yang J, Cheng H, Yang K, Abendschein DR, Gross RW. Shotgun lipidomics identifies cardiolipin depletion in diabetic myocardium linking altered substrate utilization with mitochondrial dysfunction. *Biochemistry*. 2005;44(50):16684–94.
170. Nishi H, Nangaku M. Podocyte lipotoxicity in diabetic kidney disease. *Kidney Int* [Internet]. 2019;96(4):809–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.07.013>
171. Sagar S, Faizan MI, Chaudhary N, Singh V, Singh P, Gheware A, et al. Obesity impairs cardiolipin-dependent mitophagy and therapeutic intercellular mitochondrial transfer ability of mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*. 2023;14(5).
172. Prola A, Pilot-Storck F. Cardiolipin Alterations during Obesity: Exploring Therapeutic Opportunities. *Biology (Basel)*. 2022;11(11):1–18.
173. Wang L, Hu T, Zhang R, Shi Y, Wang Y, Xuan Q, et al. Liraglutide modulates ALCAT1-Mediated cardiolipin remodeling to improve cardiac function in obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2025;756(February):151583. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.151583>

174. Li Q, Lin Y, Xu J, Liu Y, Jing Y, Huang R, et al. Diet Restriction Impact on High-Fat-Diet-Induced Obesity by Regulating Mitochondrial Cardiolipin Biosynthesis and Remodeling. *Molecules*. 2023;28(4522):1–14.
175. Sparagna GC, Chicco AJ, Murphy RC, Bristow MR, Johnson CA, Rees ML, et al. Loss of cardiac tetralinoleoyl cardiolipin in human and experimental heart failure. *J Lipid Res* [Internet]. 2007;48(7):1559–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M600551-JLR200>
176. Saini-Chohan HK, Holmes MG, Chicco AJ, Taylor WA, Moore RL, McCune SA, et al. Cardiolipin biosynthesis and remodeling enzymes are altered during development of heart failure. *J Lipid Res* [Internet]. 2009;50(8):1600–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M800561-JLR200>
177. Eirin A, Ebrahimi B, Kwon SH, Fiala JA, Williams BJ, Woollard JR, et al. Restoration of mitochondrial cardiolipin attenuates cardiac damage in swine renovascular hypertension. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(6):1–19.
178. Garcia AM, McPhaul JC, Sparagna GC, Jeffrey DA, Jonscher R, Patel SS, et al. Alteration of cardiolipin biosynthesis and remodeling in single right ventricle congenital heart disease. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2020;318(4):H787–800.
179. Song C, Zhang J, Qi S, Liu Z, Zhang X, Zheng Y, et al. Cardiolipin remodeling by ALCAT1 links mitochondrial dysfunction to Parkinson's diseases. *Aging Cell*. 2019;18(3):1–13.
180. Monteiro-Cardoso VF, Oliveira MM, Melo T, Domingues MRM, Moreira PI, Ferreira E, et al. Cardiolipin profile changes are associated to the early synaptic mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*. 2014;43(4):1375–92.
181. Rao AM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Lipid alterations in transient forebrain ischemia: Possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection. *J Neurochem*. 2000;75(6):2528–35.
182. Wu D, An Q, Ji H, Dai J, Suo L, Zhang C. Retinal ischemia-reperfusion injury induces intense lipid synthesis and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;689(October).
183. Ji J, Kline AE, Amoscato A, Samhan-Arias AK, Sparvero LJ, Tyurin VA, et al. Lipidomics identifies cardiolipin oxidation as a mitochondrial target for redox therapy of brain injury. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012;15(10):1407–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3195>
184. Chan RB, Di Paolo G. Knockout punch: Cardiolipin oxidation in trauma. *Nat Neurosci*. 2012;15(10):1325–7.
185. Dimitrijevs P, Freiliba I, Pčolkins A, Leja M, Arsenyan P. Total cardiolipin levels in gastric and colon cancer: evaluating the prognostic potential. *Lipids Heal Dis* . 2025;24(1).
186. Di Carlo C, Sousa BC, Manfredi M, Brandi J, Dalla Pozza E, Marengo E, et al. Integrated lipidomics and proteomics reveal cardiolipin alterations, upregulation of HADHA and long chain fatty acids in pancreatic cancer stem cells. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92752-5>
187. Kim J, Minkler PE, Salomon RG, Anderson VE, Hoppel CL. Cardiolipin: Characterization of distinct oxidized molecular species. *J Lipid Res*. 2011;52(1):125–35.
188. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
189. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909–50.

190. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol* [Internet]. 2014;2(1):702–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
191. Chen YR, Zweier JL. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res*. 2014;114(3):524–37.
192. Zhong H, Lu J, Xia L, Zhu M, Yin H. Formation of electrophilic oxidation products from mitochondrial cardiolipin in vitro and in vivo in the context of apoptosis and atherosclerosis. *Redox Biol* [Internet]. 2014;2(1):878–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.04.003>
193. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014(Article ID 360438).
194. Milkovic L, Zarkovic N, Marusic Z, Zarkovic K, Jaganjac M. The 4-Hydroxynonenal–Protein Adducts and Their Biological Relevance: Are Some Proteins Preferred Targets? *Antioxidants*. 2023;12(4).
195. Helmer PO, Behrens A, Rudt E, Karst U, Hayen H. Hydroperoxylated vs Dihydroxylated Lipids: Differentiation of Isomeric Cardiolipin Oxidation Products by Multidimensional Separation Techniques. *Anal Chem*. 2020;92(17):12010–6.
196. Maciel E, Domingues P, Marques D, Simões C, Reis A, Oliveira MM, et al. Cardiolipin and oxidative stress: Identification of new short chain oxidation products of cardiolipin in in vitro analysis and in nephrotoxic drug-induced disturbances in rat kidney tissue. *Int J Mass Spectrom* [Internet]. 2011;301(1–3):62–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2010.06.036>
197. Jang S, Javadov S. Unraveling the mechanisms of cardiolipin function: The role of oxidative polymerization of unsaturated acyl chains. *Redox Biol* [Internet]. 2023;64(April):102774. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102774>
198. Liu GY, Ho Moon S, Jenkins CM, Li M, Sims HF, Guan S, et al. The phospholipase iPLA2 is a major mediator releasing oxidized aliphatic chains from cardiolipin, integrating mitochondrial bioenergetics and signaling. *J Biol Chem*. 2017;292(25):10672–84.
199. Buland JR, Wasserloos KJ, Tyurin VA, Tyurina YY, Amoscato AA, Mallampalli RK, et al. Biosynthesis of oxidized lipid mediators via lipoprotein-associated phospholipase A2 hydrolysis of extracellular cardiolipin induces endothelial toxicity. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2016;311(2):303–16.
200. Chen T, Vunjak-Novakovic G. In Vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury. *Regen Eng Transl Med* [Internet]. 2018;4(3):142–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0056-0>
201. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650–67.
202. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DDY. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2012;133(2):230–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.11.004>
203. Naito H, Nojima T, Fujisaki N, Tsukahara K, Yamamoto H, Yamada T, et al. Therapeutic strategies for ischemia reperfusion injury in emergency medicine. *Acute Med Surg*. 2020;7(1).
204. Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, Gsell W, Pusovnik M, Van den Eynde J, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation. *Trends Cardiovasc Med*. 2023;33(6):357–66.
205. Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Serena D, Ruggiero FM. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat

- heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(1–2):42–50.
206. Lesnefsky EJ, Minkler P, Hoppel CL. Enhanced modification of cardiolipin during ischemia in the aged heart. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2009;46(6):1008–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.007>
 207. Martens JC, Keilhoff G, Halangk W, Wartmann T, Gardemann A, Päge I, et al. Lipidomic analysis of molecular cardiolipin species in livers exposed to ischemia/reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 2015;400(1–2):253–63.
 208. Heerdt PM, Schlame M, Jehle R, Barbone A, Burkhoff D, Blanck TJJ. Disease-specific remodeling of cardiac mitochondria after a left ventricular assist device. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(4):1216–21.
 209. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(10):629–46.
 210. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Ren Inj Prev* [Internet]. 2015;4(2):20–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26060833> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4459724>
 211. Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sci* [Internet]. 2020;256:117860. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117860>
 212. Kloner RA. Mitochondrial protective agents for ischemia/reperfusion injury. *Circ Cardiovasc Interv*. 2017;10(8):1–3.
 213. Zhang W, Sha Y, Wei K, Wu C, Ding D, Yang Y, et al. Rotenone ameliorates chronic renal injury caused by acute ischemia/reperfusion. *Oncotarget*. 2018;9(36):24199–208.
 214. Baniene R, Trumbeckas D, Kincius M, Pauziene N, Raudone L, Jievaltas M, et al. Short ischemia induces rat kidney mitochondria dysfunction. *J Bioenerg Biomembr*. 2016;48(1):77–85.
 215. Kamarauskaite J, Baniene R, Trumbeckas D, Strazdauskas A, Trumbeckaite S. Increased Succinate Accumulation Induces ROS Generation in in Vivo Ischemia/Reperfusion-Affected Rat Kidney Mitochondria. *Biomed Res Int*. 2020;Article ID.
 216. Birk A V, Liu S, Soong Y, Mills W, Singh P, Warren JD, et al. The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(8):1250–61.
 217. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* [Internet]. 1949;177(2):751–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57021-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57021-6)
 218. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;(226):497–509.
 219. Tyurina YY, Kini V, Tyurin VA, Vlasova II, Jiang J, Kapralov AA, et al. Mechanisms of cardiolipin oxidation by cytochrome c: Relevance to pro- and antiapoptotic functions of etoposide. *Mol Pharmacol*. 2006;70(2):706–17.
 220. Choi J, Yin T, Shinozaki K, Lampe JW, Stevens JF, Becker LB, et al. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem*. 2018;442(1–2):187–201.
 221. Basova L V, Kurnikov I V, Wang L, Ritov VB, Belikova NA, Vlasova II, et al. Cardiolipin Switch in Mitochondria: Shutting off the Reduction of Cytochrome c and Turning on the Peroxidase Activity. *Biochemistry*. 2007;46(11):3423–34.
 222. Minkler PE, Hoppel CL. Separation and characterization of cardiolipin molecular species by reverse-phase ion pair high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res*. 2010;51(4):856–65.

223. Mayr JA. Lipid metabolism in mitochondrial membranes. *J Inherit Metab Dis.* 2014;38(1):137–44.
224. Chowdhury A, Aich A, Jain G, Wozny K, Luchtenborg C, Hartmann M, et al. Defective Mitochondrial Cardiolipin Remodeling Dampens HIF-1 α Expression in Hypoxia. *Cell Rep.* 2018;25:561–70.
225. Hara S, Yoda E, Sasaki Y, Nakatani Y, Kuwata H. Calcium-independent phospholipase A2 γ (iPLA2 γ) and its roles in cellular functions and diseases [Internet]. Vol. 1864, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* Elsevier; 2019. p. 861–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.10.009>
226. Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, Priebe A, Zieliński R, Fokt I, et al. 2-Deoxy-D-Glucose and its analogs: From diagnostic to therapeutic agents. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1).
227. Bowron A, Frost R, Powers VEC, Thomas PH, Heales SJR, Steward CG. Diagnosis of Barth syndrome using a novel LC-MS/MS method for leukocyte cardiolipin analysis. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(5):741–6.
228. Chatfield KC, Sparagna GC, Chau S, Phillips EK, Ambardekar A V., Aftab M, et al. Elamipretide Improves Mitochondrial Function in the Failing Human Heart. *JACC Basic to Transl Sci.* 2019;4(2):147–57.
229. Jia X, Zhu L, Zhu Q, Zhang J. The role of mitochondrial dysfunction in kidney injury and disease. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2024;23:103576. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2024.103576>
230. Wolff RL, Combe NA, Entressangles B. Positional distribution of fatty acids in cardiolipin of mitochondria from 21-day-old rats. *Lipids.* 1985;20(12):908–14.
231. Wolff RL, Entressangles B. Compositional changes of fatty acids in the 1(1'')- and 2(2'')-positions of cardiolipin from liver, heart, and kidney mitochondria of rats fed a low-fat diet. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1991;1082(2):136–42.
232. Yamaoka S, Urade R, Kito M. Cardiolipin molecular species in rat heart mitochondria are sensitive to essential fatty acid-deficient dietary lipids. *J Nutr.* 1990;120(5):415–21.
233. Oemer G, Koch J, Wohlfarter Y, Alam MT, Lackner K, Sailer S, et al. Phospholipid Acyl Chain Diversity Controls the Tissue-Specific Assembly of Mitochondrial Cardiolipins. *Cell Rep* [Internet]. 2020;30(12):4281–4291.e4. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.115>
234. Courtade S, Marinetti G V., Stotz E. The structure and abundance of rat tissue cardiolipins. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1967;137(1):121–34.
235. Moulin M, Solgadi A, Veksler V, Garnier A, Ventura-Clapier R, Chaminade P. Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. *Biol Sex Differ* [Internet]. 2015;6(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13293-015-0039-5>
236. Gowda D, Masum A, Gowda SGB, Shekhar C, Rubel ZU, Kira S, et al. Lipidomic study of kidney in a mouse model with urine flow obstruction. *Sci Rep* [Internet]. 2024;1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68270-5>
237. Gao F, McDaniel J, Chen EY, Rockwell HE, Nguyen C, Lynes MD, et al. Adapted MS/MS ALL Shotgun Lipidomics Approach for Analysis of Cardiolipin Molecular Species. *Lipids.* 2018;53(1):133–42.
238. Eirin A, Ebrahimi B, Zhang X, Zhu XY, Woollard JR, He Q, et al. Mitochondrial protection restores renal function in swine atherosclerotic renovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2014;103(4):461–72.
239. Szczepanek K, Allegood J, Aluri H, Hu Y, Chen Q, Lesnefsky EJ. Acquired deficiency of tafazzin in the adult heart: Impact on mitochondrial function and response to cardiac injury. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2016;1861(4):294–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.12.004>

240. Schlame M, Shanske S, Doty S, König T, Sculco T, DiMauro S, et al. Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease. *J Lipid Res.* 1999;40(9):1585–92.
241. Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MSK, Minkler PE, Hoppel CL. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2001;280:2770–8.
242. Schlame M, Beyer K, Hayer-Hartl M, Klingenberg M. Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids: Is there an acyl specificity of the interaction between cardiolipin and the ADP/ATP carrier? *Eur J Biochem.* 1991;199(2):459–66.
243. Schlame M, Towbin JA, Heerdt PM, Jehle R, DiMauro S, Blanck TJJ. Deficiency of Tetralinoleoyl-Cardiolipin in Barth Syndrome. *Ann Neurol.* 2002;51(5):634–7.
244. Ackermann T, Tardito S. Cell Culture Medium Formulation and Its Implications in Cancer Metabolism. *Trends in Cancer.* 2019;5(6):329–32.
245. Else PL. The highly unnatural fatty acid profile of cells in culture. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2020;77(April 2019):101017. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101017>
246. Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Med* [Internet]. 2011;9(11). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/11>
247. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev.* 2016;37(2):85–98.
248. Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Pischke SE, Berger SP, Sanders JSF, Pol RA, Struys MMRF, et al. Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: Relevant mechanisms in injury and repair. *J Clin Med.* 2020;9(253).
249. Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int.* 2004;66(2):514–7.
250. Smith MW, Yrjo C, Myong Won Kahng, Trump BF. Changes in mitochondrial lipids of rat kidney during ischemia. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1980;618(2):192–201.
251. Nakahara I, Kikuchi H, Taki W, Nishi S, Kito M, Yonekawa Y, et al. Degradation of Mitochondrial Phospholipids During Experimental Cerebral Ischemia in Rats. *J Neurochem.* 1991;57(3):839–44.
252. Lesnefsky EJ, Hoppel CL. Cardiolipin as an oxidative target in cardiac mitochondria in the aged rat. *Bone.* 2008;1777(7–8):1020–7.
253. Van Smaalen TC, Ellis SR, Mascini NE, Siegel TP, Cillero-Pastor B, Hillen LM, et al. Rapid Identification of Ischemic Injury in Renal Tissue by Mass-Spectrometry Imaging. *Anal Chem.* 2019;91(5):3575–81.
254. Jassem W, Fuggle S V., Rela M, Koo DDH, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. 2002;73(4):493–9.
255. Jang S, Lewis TS, Powers C, Khuchua Z, Baines CP, Wipf P, et al. Elucidating Mitochondrial Electron Transport Chain Supercomplexes in the Heart during Ischemia-Reperfusion. *Antioxidants Redox Signal.* 2017;27(1):57–69.
256. Liss KHH, Mousa M, Bucha S, Lutkewitte A, Allegood J, Cowart LA, et al. Dynamic changes in the mouse hepatic lipidome following warm ischemia reperfusion injury. *Sci Rep* [Internet]. 2024;14(1):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-54122-9>
257. de la Monte SM, Gallucci GM, Lin A, Tong M, Chen X, Stonestreet BS. Critical Shifts in Cerebral White Matter Lipid Profiles After Ischemic-Reperfusion Brain Injury in Fetal Sheep as Demonstrated by the Positive Ion Mode MALDI-Mass Spectrometry. *Cell Med.* 2020;12:215517901989700.

258. Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D. A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet.* 1996;12(4):385–9.
259. Agarwal AK, Barnes RI, Garg A. Functional characterization of human 1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase isoform 8: Cloning, tissue distribution, gene structure, and enzymatic activity. *Arch Biochem Biophys.* 2006;449(1–2):64–76.
260. Lu B, Xu FY, Jiang YJ, Choy PC, Hatch GM, Grunfeld C, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding human cardiolipin synthase (hCLS1). *J Lipid Res* [Internet]. 2006;47(6):1140–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.C600004-JLR200>
261. Williams EH, Kao RL, Morgan HE. Protein degradation and synthesis during recovery from myocardial ischemia. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1981;3(3).
262. Perez-Alvarez MJ, Gonzalez MV, Benito-Cuesta I, Wandosell FG. Role of mTORC1 controlling proteostasis after brain ischemia. *Front Neurosci.* 2018;12(FEB):1–15.
263. Thiebaut AM, Hedou E, Marciniak SJ, Vivien D, Roussel BD. Proteostasis during cerebral ischemia. *Front Neurosci.* 2019;13(JUN):1–14.
264. Chen JH, Wu CH, Chiang CK. Therapeutic approaches targeting proteostasis in kidney disease and fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16).
265. Shilovsky GA, Zverkov OA, Seliverstov A V., Ashapkin V V., Putyatina TS, Rubanov LI, et al. New C-Terminal Conserved Regions of Tafazzin, a Catalyst of Cardiolipin Remodeling. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019.
266. Wieser M, Stadler G, Jennings P, Streubel B, Pfaller W, Ambros P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2008;295(5):1365–75.
267. Wang B, Li ZL, Zhang YL, Wen Y, Gao YM, Liu BC. Hypoxia and chronic kidney disease. *eBioMedicine* [Internet]. 2022;77:103942. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103942>
268. Tábara LC, Poveda J, Martin-Cleary C, Selgas R, Ortiz A, Sanchez-Niño MD. Mitochondria-targeted therapies for Acute kidney injury. *Expert Rev Mol Med.* 2014;16(August):1–25.
269. Gan ES, Ooi EE. Oxygen: Viral friend or foe? *Virol J.* 2020;17(1):1–12.
270. Zheng W, Gu X, Sun X, Hu D. Effects of hypoxia-inducible factor-1 α on the proliferation and apoptosis of human synovial mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2019;20(5):4315–22.
271. Schäfer M, Schäfer C, Ewald N, Piper HM, Noll T. Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. *Circ Res.* 2003;92(9):1010–5.
272. Allen KN, Torres-Velarde JM, Vazquez JM, Moreno-Santillán DD, Sudmant PH, Vázquez-Medina JP. Hypoxia exposure blunts angiogenic signaling and upregulates the antioxidant system in endothelial cells derived from elephant seals. *BMC Biol* [Internet]. 2024;22(1):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12915-024-01892-3>
273. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Cell death patterns due to warm ischemia or reperfusion in renal tubular epithelial cells originating from human, mouse, or the native hibernator hamster. *Biology (Basel).* 2018;7(4).
274. Salzman MM, Bartos JA, Yannopoulos D, Riess ML. Poloxamer 188 Protects Isolated Adult Mouse Cardiomyocytes from Reoxygenation Injury. *Pharmacol Res Perspect.* 2020;8(6):1–13.
275. Sharma S, Sharma P, Subedi U, Bhattarai S, Miller C, Manikandan S, et al. Mn(III) Porphyrin, MnTnBuOE-2-PyP5+, Commonly Known as a Mimic of Superoxide Dismutase Enzyme, Protects Cardiomyocytes from Hypoxia/Reoxygenation Induced Injury via Reducing Oxidative Stress. *Int J Mol Sci.* 2023;24(7).

276. Chu Q, Zhang Y, Zhong S, Gao F, Chen Y, Wang B, et al. N-n-butyl haloperidol iodide ameliorates oxidative stress in mitochondria induced by hypoxia/reoxygenation through the mitochondrial c-Jun N-Terminal Kinase/Sab/Src/reactive oxygen species pathway in H9c2 cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
277. Wu D, Ji H, Du W, Ren L, Qian G. Mitophagy alleviates ischemia/reperfusion-induced microvascular damage through improving mitochondrial quality control. *Bioengineered* [Internet]. 2022;13(2):3596–607. Available from: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2027065>
278. Tang Q, Cao Y, Xiong W, Ke X, Zhang J, Xia Y, et al. Glycyrrhizic acid exerts protective effects against hypoxia/reoxygenation-induced human coronary artery endothelial cell damage by regulating mitochondria. *Exp Ther Med*. 2020;335–42.
279. Wang H, Song TY, Reyes-García J, Wang YX. Hypoxia-Induced Mitochondrial ROS and Function in Pulmonary Arterial Endothelial Cells. *Cells*. 2024;13(21).
280. Yang X, Kang A, Lu Y, Li Y, Guo L, Li R, et al. Exploratory metabolomic analysis based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS to study hypoxia-reoxygenation energy metabolic alterations in HK-2 cells. *Ren Fail* [Internet]. 2023;45(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/0886022X.2023.2186715>
281. Adzigbli L, Sokolov EP, Wimmers K, Sokolova IM, Ponsuksili S. Effects of hypoxia and reoxygenation on mitochondrial functions and transcriptional profiles of isolated brain and muscle porcine cells. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24386-0>
282. Rathore R, Zheng YM, Li XQ, Wang QS, Liu QH, Ginnan R, et al. Mitochondrial ROS-PKCε signaling axis is uniquely involved in hypoxic increase in [Ca²⁺]_i in pulmonary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(3):784–90.
283. Korde AS, Yadav VR, Zheng YM, Wang YX. Primary role of mitochondrial Rieske iron-sulfur protein in hypoxic ROS production in pulmonary artery myocytes. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(8):945–52.
284. Zhou H, Hu S, Jin Q, Shi C, Zhang Y, Zhu P, et al. Mff-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(3).
285. Eleftheriadis T, Pissas G, Golfopoulos S, Efthymiadi M, Liakopoulos V, Stefanidis I. Inhibition of Malate Dehydrogenase-2 Protects Renal Tubular Epithelial Cells from Anoxia-Reoxygenation-Induced Death or Senescence. *Biomolecules*. 2022;12(10).
286. Wiswedel I, Gardemann A, Storch A, Peter D, Schild L. Degradation of phospholipids by oxidative stress: Exceptional significance of cardiolipin. *Free Radic Res*. 2010;44(2):135–45.
287. Miranda ÉGA, Araujo-Chaves JC, Kawai C, Brito AMM, Dias IWR, Arantes JT, et al. Cardiolipin Structure and Oxidation Are Affected by Ca²⁺ at the Interface of Lipid Bilayers. *Front Chem*. 2020;7(January):1–12.
288. Liu X, Ye B, Miller S, Yuan H, Zhang H, Tian L, et al. Ablation of ALCAT1 Mitigates Hypertrophic Cardiomyopathy through Effects on Oxidative Stress and Mitophagy. *Mol Cell Biol*. 2012;32(21):4493–504.
289. Rieger B, Krajčová A, Duwe P, Busch KB. ALCAT1 Overexpression Affects Supercomplex Formation and Increases ROS in Respiring Mitochondria. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019(Ci).
290. Miguel V, Rojo A. Hypoxia-Driven Responses in Chronic Kidney Disease. *Oxygen*. 2023;3(3):300–21.
291. Potteti HR, Noone PM, Tamatam CR, Ankireddy A, Noel S, Rabb H, et al. Nrf2 mediates hypoxia-inducible HIF1α activation in kidney tubular epithelial cells. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2021;320(3):F464–74.

292. Chun SY, Johnson C, Washburn JG, Cruz-Correa MR, Dang DT, Dang LH. Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1 α and HIF-2 α target genes. *Mol Cancer*. 2010;9:1–11.
293. Grevengoed TJ, Martin SA, Katunga L, Cooper DE, Anderson EJ, Murphy RC, et al. Acyl-CoA synthetase 1 deficiency alters cardiolipin species and impairs mitochondrial function. *J Lipid Res* [Internet]. 2015;56(8):1572–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M059717>
294. Zhao L, Pascual F, Bacudío L, Suchanek AL, Young PA, Li LO, et al. Defective fatty acid oxidation in mice with muscle-specific acyl-CoA synthetase 1 deficiency increases amino acid use and impairs muscle function. *J Biol Chem* [Internet]. 2019;294(22):8819–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA118.006790>
295. Dang D, Chun S, Burkitt K, Cruz-Correa M, Han X, Dang L. HIF- α s promote mitochondrial cardiolipin synthesis and respiration efficiency. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9_Supplement):4109.
296. Singh P. Reprogramming of Energy Metabolism in Kidney Disease. *Nephron*. 2023;147(1):61–4.
297. Nie J, Hao X, Chen D, Han X, Chang Z, Shi Y. A Novel Function of the Human CLS1 in Phosphatidylglycerol Synthesis and Remodeling. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(4):438–45.
298. O'Brien KA, McNally BD, Sowton AP, Murgia A, Armitage J, Thomas LW, et al. Enhanced hepatic respiratory capacity and altered lipid metabolism support metabolic homeostasis during short-term hypoxic stress. *BMC Biol*. 2021;19(1):1–20.
299. Aiestaran-Zelaia I, Sánchez-Guisado MJ, Villar-Fernandez M, Azkargorta M, Fadon-Padilla L, Fernandez-Pelayo U, et al. 2 deoxy-D-glucose augments the mitochondrial respiratory chain in heart. *Sci Rep* [Internet]. 2022;12(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10168-1>
300. Danos M, Taylor WA, Hatch GM. Mitochondrial monolysocardiolipin acyltransferase is elevated in the surviving population of H9c2 cardiac myoblast cells exposed to 2-deoxyglucose-induced apoptosis. *Biochem Cell Biol*. 2008;86(1):11–20.
301. Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J*. 2000;351(1):183–93.
302. Nakagawa Y. Initiation of Apoptotic Signal by the Peroxidation of Cardiolipin of Mitochondria BT - Mitochondrial Pathogenesis: From Genes and Apoptosis to Aging and Disease. In: Lee HK, DiMauro S, Tanaka M, Wei YH, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 177–84. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-662-41088-2_18
303. Obaid QA, Khudair KK, Al-Shammari AM. Glucose deprivation using 2-deoxyglucose and acarbose induce metabolic oxidative stress and apoptosis in female mice bearing breast cancer. *Biochimie* [Internet]. 2022;195:59–66. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.01.007>

MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Straipsniai, kuriuose paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai

Leidiniuose, referuojamuose duomenų bazėje Clarivate Analytics Web of Science ir turinčiuose citavimo rodiklį:

1. **Strazdauskas, Arvydas**; Trumbeckaitė, Sonata; Jakštas, Valdas; Dambrauskienė, Justina; Mioldažytė, Aušra; Klimkaitis, Kristupas ir Banienė, Rasa. (2024). In Vitro Hypoxia/Reoxygenation Induces Mitochondrial Cardiolipin Remodeling in Human Kidney Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 11 (25), 1 - 17, ISSN 1422-0067. doi:10.3390/ijms25116223.
2. **Strazdauskas, Arvydas**; Trumbeckaitė, Sonata; Jakštas, Valdas; Dambrauskienė, Justina; Ivanauskas, Liudas ir Banienė, Rasa. (2022). Ischemia In Vivo Induces Cardiolipin Oxidation in Rat Kidney Mitochondria. *Biology. Basel* : MDPI, 2022, 11 (4.), p. 1-15., ISSN 2079-7737. doi:10.3390/biology11040541.

Mokslinės konferencijos, kuriose paskelbti disertacijos tyrimų rezultatai

1. **Strazdauskas, Arvydas**; Stončaitytė, Vaiva; Klimkaitis, Kristupas; Banienė, Rasa. Renal cardiolipins and their alterations during ischemia and reperfusion // International Health Sciences Conference for All (IHSC for All) “Precision Medicine” : Abstract book 2024 : [March 25-26, 2024, Kaunas] / Edited by Ignas Lapeikis, Livija Petrokaitė, p. 507 - 508, ISSN 3030-0711.
2. **Strazdauskas, Arvydas**; Trumbeckaitė, Sonata; Dambrauskienė, Justina; Klimkaitis, Kristupas; Stončaitytė, Vaiva; Banienė, Rasa. Renal ischemia and reperfusion alter cardiolipin metabolism // FEBS Open Bio : Mining biochemistry for human health and well-being, 48th FEBS Congress, 29 June–3 July 2024, Milano, Italy, t. 14, Suppl. 2, p. 470 - 471, ISSN 2211-5463, 2211-5463. doi:10.1002/2211-5463.13837.
3. **Strazdauskas, Arvydas**; Klimkaitis, Kristupas; Banienė, Rasa. Inkstų mitochondrijų kardioliipinai: pokyčiai hipoksijos/reoksigenacijos metu // 16-oji Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“ : Pranešimų tezės / [Leidinį sudarė dr. Jadvyga Olechnovičienė] ; Lietuvos mokslų akademija. Biologijos, Medicinos ir Geomokslų skyrius, 2023, p. 32 - 32, ISSN 2783-826.
4. **Strazdauskas, Arvydas**; Mioldažytė, Aušra; Banienė, Rasa. Renal ischemia: implications in mitochondrial function and cardiolipin struc-

ture // Health for All: 2023 – International Conference Health for All “Rare diseases”: abstract book: Kaunas, Lithuania, 19-20th April, 2023 / [organised: Council of LSMU Doctoral Students]. Kaunas: Lithuanian University of Health Sciences, 2023, p. 63-64.

5. **Strazdauskas, Arvydas**; Trumbeckaitė, Sonata; Dambrauskienė, Justina; Stončaitytė, Vaiva; Klimkaitis, Kristupas; Banienė, Rasa. Renal ischemia and reperfusion: changes in cardiolipin composition // XVIth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society “Biochemistry Targeting Diseases”: Taujėnai, Lithuania, June 28-30, 2023 : programme and abstract book / Lietuvos Biochemikų Draugija, p. 54 - 54, ISBN 9786099603032.
6. **Strazdauskas, Arvydas**; Trumbeckaitė, Sonata; Dambrauskienė, Justina; Šilobrit, Sandra; Paškevičiūtė, Emilija; Banienė, Rasa. Dicaffeoylquinic acids from *Artemisia ludoviciana* Nutt. herb and mitochondria: implications in cancer and hypoxia // Antioxidants: special issues: The First International Conference on Antioxidants: Sources, Methods, Health Benefits, and Industrial Applications (ICA 2023) : Barcelona, Spain 10-12 May 2023 : Program and Abstract Book /. Basel, Switzerland : MDPI AG, 2023, vol. 12, spec. iss, p. 74-74, ISSN 2076-3921, 2076-3921.
7. Banienė, Rasa; **Strazdauskas, Arvydas**; Dambrauskienė, Justina; Trumbeckaitė, Sonata. The Effect of hypoxia // FEBS3+ Conference of Estonian, Latvian and Lithuanian Biochemical Societies : abstract book : Tallinn, Estonia, 15-17 June 2022 / Editor Tiit Lukk. Tallinn: Tallinn University of Technology Press, 2022. ISBN 9789949838639, p. 79-79, ISBN 9789949838639.
8. **Strazdauskas, Arvydas**; Jakštas, Valdas; Ivanauskas, Liudas; Trumbeckaitė, Sonata; Dambrauskienė, Justina; Banienė, Rasa. Cardiolipin peroxidation induces damage of kidney mitochondria after ischemia in vivo // Cell Symposia: Metabolites in Signaling and Disease (CMET2022) : April 3-5, 2022, Lisbon, Portugal. Lisbon, 2022, p. 1-1.
9. **Strazdauskas, Arvydas**; Jakštas, Valdas; Ivanauskas, Liudas; Trumbeckaitė, Sonata; Dambrauskienė, Justina; Banienė, Rasa. Ischemia in vivo causes cardiolipin peroxidation and mitochondrial damage in rat kidneys // FEBS3+ Conference of Estonian, Latvian and Lithuanian Biochemical Societies : abstract book : Tallinn, Estonia, 15-17 June 2022 / Editor Tiit Lukk. Tallinn : Tallinn University of Technology Press, 2022.
10. **Strazdauskas, Arvydas**; Banienė, Rasa; Ivanauskas, Liudas; Jakštas, Valdas. Išemijos in vivo poveikis kardioliolino struktūriniais pokyčiams žiurkės inkstų mitochondrijose // 14-oji Lietuvos jaunųjų moks-

lininkų konferencija BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos : pranešimų santraukos : 2021 m. lapkričio 25 d., Kaunas / Lietuvos mokslų akademijos Biologijos, medicinos ir geomokslų skyrius. Lietuvos sveikatos mokslų universitetas ; [Leidinį sudarė Jadvyga Olechnovičienė ir Vaidutis Kučinskas]. Vilnius : Lietuvos mokslų akademija, 2021. ISBN 9789986080855, p. 18-18, ISBN 9789986080855, 9789986080862.

CURRICULUM VITAE

Name, Surname Arvydas Strazdauskas
Address Department of Biochemistry, Lithuanian University of Health Sciences, Eiveniu 4, LT-50161 Kaunas, Lithuania
E-mail arvydas.strazdauskas@lsmu.lt

Education

2020–2024 Lithuanian Univeristy of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
PhD student in Biology
2017–2019 Lithuanian Univeristy of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
MSc. in Laboratory Medicine Biology
2013–2017 Lithuanian Univeristy of Health Sciences, Kaunas, Lithuania
BSc. in Medical and Veterinary Biochemistry

Work experience

2020–present Lithuanian University of Health Sciences, Neuroscience Institute,
Laboratory of Biochemistry, Junior researcher
2019–present Lithuanian University of Health Sciences, Medical Faculty,
Department of Biochemistry, Assistant

PADĖKA

Iš visos širdies dėkoju savo mokslinio darbo vadovei prof. dr. Rasai Banienei, kuri jau nuo mano bakalauro studijų mane įkvėpė mokslui. Ačiū Jums, už visapusišką palaikymą, už tūkstančius mokslinių idėjų ir patarimų, už raginimą judėti į priekį, dalyvauti, tobulėti, už daugybę atvertų durų bendradarbiavimui, už visokeriopą rūpestį ir už didelį pasitikėjimą.

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo konsultantei prof. dr. Sonatai Trumbeckaitei už nuolatinį palaikymą, rūpestį ir patarimus, vykdant mokslinius eksperimentus.

Esu be galo dėkingas Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijos vadovei prof. dr. Vilmantei Borutaitei už rūpestingą priėmimą į kolektyvą, už palaikymą ir vertingus patarimus viso mokslinio darbo metu, už raginimą dalyvauti įvairiose mokslinėse veiklose ir už tarpininkavimą, kai reikėdavo pagalbos.

Dėkoju visam Neuromokslų instituto Biochemijos laboratorijos kolektyvui. Bėgant metams jis keitėsi, kai kurie išėjo, bet prisidėjo ir nauji žmonės, tačiau Jūs visi buvot ir esat pats geriausias kolektyvas. Ačiū už visą pagalbą, padaršinius, patarimus, pasisėdėjimus, išvykas, konferencijas, šventes ir visus kitus momentus kartu. Nuoširdžiai dėkoju Justinai Dambrauskienei, Danieliui Umbrasui, Silvijai Jankevičiūtei, Katrynai Pampuščenko, Kristinai Škėmienei, Evelinai Paškevičienei, Vyteniui Markevičiui, Jovitai Gružaitei, Dovilei Uogintaitei, Ramunei Morkūnienei, Juliui Liobikui, Daivai Majienei, Odetai Arandarčikaitei, Ramūnui Jokubkai, Gintarei Žemgulytei, Zbigniev Balion ir esu dėkingas a.a. Pauliui Čižui.

Dėkoju visam Biochemijos katedros kolektyvui už nuolatinį palaikymą ir padaršinimą, už galimybę dalintis sukauptomis mokslo žiniomis su studentais.

Už galimybę atlikti lipidų išskyrimą bei jų chromatografinę-masių spektrometrinę analizę bei už patarimus, konsultacijas, pagalbą ir palaikymą dėkoju LSMU Analizinės ir toksikologinės chemijos katedros vedėjui Liudui Ivanauskui ir dr. Mindaugui Marksai bei Farmacinių technologijų instituto vadovui prof. dr. Valdui Jakštui ir dr. Vaidotui Žvikui.

Už pagalbą ir patarimus atliekant genų raiškos tyrimus dėkoju Gabrielei Kulkovienei, Rūtai Inčiūraitei ir Violetai Šaltenienei.

Dėkoju LSMU Mokslo centrui už nuoširdžią pagalbą administraciniuose reikaluose bei LSMU Mokslo fondui už skirtą finansavimą.

Viskuo kas esu dėkoju savo mylimai žmonai Ievai, kuri visą šį laikotarpį mane palaikė, išklausė, kartu džiaugėsi, drąsino, guodė, turėjo apščiai kantrybės ir supratimo, niekada nedvejojo manimi ir rodė besąlygišką meilę. Ieva,

tu esi dovana iš Dangaus. Nuoširdžiausiai dėkoju savo Mamai, kuri palaikė mane visą šį laikotarpį ir visada didžiavosi manimi.

Esu nuoširdžiai dėkingas visiems, kurie vienaip ar kitaip prisidėjo prie šios kelionės.

Dieve, ačiū už atvertas duris, už visus palaiminimus, kurių nenusipelniau, už pamokas, už Tavo nesibaigiančią meilę ir kas rytą atsinaujinančią malonę (Rd 3:22-23).