

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

**ILGTERMIŅA MITOHONDRIJU
FUNKCIONALITĀTES TRAUCĒJUMU PĒTĪJUMI
PELĒM PĒC VIDĒJĀS CEREBRĀLĀS ARTĒRIJAS
OKLŪZIJAS**

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Reinis Maļuhins**

Studenta apliecības Nr.: rm18029

Darba vadītājs: profesore, Dr. med. Baiba Jansone

RĪGA 2020

ANOTĀCIJA

Mitohondriji ir šūnu enerģijas spēkstacijas, kas oksidatīvās fosforilācijas rezultātā ražo organismam nepieciešamo enerģiju. Išemizēti apstākļi smadzenēs, it īpaši pēc cerebrāla infarkta, var radīt mitohondriju funkcionēšanas traucējumus.

Pētījuma mērķis bija izpētīt vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas radīto ilgtermiņa ietekmi uz mitohondriālo elpošanu peļu CNS smadzeņu audu struktūrās.

Iegūtie maģistra darba rezultāti liecina, ka cerebrāls infarkts pēc diviem, trijiem un četriem mēnešiem būtiski samazina mitohondriju skābekļa patēriņu abās smadzeņu garozas puslodēs un hipokampa struktūrā.

Iegūtie rezultāti sniedz jaunas zināšanas un atziņas par ilgtermiņa izmaiņām mitohondriju funkcionēšanā, pirmsklīniski izpētot, to aktivitāti vairākus mēnešus pēc insulta.

Atslēgvārdi: mitohondriji, oksigrāfs, skābekļa patēriņš, cerebrāls infarkts, smadzeņu garoza, hipokampa struktūra

SUMMARY

Mitochondria play a pivotal role in cellular function as a major site of ATP production. Ischemic conditions in the brain, especially after cerebral infarction, can lead to mitochondrial dysfunction.

The aim of this study was to investigate the long-lasting effects of middle cerebral artery occlusion on mitochondrial respiration in mouse model CNS brain tissue structures.

The results show that cerebral infarction after two, three and four months significantly reduces mitochondrial oxygen consumption in both hemispheres of the cerebral cortex and the hippocampus.

The obtained results provide new knowledge and insights into long-lasting changes in mitochondrial function by pre-clinical study of their activity several months after stroke.

Keywords: mitochondria, oxygraph, oxygen consumption, cerebral infarction, brain cortex, hippocampus

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Nosaukums latviešu valodā	Nosaukums angļu valodā
2-VO	divu asinsvadu oklūzija	<i>two-vessel occlusion</i>
4-VO	četrus asinsvadu oklūzija	<i>four-vessel occlusion</i>
5-HT _{1A}	serotonīna receptora subtips 1A	<i>serotonin 1A receptor</i>
ACA	Kardioliipīna antivielas	<i>Cardiolipin antibodies</i>
ADF	adenozīndifosfāts	<i>adenosine diphosphate</i>
ATF	adenozīntrifosfāts	<i>adenosine triphosphate</i>
Atg8	autofāģijas- atkarīgais proteīns 8	<i>autophagy-related protein 8</i>
Bnip3	proteīn- mijiedarotāju proteīns 3	<i>protein- interacting protein 3</i>
BSA	vērša seruma albumīns	<i>bovine serum albumin</i>
C57BL/6NHsd	specifiskas līnijas laboratorijas peļu tēviņi	<i>inbred mice</i>
CD49d	integrīns- α4	<i>integrin alpha subunit</i>
CoQ/ Q10	koenzīms Q10	<i>coenzyme Q10</i>
COX	mitohondriju citohroma c oksidāze	<i>Mitochondrial cytochrome c oxidase</i>
DALYs	pēc invaliditātes samērotie dzīves gadi	<i>disability-adjusted life year</i>
Fas	otrā veida transmembrānu proteīns	<i>type-II transmembrane protein</i>
FIS1	fragmentēšanās proteīns 1	<i>mitochondrial fission 1 protein</i>
<i>fMCAo</i>	pētījuma cerebrālā infarkta grupas apzīmējums	-
FUNDC1	mitohondriju ārējās membrānas proteīns	<i>mitochondrial outer-membrane protein</i>
HRR	augstas izšķirtspējas respirometrija	<i>high resolution respirometry</i>
i.m.	intramuskulāri	<i>intramuscular</i>
i.p.	intraperitoneāli	<i>intraperitoneal</i>

ICAM-1	intercelulārās adhēzijas molekulas 1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
YLDs	dzīves gadi, kas nodzīvoti ar invaliditāti	<i>years lived with disability</i>
YLLs	potenciāli zaudētie dzīves gadi	<i>years of life lost</i>
KSS	koronārā sirds slimība	<i>coronary artery disease</i>
LC3	mikrotubuļu asociētā proteīna 1A/1B- vieglā ķēde	<i>microtubule-associated protein 1A/1B-light chain</i>
MCA	vidējā cerebrālā artērija	<i>middle cerebral artery</i>
MCAO	vidējās cerebrālās artērijas oklūzija	<i>middle cerebral artery occlusion</i>
MCP-1	monocītu hemoatraktantu proteīns 1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MiRO ₅	mitohondriju buferšķīdums	<i>mitochondrial respiration medium</i>
Mt Thom	mitohondriju saturošu audu homogenātu apzīmējums	<i>homogenized tissues</i>
NAD ⁺	nikotīnamīda adenīdinukleotīda oksidētā forma	<i>oxidized nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	nikotīnamīda adenīdinukleotīda reducētā forma	<i>reduced nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NIX	Pro-apoptotisks gēns	<i>pro-apoptotic gene</i>
NRF1	nukleārais elpošanas faktors-1	<i>nuclear respiratory factor 1</i>
OXPHOS	oksidatīvā fosforilācija	<i>oxidative phosphorylation</i>
PARKIN	ubikvitīna ligāze	<i>ubiquitin ligase</i>
PGC1 α	peroksisomu proliferātor-aktivētais receptors γ ko-aktivētājs-1 α	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
Pi	neorganiskais fosfāts	<i>inorganic phosphate</i>
PINK1	fosfatāzes-&-tenzīna-homologu inducētā kināze-1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>

rCBF	cerebrālā asinsplūsma	<i>regional cerebral blood flow</i>
ROS	reaktīvā skābekļa savienojumi	<i>reactive oxygen species</i>
ROX	reziduāls skābekļa patēriņš	<i>residual oxygen consumption</i>
Ser 65	antifosfoubikvitīns	<i>anti-phospho-ubiquitin</i>
Sham	pētījuma kontroles grupas apzīmējums	-
SOD	superoksīda dismutāze	<i>superoxide dismutase</i>
SPKC	Slimību profilakses un kontroles centrs	<i>Centre for disease prevention and control</i>
SSK	Starptautiskā statistiskā slimību un veselības problēmu klasifikācija	<i>International statistical classification of diseases and related health problems</i>
SUIT	substrātu- atjūdzēju-inhibitoru titrēšana	<i>Substrate-uncoupler-inhibitor titration</i>
TFAM	mitohondriju transkripcijas A- faktors	<i>mitochondrial transcription factor A</i>
TIL	tranzitora išēmiska lēkme	<i>transient ischemic attack</i>
TIM	mitohondriju iekšējās membrānas translokāze	<i>translocase of the inner membrane</i>
TOM	mitohondriju ārējās membrānas translokāze	<i>translocase of the outer membrane</i>
tPA	audu plazminogēna aktivators	<i>tissue plasminogen activator</i>
UQ	hinoli	<i>quinols</i>
VCAM-1	vaskulārās šūnu adhēzijas molekulas 1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
ZVA	Zāļu valsts aģentūra	<i>State agency of medicines</i>

SATURS

ANOTĀCIJA.....	2
SUMMARY.....	3
DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	4
IEVADS.....	9
1. LITERATŪRAS APSKATS	11
1.1. Mitohondriju vispārīgs raksturojums.....	11
1.1.1. Mitohondriju uzbūve	11
1.1.2. Mitohondriju funkcijas	14
1.2. Mitohondriju nozīme homeostāzes nodrošināšanā.....	18
1.3. Mitohondriju dinamikas nozīme cerebrāla infarkta norisē.....	19
1.3.1. Mitohondriju mitofāģija	20
1.4. Mutāciju ierosinātas iedzimtas mitohondriālās slimības.....	21
1.4.1. Sekundārās mitohondriālās slimības	23
1.4.2. Mitohondriālo slimību ārstēšanas iespējas	25
1.5. Insulta klasifikācija.....	26
1.6. Insulta epidemioloģija- incidence un prevalence	26
1.6.1. Insulta izraisītas invaliditātes koriģētie dzīves gadi	28
1.7. Cerebrāls infarkts.....	29
1.7.1. Cerebrālā infarkta kaskāde	30
1.8. Pašreizējās iespējas un nākotnes vīzijas cerebrāla infarkta ārstēšanā	33
1.9. Pašregulācijas mehānismi cerebrāla infarkta gadījumā.....	34
1.9.1. Cerebrālā plasticitāte	34
1.10. Insulta iniciēšanas modeļi jeb insulta pirmsklīniska modelēšana	35
1.10.1. Cerebrālā infarkta iniciēšanas modeļi.....	36
2. MATERIĀLI UN METODES.....	38
2.1. Izmēģinājuma dzīvnieki un pētījuma ētika.....	38
2.2. Materiāli un reaģenti.....	38

2.3. Pētījuma dizains un eksperimentālās grupas	39
2.4. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzija ar monofilamentu	39
2.5. Pēc ķirurģijas aprūpes periods	42
2.6. Pētījuma in vivo un ex vivo testi	42
2.7. Smadzeņu izolēšana, struktūru atdalīšana un sagatavošana O ₂ k eksperimentam	42
2.8. Augstas izšķirtspējas respirometrijas metode, izmantojot O ₂ k oksigrāfu	45
2.9. SUIT protokoli.....	46
2.10. Mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumi	46
2.11. Statistiskās apstrādes metodes	47
3. REZULTĀTI	48
3.1. Mitohondriālais skābekļa patēriņš peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrās divus mēnešus pēc cerebrāla infarkta.....	48
3.2. Mitohondriālais skābekļa patēriņš peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrās trīs mēnešus pēc cerebrāla infarkta.....	50
3.3. Mitohondriālais skābekļa patēriņš peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrās četrus mēnešus pēc cerebrāla infarkta	52
DISKUSIJA	54
SECINĀJUMI	58
PATEICĪBAS	59
IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI.....	60
PIELIKUMI.....	68
1. pielikums	68
2. pielikums	69
3. pielikums	70
DOKUMENTĀRĀ LAPA	71

IEVADS

Mitohondriji, kas sastāv no divām atsevišķām un funkcionāli atšķirīgām membrānām, ir radušies no primitīvām eikariotu šūnām un baktērijām (Nunnari & Suomalainen 2012; Kühlbrandt 2015; Roger *et al.*, 2017). Gan formai, gan struktūrai piemīt dinamiskums un plastiskums (Alberts *et al.*, 2002). Visbiežāk mitohondriji ir lokalizēti zonās, kurās ir hiperekspresēti enerģijas ģenerēšanai nepieciešamie substrāti, vai zonās, kurās ir pastiprināts enerģijas patēriņš, piemēram, muskuļaudos, smadzeņu audos, miokarda šūnās. Mitohondriji ir šūnu enerģijas spēkstacijas, kas ietekmē un kontrolē: šūnu atgriezenisko-kontrolējamo šūnu nāvi, Ca^{2+} līmeni šūnas citoplazmā, adaptīvo termogēnēzi, hormonu biosintēzi u.c. vitāli nepieciešamos procesus. Tomēr viena no vissvarīgākajām mitohondriju funkcijām ir ATF ģenerēšana, kas rodas oksidatīvās fosforilēšanās rezultātā (Thomas & Ashcroft 2019; Huang *et al.*, 2019).

Oksidatīvo fosforilēšanos nodrošina mitohondriju iekšējā membrānā lokalizētā elektronu pārnese ķēde, kas sastāv no pieciem lielmolekulāriem savienojumiem, veidojot OXPHOS mašīneriju (Kühlbrandt 2015; Dard *et al.*, 2020). Pastāv varbūtība, ka elektronu pārnese ķēdes darbības rezultātā var notikt elektronu noplūde, kas sekmē brīvo radikāļu veidošanos (Weng *et al.*, 2018). Mitohondriji ir primārais un intracelulārais brīvo radikāļu avots, tostarp, paši mitohondriji kalpo par galveno mērķi brīvo radikāļu modulējošām un toksiskām darbībām (Casas *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019). Atbilstoša mitohondriju funkcionalitāte ir atkarīga no intracelulārās homeostāzes. Savukārt mitohondriju homeostāze ir atkarīga no trīs mitohondriju kvalitātes kontroles mehānismiem, tie būtu: spēja neitralizēt brīvos radikāļus, proteostāzes (mitohondriālā proteīnu homeostāze), un bioģenēzes (Murphy *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019). Mitohondriju homeostāzes traucējumi var būt: ģenētiski predisponēti, citu patoloģisku stāvokļu, piemēram, neirodeģeneratīvu slimību, autoimūnu vai cerebrovaskulāru notikumu mediēti. Līdz ar to, iedzimtie vai iegūtie mitohondriālie traucējumi izraisa mitohondriālās slimības (Gorman *et al.*, 2016; Niyazov *et al.*, 2016; Kanungo *et al.*, 2018).

Atkarībā no mitohondriju kvalitātes kontroles mehānismiem (it īpaši bioģenēzes) ir atkarīgs turpmākais šūnas dzīves cikls, it īpaši išemizētos apstākļos pēc pārciesta cerebrāla infarkta (Chen *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018). Cerebrāls infarkts ir viens no visbiežāk sastopamajiem cerebrovaskulāro notikumu veidiem. Cerebrāls infarkts tiek diagnosticēts aptuveni 87% gadījumu no visiem hospitalizētiem insulta gadījumiem, bet atlikušos 13% veido hemorāģisks (intracerebrālas vai subarahnoidālas izcelsmes) insults (Sacco *et al.*, 2013; Andrabi *et al.*, 2019).

Klīniski cerebrālu infarktu apzīmē ar pierādītu smadzeņu fokālu bojājumu, kam par iemeslu kalpo daļējs vai pilnībā okludēts asinsvads (Avan *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020). Samazināta vai pārtraukta cerebrālā asinsplūsma mediē hipoksijas iestāšanos. Līdz ar to turpmākā mitohondriju dzīvotspēja būs atkarīga no to spējas pielāgoties pārejai no proapoptotiskiem apstākļiem uz izdzīvošanas apstākļu mēģinājumiem nākamo stundu, dienu vai pat daudz ilgākā laikā (Chen *et al.*, 2011). Līdz šim zinātniskā literatūrā ir atrodama informācija par pirmsklīniskiem pētījumiem, kas apraksta mitohondriālo funkcionēšanu neilgi pēc insulta. Taču iztrūkst zināšanu par mitohondriju funkcionalitātes kvalitāti ilgtermiņā, pirmsklīniski izpētot to aktivitāti vairākus mēnešus pēc insulta.

Darba mērķis:

Izpētīt cerebrāla infarkta, iegūta ar endovaskulārā filamenta inducētās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas metodi, ilgtermiņa ietekmi uz mitohondriālo elpošanu peļu smadzeņu audu struktūrās.

Darba mērķa sasniegšanai tika izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Izmantojot augstas izšķirtspējas skābekļa patēriņa noteikšanas metodi (HRR), izpētīt mitohondriju skābekļa patēriņa izmaiņas ilgtermiņā – divus, trīs un četrus mēnešus pēc endovaskulārā filamenta inducētās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas izmēģinājuma dzīvnieku smadzeņu garozas abās puslodēs.
2. Izmantojot HRR, izpētīt mitohondriju skābekļa patēriņa izmaiņas ilgtermiņā – divus, trīs un četrus mēnešus pēc endovaskulārā filamenta inducētās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas izmēģinājuma dzīvnieku smadzeņu hipokampa struktūrā.
3. Analizēt izmēģinājuma dzīvnieku mitohondriju skābekļa patēriņa izmaiņas ar mitohondriju kompleksu I un II saistītiem rādītājiem smadzeņu garozas abu pusložu un hipokampa struktūrā, savstarpēji salīdzināt izmaiņas abās smadzeņu puslodēs vienas grupas ietvaros un starp abām eksperimentālajām grupām.

Maģistra darbā tika apgūtas un izmantotas sekojošas pētniecības metodes: vidējās cerebrālās artērijas oklūzija ar endovaskulāro monofilamentu un atkārtotu reperfūziju; cervikāla dislokācija ar sekojošu smadzeņu audu struktūru izolēšanu; augstas izšķirtspējas respirometrija (HRR).

Pētījuma darbs tika veikts ERA-NET NEURON JTC 2017 “*Synaptic Dysfunction*” programmas transnacionālā zinātnes konsorcijs projekta “*Multi-scale investigation of synaptic dysfunction after stroke*” (MISST) projekta Nr. ES RTD/2018/29 ietvaros.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Mitohondriju vispārīgs raksturojums

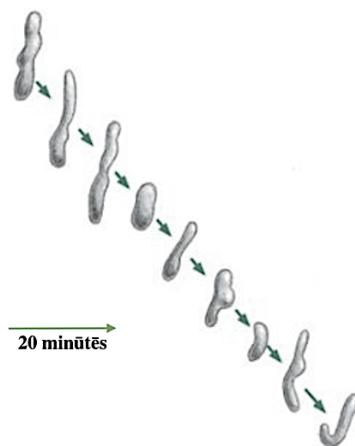
Mitohondriji ir vieni no šūnas organoīdiem, kas pēc endosimbiozes teorijas ir radušies no primitīvām eikariotu šūnām, simbiozes procesā iekļaujot citu baktēriju šūnas (Roger *et al.*, 2017). Mitohondriju priekšteči sastāvēja no šūnu sakopojumiem, t.i., alfa-proteobaktērijām un eikariotu proģenitoru šūnām (nosacītām cilmes šūnām) (Osellame *et al.*, 2012; Friedman & Nunnari 2014; Kühlbrandt 2015).

Sākotnēji mitohondrijus dēvēja par bioblastiem jeb elementārvienībām šūnas protoplazmā – organisma šūnas citozolā, kurā norisinās visi dzīvības procesi. Bioblastus pirmo reizi 1894. gadā aprakstīja vācu izcelsmes histologs Ričards Altmans (1852-1900) (Altman 1894).

Mitohondriji nav tikai šūnu spēkstacijas, mitohondrijiem piemīt vitāla nozīme daudzu citu šūnās esošo procesu nodrošināšanā, un otrādi – pārtraukšanā. Pēdējo padesmitgadu laikā ir kardināli mainījies priekšstats par mitohondriju lomu šūnu funkcionēšanā un organismu eksistēšanā, sākot no enerģijas nodrošināšanas un šūnas dzīves cikla regulācijas, beidzot ar jaunu farmakoloģisku stratēģiju izstrādāšanu, kas regulētu un uzlabotu to funkcionēšanu (Friedman & Nunnari 2014; Kühlbrandt 2015; Roger *et al.*, 2017; Dard *et al.*, 2020).

1.1.1. Mitohondriju uzbūve

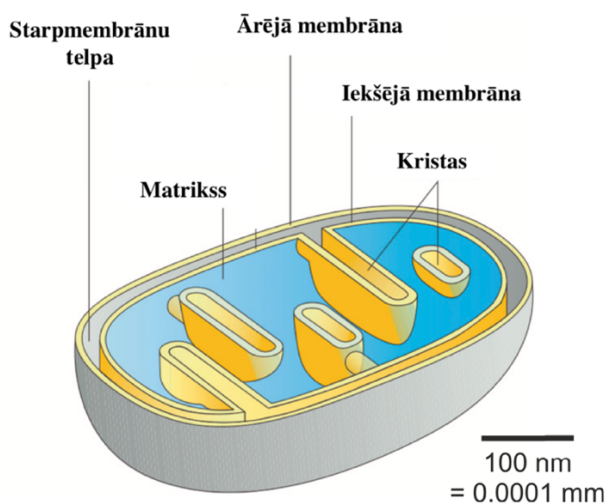
Mitohondriji pēc formas var būt: lodveida, hantelveida, nūjiņ- vai elipsveida. Gan formai, gan struktūrai piemīt dinamiskums, tie var augt garumā, saīsināties, savīties vai pat fragmentēties, šīs izmaiņas regulē šūnas citoskelets (skat. 1.1.1.1. att.).



1.1.1.1. att. Mitohondriju struktūras dinamiskums un plastiskums (ar izmaiņām no: Alberts *et al.*, 2002)

Mitochondriju atrašanās vieta jebšu lokalizācija ir atkarīga no mitohondrijiem nepieciešamo substrātu koncentrācijas. Mitohondriji ir lokalizēti zonās, kur tiek hiperekspresēti substrāti, kas nepieciešami oksidatīvai fosforilācijai, piem., lipīdu un/vai ogļhidrātu ieslēgumi. Vai arī zonās, kur tiek pastiprināti patērēta enerģija, piem., muskuļaudos gar miofibrillām u.c., tādējādi mazinot enerģijas zudumus ADF fosforilēšanās laikā (Alberts 2002 *et al.*, Fernández-Vizarra *et al.*, 2011; McCarron *et al.*, 2013).

Mitohondriji sastāv no divām atsevišķām un funkcionāli atšķirīgām ārējām un iekšējām membrānām, kas iekapsulē starpmembrānu telpu un matriksu. Mitohondriju ārējā membrāna ir gluda, bet iekšējā membrāna veido dinamiskus ieliekumus, kas tiek dēvēti par kristām (skat. 1.1.1.2. att.) (Nunnari & Suomalainen 2012; Kühlbrandt 2015).

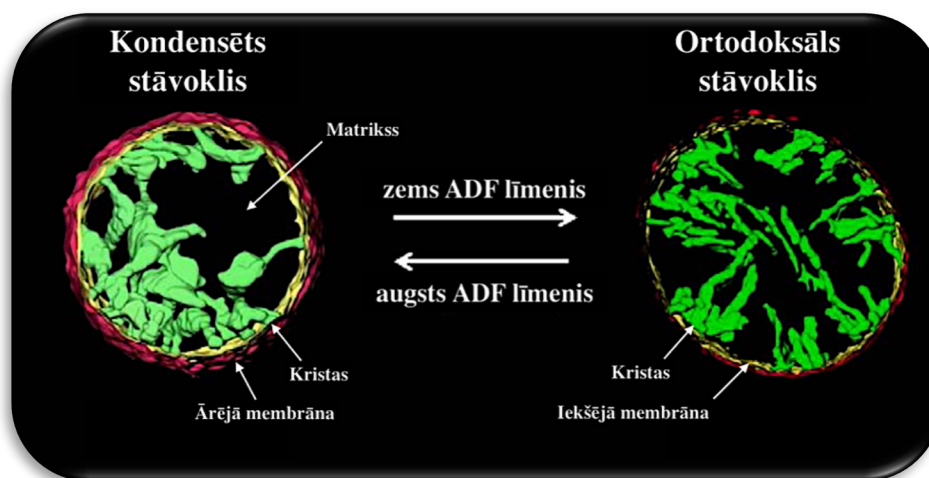


1.1.1.2. att. **Mitohondriju uzbūve** (ar izmaiņām no: Kühlbrandt 2015)

Mitohondriju ārējā membrāna ir poraina un izteikti lipofīla, kuras biezums svārstās no 6 līdz 7,5nm. Ārējā membrāna satur poru veidojošus membrānu proteīnus jeb porīnus, piemēram, voltāztatkarīgo jonu kanālus, kas ļauj brīvi difundēt joniem, metabolītiem, nukleotīdiem, kā arī citām neitrāli lādētām daļiņām. Izmēros lielākas molekulas, piem., proteīni cauršķērsos ārējo membrānu gadījumā, ja proteīna N-terminētā gala sekvence saistīsies ar membrānā esošajām translokāzēm (TOM) jeb signālpeptīdiem. Proteīnu importu starpmembrānu telpā nodrošina aktīvā vielu transporta mehānismi ar šaperonu klātbūtni. Tā kā ārējā mitohondriju membrāna ir poraina, tad starpmembrānu telpas ķīmiskais sastāvs ir līdzvērtīgs citoplazmas sastāvam, kā arī pH ir robežās no 7,2 līdz 7,4 vienībām (Osellame *et al.*, 2012; Kühlbrandt 2015; Dard *et al.*, 2020).

Mitohondriju iekšējās membrānas caurlaidība ir zema un izteikti hidrofīla, membrāna nesatur porīnus. Molekulas un lielmolekulārie savienojumi, kas ir iekļuvuši starpmembrānu telpā, kam ir jādifundē tālāk, t.i., matriksā, kā transportproteīnus izmanto iekšējās membrānas translokāžu kompleksus (TIM) (Kühlbrandt 2015). Galvenokārt, iekšējā membrāna sastāv no: polipeptīdiem (mitohondriju elpošanas ķēdes kompleksi), kas ir nepieciešami elektronu pārnesei ķēdes īstenošanai jeb oksidatīvās fosforilācijas nodrošināšanai; F_1F_0 - veida ATF sintāzēm; metabolītu un citu vielu transportproteīniem; kā arī no šūnas dzīves cikla un apoptozes procesos iesaistītajiem bioķīmisko un ģenētisko sistēmu regulatorajiem proteīniem (Paradies *et al.*, 2014; Pizzorno 2014; Kühlbrandt 2015; Dard *et al.*, 2020).

Izšķir divus mitohondriju pamatstāvokļus – kondensētais un ortodoksālais. Kondensētā stāvoklī ir sarucis kristu skaits, bet palielinājies katras kristas tilpums. Tādējādi kondensētā stāvoklī samazinās mitohondrija iekšējās membrānas virsmas laukums, un oksidatīvās fosforilācijas kapacitāte. Savukārt ortodoksālā stāvoklī novēro palielinātu kristu skaitu un iekšējās membrānas virsmas laukumu, kas pastiprina oksidatīvās fosforilācijas kapacitāti (skat. 1.1.1.3. att.) (Manella 2006; Scorrano 2013).



1.1.1.3. att. Mitohondriju pamatstāvokļi (ar izmaiņām no: Manella 2006)

Mitohondriju iekšējo membrānu iekapsulētais matrikss satur sārmainu vidi, t.i., pH variē no 7,9 līdz 8,0 vienībām. Vides pH līmenim ir kritiska nozīme, matriksā vide sārmaināka, savukārt starpmembrānu telpā – neitrālāka. Vides pH līmeņa atšķirības ierosina protonu elektroķīmisko gradientu, kas stimulē ATF sintēzi (Llopis *et al.*, 1998). Matrikss satur enzīmus, kas nepieciešami gan proteīnu biosintēzei, gan transkripcijai, gan Krebsa ciklam un taukskābju oksidēšanai. Papildus matrikss satur mitohondriālo dezoksiribonukleīnskābi (mtDNS), kas ir cieši saņķināts kopā ar mitohondriju transkripcijas A-faktoru (TFAM), veidojot nukleoīdus (Kukat *et al.*, 2015; Kühlbrandt 2015; Dard *et al.*, 2020).

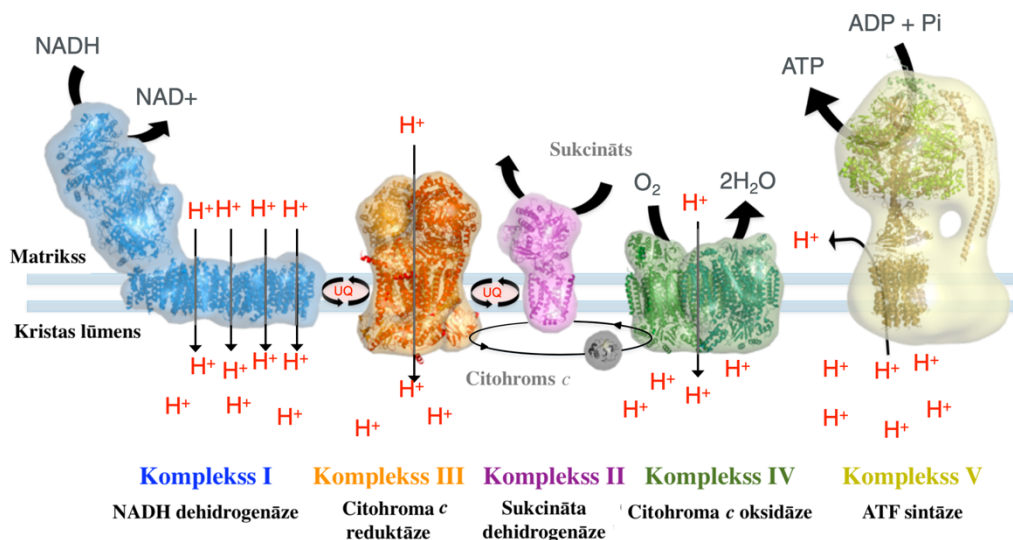
1.1.2. Mitochondriju funkcijas

Mitochondriji – šūnu enerģijas spēkstacijas – ietekmē un kontrolē dažādus šūnas procesus. Kontrolē Ca^{2+} līmeni šūnas citoplazmā, iesaistās šūnu atgriezenisko- programmējamo šūnu nāvē jeb apoptozē, adaptīvajā termogēnēzē, hormonu biosintēzē un citur. Mitochondriji ir primārais endogēno reaktīvā skābekļa formu (ROS) avots (Shaughnessy *et al.*, 2014; Kühlbrandt 2015; Amigo *et al.*, 2016; Thomas & Ashcroft 2019; Huang *et al.*, 2019).

Galvenā mitochondriju funkcija ir producēt ATF, kas rodas oksidatīvās fosforilēšanās (OXPHOS) rezultātā, šūnām nodrošinot aerobo elpošanu. Mitochondriji saražo teju 90% no šūnai nepieciešamās enerģijas (Osellame *et al.*, 2012; Shaughnessy *et al.*, 2014). Svarīgākās funkcijas nodrošināšana balstās uz pieņēmumu, t.i., hemiosmozes teoriju. Teoriju 1961. gadā aprakstīja P. Mitčells (1920-1992), kurā izteica pieņēmumu, ka hemiosmoze ir šūnas membrānu spēja izmantot ķīmisko enerģiju, lai rezultātā caur membrānu transportētu protonus un pēc tam izmantotu radušos protonu gradienta enerģiju ATF sintēzei vai cita šūnai noderīga darba veikšanai (Mitchell 1961).

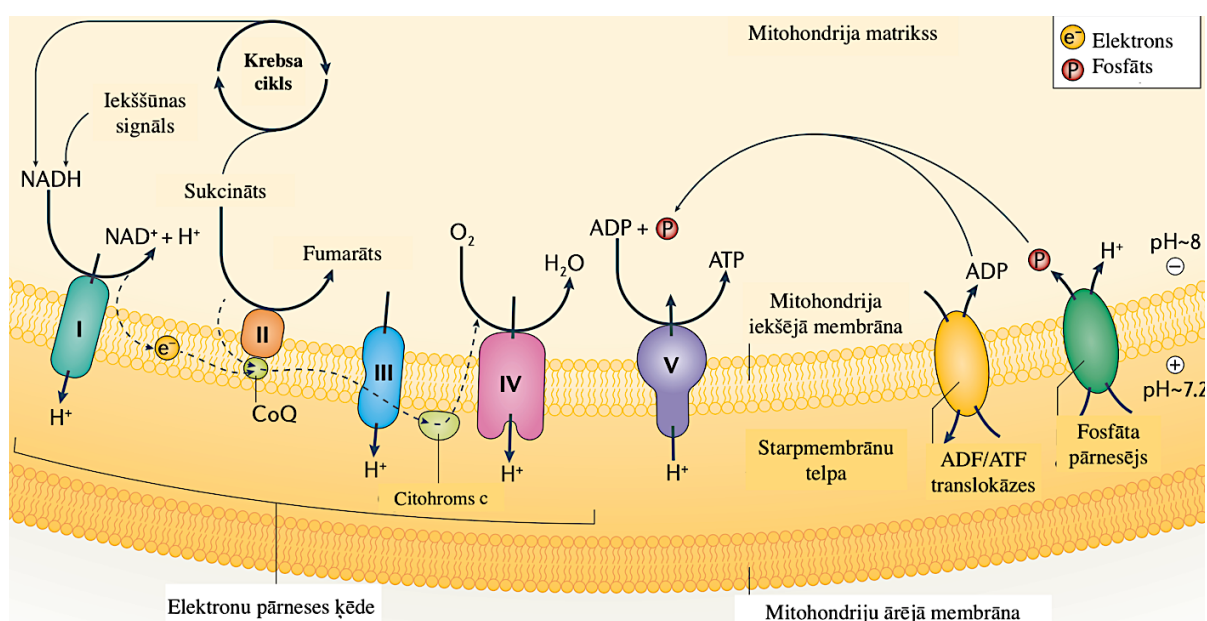
1.1.2.1. Elektronu pārnese ķēde

Mitochondriju elpošanas ķēdi, kuru mēdz dēvēt par elektronu pārnese ķēdi veido aptuveni 90 dažādi lielmolekulāri savienojumi jeb polipeptīdi. Polipeptīdi veido piecus enzīmu kompleksus, kas ir lokalizēti mitochondriju iekšējā membrānā (skat. 1.1.2.1.1. att.). Aptuveni 13 no 90 polipeptīdiem kodē mitochondriju matriksā esošā mtDNS, savukārt pārējos polipeptīdus kodē mitochondriju kodola DNS (Kühlbrandt 2015; Gorman *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2018).



1.1.2.1.1. att. Mitochondriju elektronu pārnese ķēdes kompleksi (ar izmaiņām no: Kühlbrandt 2015)

Mitochondriju elpošanas ķēdes proteīnu subvienības tieši nepiedalās elektronu pārnēsē, to funkcija ir nodrošināt atbilstošu red-oks grupu atrašanos un mikrovidi ap tām. Elektronu pārnēsi veic specifiski pārnēsēji – hinoni. Hinoni ir red-oks kofaktori, prostētiskās grupas, kas ir saistīti pie konkrētām energosajūdošo membrānu proteīnu struktūrām, t.i., elektronu pārnēses kompleksiem (skat. 1.1.2.1.1. att.). Hinoni, piem., ubihinons (apzīmē ar Q10, CoQ), reducētā forma UQ, ir taukos šķīstoši savienojumi ar dažāda garuma izoprenoīdu sānu ķēdēm, kas, difundējot mitochondriju iekšējā membrānā, pārnē vienu vai divus elektronus starp pārējām elektronu transporta ķēdes sastāvdaļām. Savukārt citohromi funkcionē kā mobilie red-oks kofaktori elpošanas ķēdes vidusdaļā un beigās (Kühlbrandt 2015; Gorman *et al.*, 2016; Dard *et al.*, 2020).



1.1.2.1.2. att. Oksidatīvās fosforilācijas attēlojums (ar izmaiņām no: Gorman *et al.*, 2016)

Pirmie četri elpošanas kompleksi veido elektronu pārnēses ķēdi un kopā ar piekto kompleksu veido OXPHOS mašīnēriju. Atkarībā no protonu gradienta veidošanās spējām, pārnēses ķēdi mēdz iedalīt sīkāk. Protonu gradientu veido trīs, salīdzinot pēc to struktūrām, masīvāki kompleksi. Vispirms elektronu pārnēsi iniciē Krebsa ciklā izveidotās nikotīnamīda adenīdinukleotīda reducētās formas (NADH) molekulas, kuras Komplekss I (NADH dehidrogenāze) oksidējot, izveido NAD⁺ molekulas un pats svarīgākais – četrus elektronus, kuri tiek pumpēti no matricas starpmembrānu telpā (kristas lūmenā) (skat. 1.1.2.1.2. att.). Pirmais komplekss nodrošina teju 30 līdz 40% no kopējā elektronu pārnēses ķēdes izveidotā protonu gradienta.

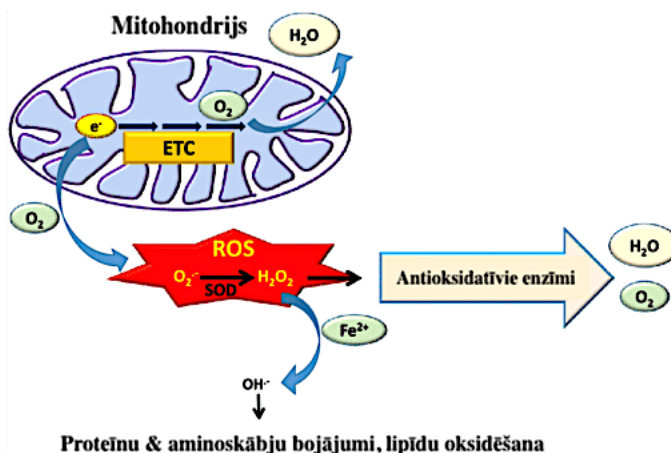
Komplekss II nesekmē protonu pārvietošanu mitohondriju iekšējā membrānā, līdz ar to tas nav iesaistīts protonu gradienta veidošanā. Tas ir vienīgais komplekss, kas ir gan Krebsa cikla, gan elektronu pārnese ķēdes sastāvdaļa. Krebsa ciklā veicina sukcināta oksidēšanos par fumarātu, kas nepieciešams hinonu darbībai (Ylikallio & Suomalainen 2012). Oksidēšanās reakcijas laikā atbrīvotos elektronus hinoni, precīzāk, to reducētās formas – hinoli (UQ) pārnes elektronus kompleksam III (citohroma *c* reduktāzei). Savukārt, komplekss IV (citohroma *c* oksidāze) pārnestos elektronus sajūdz ar elektronu akceptoru – molekulāro skābekli, veidojot ūdens molekulas. Elektronu pārnese rezultātā iegūtais elektroķīmiskais gradients starp iekšējo membrānu un matriksu, kā arī protonu dzinējspēks sekmē piektā kompleksa (ATF sintāzes) darbību. ATF sintāze fosforilē adenozinīdifosfātu (ADF) un neorganisko fosfātu (Pi), veidojot ATF (skat. 1.1.2.1.2. att.) (Osellame *et al.*, 2012; Kühlbrandt 2015; Spinelli & Haigis 2018; Thomas & Ashcroft 2019; Dard *et al.*, 2020).

1.1.2.2. Brīvo radikāļu veidošanās

Mitohondriji ir primārais un intracelulārais brīvo radikāļu avots, tostarp, mitohondriji kalpo par galveno mērķi brīvo radikāļu modulējošai un toksiskai darbībai (Casas *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019). Brīvie radikāļi ir izteikti reaģētspējīgas molekulas, kas satur vienu vai vairākus nesapārotus elektronus (Cheng *et al.*, 2011; Casas *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2016). Brīvo radikāļu hiperekspresija rezultējas oksidatīvajā stresā, procesā, kurā novēro brīvo radikāļu pārsvaru pār antioksidantiem. Oksidatīvais stress veicina viegli oksidējamo struktūru degradāciju, tiek bojātas aminoskābes, šūnu proteīni un citoskeleti, un citas struktūras (Yang *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019).

Brīvie radikāļi ne tikai sekmē oksidatīvo stresu, bet arī iesaistās citu nozīmīgu fizioloģisku procesu regulācijā. Zema brīvo radikāļu klātbūtne šūnā var kalpot kā signālmolekulas, iesaistoties, piem., iekaisuma atbildes rašanās procesā, šūnu dalīšanās un augšanas procesos, imūnās sistēmas reakcijās (Casas *et al.*, 2015). Brīvie radikāļi iekaisuma atbildes rašanās procesā ietekmē citokīnu izdalīšanos, kas tālāk sekmē imūnās sistēmas atbildes reakciju (Angajala *et al.*, 2018). Intracelulārā antioksidatīvā sistēma, kas iekļauj superoksīda dismutāzes, glutaciona peroksidāzes un katalāzes spēju novērst antioksidantu – oksidantu līdzsvara traucējumus (Cheng *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2016). Piemēram, superoksīda dismutāzes (SOD) katalizē radikāļu pārveidošanos ūdeņraža peroksīdā (H_2O_2), kam arī piemīt radikāļu īpašības, bet var tikt tālāk pārveidots H_2O un O_2 . Glutaciona peroksidāzes kalpo kā elektronu donori, kas var reducēt un pārraut disulfīda saites tiem savienojumiem (proteīniem, aminoskābēm), kuri brīvo radikāļu ietekmē tika oksidēti (Thomas & Ashcroft 2019).

Pastāv iespējamība, ka mitohondrijos iekšējās membrānas esošajā elektronu pārnese ķēdē, tās darbības rezultātā, var notikt elektronu noplūde (skat. 1.1.2.2. att.).



1.1.2.2. att. Brīvo radikāļu veidošanās mitohondrijos (ar izmaiņām no: Weng *et al.*, 2018)

Galvenokārt, elektronu noplūde notiek caur pirmo un trešo elektronu pārnese kompleksu, kas var sekmēt radikāļu veidošanos, bet otrais elpošanas komplekss (kas nav iesaistīts protonu gradienta veidošanā) sekmē superoksīdu veidošanos. Uzskata, ka 0,1% no visiem pārnestajiem elektroniem mitohondriju elektronu pārnese ķēdē inducē daļēju O_2 reducēšanu superoksīdā (Murphy *et al.*, 2016). Pirmais un otrais elpošanas komplekss ģenerē brīvos radikāļus tikai mitohondriju matiksā, bet trešais komplekss – gan matiksā, gan starpmembrānu telpā. Jaunizveidotie superoksīdi tiek pārvērsti H_2O_2 , kas turpmāk tiek konvertēti hidroksilradikāļos (OH^\cdot) (de Souza Breda *et al.*, 2019). Salīdzinoši nesen, 2014. gadā, Chouchani *et al.* grupas pētnieki *in vivo* pētījumā pierādīja, ka brīvie radikāļi var veidoties reversās elektronu pārnese rezultātā (Chouchani *et al.*, 2014).

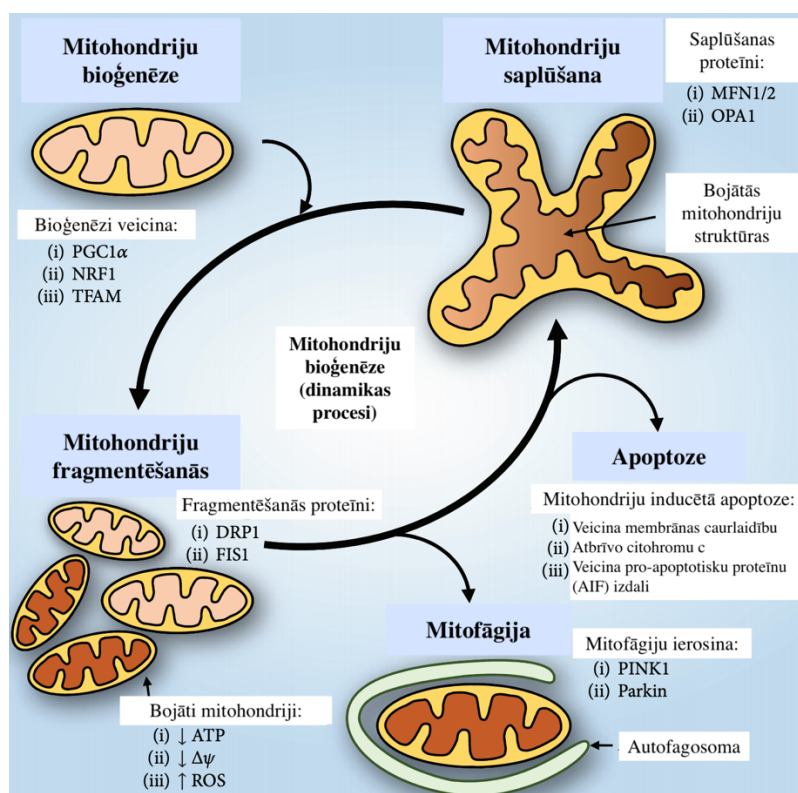
Papildus brīvo radikāļu veidošanos sekmē paaugstinātais mitohondriju membrānas potenciāls (nepieciešams ATF sintēzei), reducēto NADH molekulu hiperekspresija vai arī izmaiņas mitohondriju elektronu pārnese ķēdē (mitohondriju homeostāzes traucējumi). Ne tikai elektronu pārnese kompleksi ir brīvo radikāļu veidotāji, bet arī, citas mitohondriju intracelulārās enzīmu sistēmas. Brīvo radikāļu veidošanos sekmē mitohondriju iekšējā membrānā lokalizētās flavīnu saturošās glicerol-3-fosfāta, iminoskābes jeb prolīna saturošās un dihidroorotāta dehidrogenāzes (Murphy *et al.*, 2016).

Brīvo radikāļu veidošanos sekmē ne tikai intracelulārās enzīmu sistēmas, bet arī mitohondriju ārējā membrānā lokalizētās monoamīnoksidāžu A un B izoformas (flavoenzīmu grupas oksidāzes). Izoformas katalizē katecholamīnu, serotonīna un endogēno amīnu oksidatīvo deaminēšanu. Deaminētie savienojumi spēj ģenerēt aldehīdu, slāpekļa un ūdeņraža peroksīda veidošanos, kas tieši korelē ar mitohondriju funkciju traucējumiem un pastiprinātu brīvo radikāļu veidošanos (Casas *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2016; Kausar *et al.*, 2018; de Souza Breda *et al.*, 2019).

1.2. Mitohondriju nozīme homeostāzes nodrošināšanā

Mitohondrijiem piemīt kritiska nozīme intracelulārās homeostāzes nodrošināšanā. Nodrošinot vajadzīgo mitohondriju homeostāzi, tiks nodrošināta atbilstoša šūnas funkcionēšana (Ashrafi & Schwarz 2013; Huang *et al.*, 2019).

Kopumā izceļ trīs vispārpieņemtus mitohondriju kvalitātes kontroles mehānismus. Pirmais mehānisms ietver mitohondriju spēju neitralizēt brīvos radikāļus; otrs kvalitātes kontroles mehānisms balstās uz mitohondriju proteāžu un šaperonu spēju nodrošināt nemainīgu mitohondriālo proteostāzi jeb proteīnu homeostāzi; trešais kvalitātes kontroles mehānisms ietver mitohondriju bioģenēzi (skat. 1.2. att.).



1.2. att. Mitohondriju homeostāzes nodrošināšanā iesaistītais bioģenēzes mehānisms (ar izmaiņām: no Huang *et al.*, 2019)

Mitohondriju bioģenēze sastāv no:

- a) mitohondriju morfoloģisko stāvokļu kontroles procesiem;
- b) mitohondriju kvantitātes šūnā (kvantitāte atkarīga no mitohondriju dinamikas, t.i., no fragmentēšanās un saplūšanas);
- c) mitofāģijas (autofāģijas procesa paveids) (Friedman & Nunnari 2014; Murphy *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018; Tan & Suda 2018).

Mitohondriju trešo homeostāzes kontroles mehānismu, kas ietver sevī mitohondriju bioģenēzi, uztur peroksisomu proliferātor- aktivētais receptors γ ko-aktivētājs-1 α (PGC1 α), nukleārais elpošanas faktors-1 (NRF1) un mitohondriju transkripcijas A-faktors (TFAM). Savukārt, fragmentēšanos ierosina divi proteīni, t.i., dinamīn-1 līdzīgais proteīns (DRP1), kas mijiedarbojoties ar fragmentēšanās proteīnu 1 (FIS1) sekmē mitohondriju fragmentēšanos. Bojātos un mitofāģijai pakļaujamais mitohondriju detektē specifiskas kināzes (PINK1) un fosfatāzes. Pēc kināžu un fosfatāžu atbildes reakcijas seko specifiskas ligāzes (PARKIN) darbība, kas tieši iniciē autofagosomas izveidošanos un sekojošu mitohondriju mitofāģiju (Ashrafi & Schwarz 2013; Huang *et al.*, 2019; Sprenger & Langer 2019).

Neatbilstoša vai arī kļūdaina mitohondriju homeostāzes nodrošināšana dažādās šūnu līnijās spēj ierosināt neatgriezeniskas reakciju kaskādes, kuru rezultātā var iestāties šūnu nāve (Ashrafi & Schwarz 2013; Friedman & Nunnari 2014; Murphy *et al.*, 2016).

1.3. Mitohondriju dinamikas nozīme cerebrāla infarkta norisē

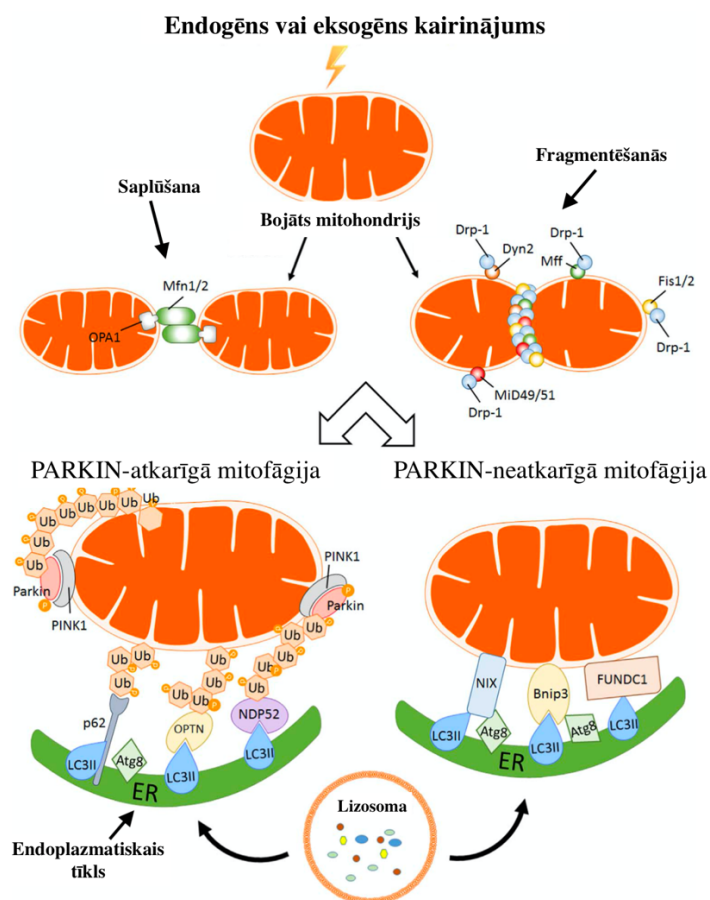
Cerebrāls infarkts, pēc kura novēro mitohondriju membrānas potenciāla izmaiņas, enerģijas ražošanas izsīkumu un absolūtu brīvo radikāļu hiperekspresiju, oklūzijas serdē rada kritisku neironu bojājumu (Liu *et al.*, 2018). Atkarībā no mitohondriju dinamikas spējām, ir atkarīgs turpmākais šūnas dzīves cikls (Yang *et al.*, 2018). Turpmākā šūnu dzīvotspēja išemizētos audos atspoguļo intracelulāru, tostarp mitohondriju, mehānismu spēju pielāgoties pārejai no pro-apoptotiskiem apstākļiem uz izdzīvošanas apstākļu mēģinājumiem nākamo stundu vai pat dienu laikā. Līdz ar to, notikuma vietā bieži vien novēro gan programmēto/ kontrolēto (apoptotisko) vai nekontrolēto/ pasīvo (nekrotisko) šūnu nāvi (Chen *et al.*, 2011).

Cerebrāla infarkta gadījumā mitohondriju spēja saplūst ļauj operatīvi izveidot mitohondriju sakopojumu šūnas iekšienē tā, lai nepieciešamības gadījumā varētu apmainīties ar ģenētisko informāciju (mtDNS). Turklāt, saplūšanas laikā, integrējot bojātam mitohondrijam nebojātā mitohondrija saturu, var panākt organoīda turpmāku dzīvotspēju. Savukārt, mitohondriju fragmentēšanās procesa laikā, tiek bloķēta bojātā mitohondrija struktūras segregācija, tostarp, fragmentēšanās sekmē mitofāģijas darbības procesus, kas galu galā neitralizē bojātos mitohondrijus (Chen *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2016).

1.3.1. Mitohondriju mitofāģija

Mitohondriju bioģenēzes un atbilstoši mitohondriju dinamikas defekti (gan saplūšanas, gan fragmentācijas procesos) sekmē traucētu mitohondriju kustīgumu un funkcionalitāti (Chen *et al.*, 2011).

Definē divus signālu pārnese ceļus, no kuriem ir atkarīga mitofāģijas darbība. Mitofāģiju regulē caur fosfatāzes-&-tenzīna-homologu inducēto kināzi-1 (PINK1), t.i., PARKIN atkarīgo mitofāģiju, vai arī PINK1/ PARKIN neatkarīgo mitofāģiju (skat. 1.3. att.).



1.3. att. Mitohondriju dinamika un sekojoša mitofāģija cerebrāla infarkta gadījumā (ar izmaiņām no: Yang *et al.*, 2018)

Samazinātā mitohondriju membrānas potenciāla dēļ tiek aktivēta PARKIN atkarīgā mitofāģija, jo mitohondrijā novēro pastiprinātu Ca^{2+} ieplūšanu. PINK1 aktivētā forma fosforilē mitohondrijos esošā antifosfoubikvitīna (Ser 65) un hinonu pārpalikumus intracelulārajā telpā, kas bojā mitohondriju membrānu un, kas tālāk sekmē PINK1 atkarīgo mitofāģiju. Hinonu adaptoru proteīni saistās ar mikrotubuļu asociētā proteīna vieglo ķēdi (LC3) un endoplazmatisko tīklu, lai izveidotu autofagosomu. Visbeidzot, autofāģijas procesa beigās, saistoties ar lizosomām, tiek iznīcināts mitohondrijs.

PINK1/ PARKIN neatkarīgā mitofāģija ir atkarīga no *NIX*, Bnip3 (proteīn-mijiedarbotāju proteīnu 3) un FUNDC1 ekspresijas, un aktivitātes. Hipoksijas apstākļos ir hiperekspresēts *NIX* un Bnip3 proteīnu subvienības. Abas proteīnu subvienības ir ekspresētas šūnas citozolā, kas saistās ar autofāģijas-atkarīgo proteīnu 8 (Atg8) un LC3, tādējādi veicinot mitofāģiju (skat. 1.3. att.) (Li *et al.*, 2017; Tang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018).

Diemžēl mitofāģija cerebrālā infarkta gadījumā ir sava veida Dāmokla zobens, jo pastāv risks, ka bojāto mitohondriju mitofāģija būs nepietiekama, kas rezultēsies ar šūnu nāvi, vai arī, mitofāģija nevēlami ietekmēs vēl funkcionējošu mitohondriju eksistenci, kas galu galā arī rezultēsies šūnu nāvē (Chen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2018).

1.4. Mutāciju ierosinātas iedzimtas mitohondriālās slimības

Mitohondriālo slimību patofizioloģija ir sarežģīta, kas, galvenokārt, ietver dažādas mutācijas. Pārsvārā visus mitohondriju funkcionēšanai nepieciešamos proteīnus kodē kodola DNS (nDNS), bet atlikušo daļu mtDNS. Līdz ar to, mutācijas gan mtDNS, gan nDNS genomā izraisa mitohondriju disfunkciju (Ylikallio & Suomalainen 2012; Gorman *et al.*, 2016; Kanungo *et al.*, 2018). Mutāciju ierosinātās mitohondriju disfunkcijas dēļ, tiek iniciēts mitohondriju homeostāzes līdzsvara traucējumi. Savukārt, līdzsvara traucējumu dēļ novēro patoloģiskas izmaiņas organismā, t.i., pastiprinātu brīvo radikāļu ekspresiju, traucētu Ca^{2+} homeostāzi, nekontrolētu šūnu apoptozi un būtiskākais – traucētu enerģijas (ATF) ģenerēšanu (Molnar & Kovacs 2018). Mutāciju izraisīto slimību prevalence – 20 gadījumi uz 100 000 tūkst. iedzīvotājiem (Gorman *et al.*, 2016).

Atkarībā no mutācijas, slimības var būt: autosomāli dominantas vai recesīvas, pa mātes līniju pārmantotas (mutācijas mtDNS genomā) vai ar X hromosomu saistītas (Ylikallio & Suomalainen 2012; Gorman *et al.*, 2016). Mutāciju klīnisko simptomu izpausmes ir atkarīgas no heteroplazmijas līmeņa, jo vairāk mutēto gēnu, jo lielāka fenotipisko izpausmju varbūtība (Gorman *et al.*, 2016).

Kopumā slimības iedala divās grupās:

1. primārās, ietverot mutācijas mtDNS genomā;
2. sekundārās, ietverot mutācijas nDNS genomā (Dard *et al.*, 2020).

Primārās mutācijas mtDNS genomā var izraisīt punktveida mutācijas vai delēcijas. Šāda veida mutācijas skar mt-tRNS, mt-rRNS un proteīnu kodējošus reģionus genomā. Kaut arī mtDNS satur 37 gēnus, kas kodē 13 proteīnus, 22tRNS un divus rRNS, mtDNS genoms nekodē visus funkcionēšanai nepieciešamos proteīnus, līdz ar to, mitohondriju funkcionēšana ir atkarīga no nDNS struktūrā kodētiem proteīniem (Molnar & Kovacs 2018). Piemēram, viena no visbiežāk sastopamajām slimībām ir LHON jeb Lēbera optiskā neiropātija, kur punktveida mutācijas dēļ mtDNS (guanīns (G) tiek aizvietots ar adenīnu (A) un/vai timīns (T) ar citozīnu (C)), novēro teju pilnīgu redzes zudumu (skat. 1.4.1. att.) (Gorman *et al.*, 2016; Molnar & Kovacs 2018; Dard *et al.*, 2020).

Sekundārās mutācijas nDNS un patoloģiskas izmaiņas genomā arī var izraisīt gan punktveida mutācijas, gan delēcijas. nDNS kodē OXPHOS mašīnērijas funkcionēšanai nepieciešamos proteīnus, mitohondriju membrānu un transportieru proteīnus (Molnar & Kovacs 2018). Eksistē saistība starp mutācijām nDNS un mtDNS struktūrās, ja nDNS novēro mutācijas, tad tās var sekmēt arī patoloģiskas izmaiņas mtDNS genomā ar izrietošām mitohondriju disfunkcijas sekām (Gorman *et al.*, 2016, Kanungo *et al.*, 2018). Mutācijas nDNS genomā sekmē mitohondriju dinamikas defektus, jo visus dinamikai nepieciešamos proteīnus kodē nDNS (Ylikallio & Suomalainen 2012; Gorman *et al.*, 2016; Dard *et al.*, 2020).

Ir zināms, ka nDNS mutāciju dēļ rodas OXPHOS mašīnērijas traucējumi. Ģenētiskas izcelsmes traucējumi izraisa ar elektronu pārnesei kompleksiem saistītas slimības. Mutācijas, kas inducē pirmā elektronu pārnesei kompleksa traucējumus ir biežākais slimību cēlonis. Pārsvārā slimības pieder pie neurodeģeneratīvo slimību grupas, piemēram, subakūta nekrotiska encefalopātija jeb Leiga sindroms, ir konstatētas arī citas pātijas, piemēram, kardiomiopātijas, leiko- un kardioencefalopātijas (Ylikallio & Suomalainen 2012; Kanungo *et al.*, 2018; Dard *et al.*, 2020).

Kaut arī otrā elektronu pārnesei kompleksa traucējumi *per se* ir reti sastopami, tie izraisa līdzīgas patoloģijas kā pirmā kompleksa defekta gadījumā. Funkcionāli bojāts un traucēts otrais komplekss inducē Fas ligandu (transmembrānu proteīnu, kas pieder pie tumor-nekrozes faktoru saimes), kas mediē apoptozes iestāšanos (Ylikallio & Suomalainen 2012; Kanungo *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2018).

Pārsvārā visi trešā elektronu pārnesei ķēdes traucējumi ir mediēti citohroma *b* mutāciju dēļ. Tie ir retāk sastopami traucējumi, kas atdarina ar glikogēnu uzglabāšanas saistīto slimību simptomus. Piemēram, hipoglikēmija, laktacidoze, palielināta kreatinīna kināze un urīnskābe asins serumā. Ir aprakstīti gadījumi, kad trešā kompleksa traucējumu dēļ ir radusies psihomotorā aizture ar ekstrapiramidāliem traucējumiem (Ylikallio & Suomalainen 2012; Nguyen *et al.*, 2018).

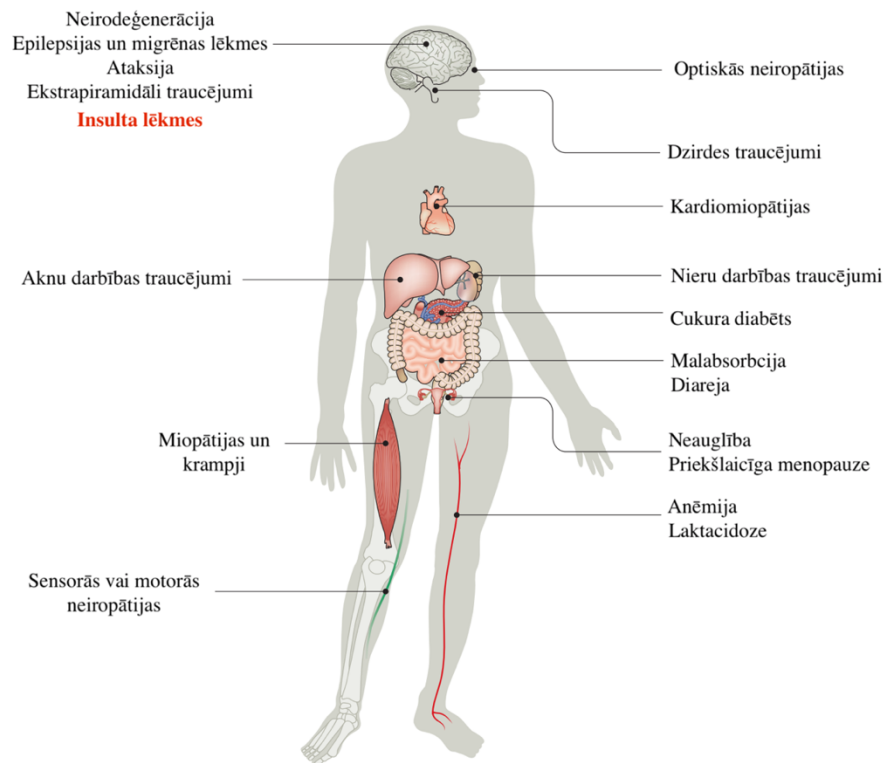
Citohroma *c* oksidāzes (COX) jeb ceturtā elektronu pārnesei kompleksa traucējumi ir mediēti *COXI-3* mutāciju dēļ. Bieži vien traucējumi izraisa vairāku orgānu sistēmu darbības traucējumus un MELAS sindromu jeb mitohondriju encefalopātiju ar laktacidozi un insulta līdzīgām epizodēm (Ylikallio & Suomalainen 2012; Molnar & Kovacs 2018).

Gan nDNS, gan mtDNS mutācijas var ietekmēt OXPHOS mašīnērijas noslēdzošo kompleksu. Pēdējais komplekss, kas sastāv no F₁F₀- veida ATF sintāzēm, kur F₁ subvienību kodē nDNS, bet F₀ – mtDNS, tieši mtDNS mutāciju rezultātā rodas pēdējā kompleksa traucējumi. Klīniskā simptomātika ir līdzīga Leiga sindroma izpausmēm, tostarp novēro dažādas miopātijas, ataksiju, *retinitis pigmentosa* un citas patoloģijas (Ylikallio & Suomalainen 2012; Molnar & Kovacs 2018; Nguyen *et al.*, 2018).

1.4.1. Sekundārās mitohondriālās slimības

Sekundārās mitohondriālās slimības nav ģenētiski predisponētas. Eksistē korelācija starp ģimenē iedzimtām slimībām un šo slimību specifisku ietekmi uz mitohondrijiem, t.s., nepārmantotie mitohondriju traucējumi (Niyazov *et al.*, 2016; Kanungo *et al.*, 2018).

Sekundārie traucējumi ietekmē dažādus intracelulāros mitohondriju mehānismus. Līdzīgi kā primāro jeb iedzimto traucējumu gadījumā, tiek traucēta sekmīga ATF ģenerēšana, papildus tiek ietekmēts mitohondriju fragmentēšanās un saplūšanas process. Šo darbības mehānismu izmaiņas mediē multifaktoriālas slimības, piem., cukura diabēts (CD), KSS, audzēji, nieru darbības traucējumi, epilepsija, autoimūnas slimības, kā arī neurodeģeneratīvas un neiromuskulāras slimības (skat. 1.4.1. att.) (Niyazov *et al.*, 2016).



1.4.1. att. Iedzimto (primāro) un sekundāro mitohondriālo slimību izraisītas manifestācijas (ar izmaiņām no: Suomalainen & Battersby 2018)

Viena no visbiežāk sastopamo sekundāro slimību grupām ir neiromuskulārās pārvades slimības. Grupā ietilpst dažādas muskuļu atrofijas, iekaisuma reakciju mediētas miopātijas, kā arī zāļu vielu inducētas perifērās neiropātijas (Diezi *et al.*, 2013; Niyazov *et al.*, 2016). Zāļu vielas, kas var mediēt mitohondriju bojājumus, galvenokārt, pieder pie ļaundabīgo audzēju ķīmijterapijas grupas zālēm. Piemēram, bortezomibs un talidomīds izraisa mitohondriju disfunkciju aksonos, jo zāļu vielas mediē Ca^{2+} jonu izdalīšanos, kas attiecīgi turpmāk sekmē apoptozes iestāšanos (Jones *et al.*, 2019).

Autoimūnu slimību gadījumā organisms patērē milzīgu enerģijas daudzumu. Patērēto enerģijas daudzumu vērs pret pašu sevi. Sistēmiskās sarkanās vilkēdes gadījumā novēro antimitohondriālo antivielu klātbūtni, piem., mitohondriju funkcionēšanai vitāli nepieciešamā kardiolipīna antivielas (ACA), kas rezultātā ietekmē gan enerģijas ģenerēšanu, gan apoptozes iestāšanos (Niyazov *et al.*, 2016).

Cerebrāla infarkta gadījumā mitohondriju bojājumi rodas neizbēgami. Bojājumi veidojas secīgu reakciju rezultātā, kas ietver sevī brīvo radikāļu hiperekspresiju, kalcija jonu akumulāciju, traucētu mitohondriju bioģenēzi, un ATF izsīkumu (He *et al.*, 2020).

1.4.2. Mitohondriālo slimību ārstēšanas iespējas

Pašlaik nav pieejama zāļu vielu vai cita veida terapija, kas spētu izārstēt mitohondriālās slimības. Ir atklāti un brīvi pieejami savienojumi, kas spēj mazināt slimību izraisītu simptomātiku (McFarland *et al.*, 2010; Niyazov *et al.*, 2016; Weissig 2019).

Mitohondriālo slimību terapijas izstrādē visvairāk pievērš uzmanību jau iepriekš zināmām zāļu vielām un to kombinācijām, kas nākotnē varētu ārstēt slimības (skat. 1.4.2. att.).



1.4.2. att. Mitohondriālo slimību klīnisko pētījumu diagramma (ar izmaiņām no: Weissig 2019)

Ir zināms, ka pašlaik kopumā no 49 klīniskajiem pētījumiem 10 pētījumi ir trešās fāzes stadijā. Savukārt no 10 trešās fāzes pētījumiem tikai viens pētījums ir noslēdzies, pētījumā apskatot, elamipretīdu. Chatfield *et al.*, grupas pētnieki *ex vivo* pētījumā miokarda šūnās pierādīja to, ka savienojums uzrāda pozitīvas izmaiņas mitohondriju elektronu pārnesei ķēde, t.i., veicina elektronu pārnesei ķēdes kapacitāti. Savienojums, kam nākotnē piemīt potenciāls ar vecuma izmaiņām saistītām slimībām, piem., sirds mazspējas profilaksei vai ārstēšanai (Chatfield *et al.*, 2019; Weissig 2019).

Vienas no visbiežāk administrētām aktīvām vielām, precīzāk, uztura bagātinātājiem, ir antioksidanti, piemēram, niacīns (vit. B₃) 50- 100mg/ 24h devā, riboflavīns (vit. B₂) 100-400mg/ 24h devā, L-karnitīns 30- 120mg/kg/ 24h devā, E vitamīns 200- 400IU/ 24h devā, kā arī gan reducētais, gan oksidētais CoQ10 no 5- 30mg/kg līdz divām reizēm dienā (Niyazov *et al.*, 2016). Pozitīvus rezultātus mitohondriālo slimību, kā piemēram, Lēbera optiskās neiropatijas ārstēšanā ir uzrādījusi gēnu terapijas pielietošana (Weissig 2019).

1.5. Insulta klasifikācija

Insults ir vispārināts un zināms apzīmējums pārsvarā akūtiem CNS smadzeņu asinsrites traucējumiem, kas izraisa šūnu bojāeju un nāvi. Insults ir biežākais invaliditātes un otrs biežākais nāves iemesls, pēc KSS (Sacco *et al.*, 2013; Virani *et al.*, 2020).

Insultu klasificē trīs kategorijās: cerebrāls infarkts jeb išēmisks insults; intracerebrāla hemorāģija jeb asins izplūdums smadzenēs un subarahnoidālā hemorāģija jeb asins izplūdums starp smadzeņu apvalkiem (Karsy *et al.*, 2017; Andrabi *et al.*, 2019).

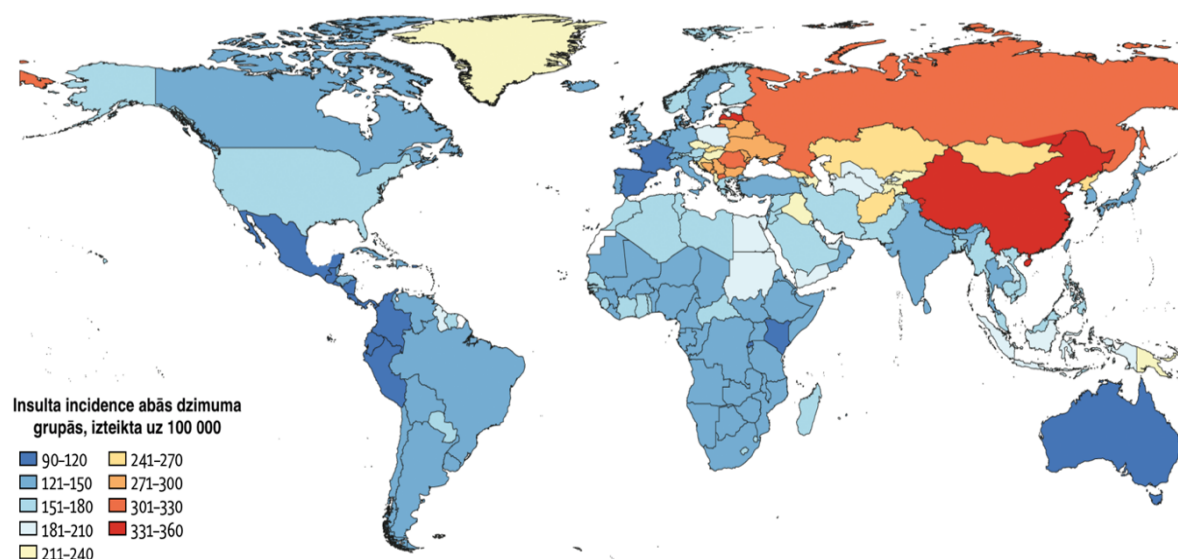
Gadījumā, ja insulta izpausmes ir īslaicīgas, kas pazūd diennakts laikā, un, veicot radioloģiskus izmeklējumus netiek konstatēts perēklains smadzeņu audu bojājums, tad šādu gadījumu apzīmē kā smadzeņu tranzitoru išēmisku lēkmi (TIL) (Sorensen & Ay 2011).

1.6. Insulta epidemioloģija – incidence un prevalence

Insults ir viens no izplatītākajiem invaliditātes un nāves cēloņiem pasaulē. Tiek minēts, ka 2016. gadā insults bija otrs izplatītākais nāves cēlonis pasaulē, t.i., 5,5 milj. gadījumu, sekojot aiz augšgalā esošā pirmā izplatītākā nāves cēloņa - koronārās sirds slimības (KSS). Katru gadu Amerikas Savienotajās Valstīs (turpmāk ASV) išēmisko un hemorāģisko gadījumu skaits sasniedz vismaz 795 000 tūkst. ASV procentuāli lielāko daļu, t.i., 76% veido jaunie jeb pirmreizējie insulta gadījumi, pārējo daļu – atkārtotie gadījumi (Ovbiagele & Nguyen-Huynh 2011; Guzik & Bushnell 2017; Virani *et al.*, 2020).

Jaunākie dati liecina, ka insulta prevalences jeb izplatības rādītāji, kas tiek aprēķināti uz 100 000 tūkst. iedzīvotājiem – samazinās, bet kopējā insulta prevalence cilvēku populācijā saglabājas augsta (Johnson *et al.*, 2019). Ņemot vērā to, ka iedzīvotāju populācija noveco, pašlaik un arī turpmāk jaunattīstības un attīstības valstīs mirstības īpatsvaru veidos hroniskas slimības, līdz ar to, turpmākā insulta prevalence tikai pieaugs (Modig *et al.*, 2019).

Jaunākie pieejamie dati liecina, ka visaugstākā incidence jeb saslimstība – insulta gadījumu skaits noteiktā laika periodā, tika novērota Austrumāzijā, it īpaši Ķīnā 354/ 100 000, apsteidzot saraksta otrajā vietā esošo Austrumeiropas reģionu. Austrumeiropas zemākie incidences rādītāji novēroti Igaunijā 200/ 100 000, savukārt, augstākie – Latvijā 335/ 100 000 (skat. 1.6. att.) (Johnson *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020).



1.6. att. Insulta incidence 2016. gadā absolūtos skaitļos (ar izmaiņām no: Johnson *et al.*, 2019)

Pētot statistikas datus secināts, ka sieviešu populācijā insulta mirstības intensitāte ir zemāka, t.i., 2,6 milj. pret 2,9 milj. vīriešu populācijā. Pasaulē prevalē hemorāģiskas izcelsmes insulta mirstība, zemāka mirstības prevalence novērota išēmiskas izcelsmes insultam, izsakot skaitļos – 2,8 pret 2,7 milj. gadījumu (Roy-O'Reilly & McCullough 2018; Virani *et al.*, 2020).

Literatūras avotos nav pieejamas informācijas par insulta incidenci vai incidences dinamiku Latvijā. Pieejamā informācija liecina, ka Latvijā reģistrē un monitorē cerebrovaskulāro slimību izraisītu mirstības dinamiku gados. Sīkāk apskatot pēdējos atjaunos tos statistikas datus par iedzīvotāju mirstību Latvijā var secināt, ka no cerebrovaskulārām slimībām, kurām ir zināms nāves cēlonis, t.i., intrakraniāla hemorāģija (hemorāģiskas izcelsmes insults) un cerebrāls infarkts (išēmiskas izcelsmes insults) (SSK-10 kods – I60-I69) 2018. gadā absolūtos skaitļos ir miruši 5303 cilvēki (skat. 1.6. tabulu).

Latvijas iedzīvotāju mirstības dinamika absolūtos skaitļos (SPKC, dati atjaunoti 21.06.2019.)

SSK-10 kods	Nāves cēlonis	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
A-Y	Miruši kopā	30081	28550	29058	28690	28207	28188	28214	28458	28520
I60-I69	<i>Cerebrovaskulārās slimības</i>	4660	4371	4796	4887	4874	5109	5345	5423	5303
I60-I64	<i>Insults</i>	2656	2387	2459	2445	2382	2473	2200	2115	2045
I60-I62	<i>Intrakraniāla hemorāģija</i>	606	554	548	551	508	517	458	441	457
I63	<i>Cerebrāls infarkts</i>	1942	1731	1799	1789	1748	1802	1595	1565	1472

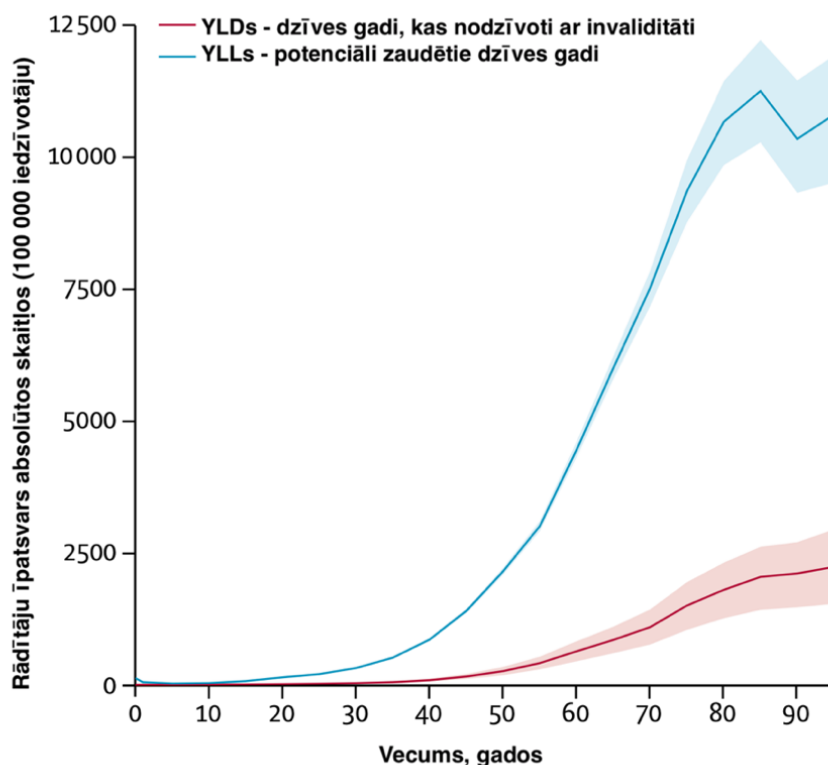
SSK-10 – starptautiskās statistiskās slimību un veselības problēmu klasifikācijas 10. redakcija (vispārpieņemts standartinstrumentis diagnožu kodēšanai)

Salīdzinot ar iepriekšējo gadu, t.i., 2017., kurā nomira 5423 cilvēki, var secināt, ka mirstība no cerebrovaskulārām slimībām 2018. gadā ir samazinājusies par 2,21%. Izsakot skaitliski, no insulta 2018. gadā nomira 2045 cilvēki, no šiem gadījumiem ar diagnosticētu cerebrālu infarktu bojā gāja 1472 cilvēki jeb 76,3%, atlikušo daļu veido intrakraniālās hemorāģijas dēļ bojāgājušo skaits, t.i., 457 cilvēki jeb 23,7% (Slimību profilakses un kontroles centrs (SPKC), 2019).

1.6.1. Insulta izraisītas invaliditātes koriģētie dzīves gadi

Invaliditātes koriģētie dzīves gadi, mēdz teikt – pēc invaliditātes samērotie dzīves gadi jeb saīsināti DALYs (tulkojumā no *disability-adjusted life year*) ir viens no vispārpieņemtiem indikātoriem cilvēka mūža posmu vērtēšanai. DALYs ir viens no svarīgākajiem sabiedrības veselības novērtējuma rādītājiem, kas ļauj tieši izmērīt pārmaiņas situācijā un novērtēt iepriekš izvirzīto mērķu izpildes pakāpi (Johnson *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020).

DALYs sastāv no diviem apakšrādītājiem jeb daļām, tie būtu: dzīves gadi, kas nodzīvoti ar invaliditāti YLDs (tulkojumā no *years lived with disability*), un potenciāli zaudētie dzīves gadi YLLs (tulkojumā no *years of life lost*) (skat. 1.6.1. att). Tā kā insults ir viens izplatītākajiem nāves un invaliditātes cēloņiem pasaulē, DALYs indikātors spēj tieši palīdzēt izmērīt pārmaiņas un/ vai izmaiņas, sekmējot populācijas veselības turpmāku saglabāšanu un uzlabošanu (Avan *et al.*, 2019; Hathidara *et al.*, 2019).



1.6.1. att. Sabiedrības veselības novērtējuma rādītāju salīdzinājums abās dzimuma grupās, cēlonis – insults (ar izmaiņām no: Johnson *et al.*, 2019)

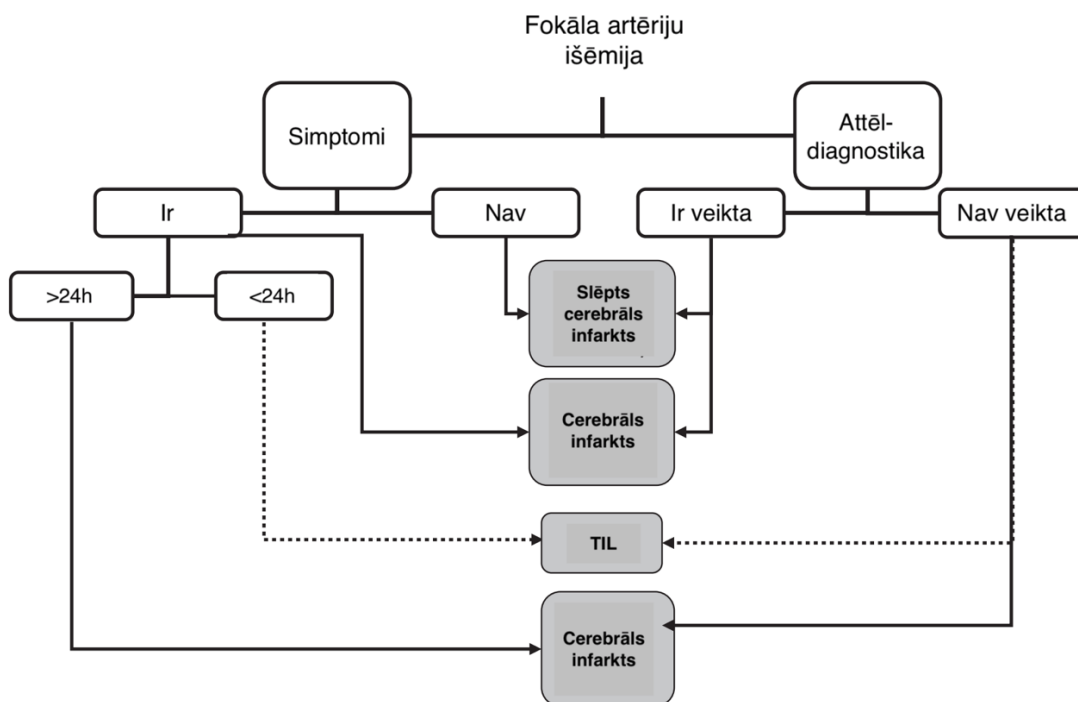
Statistikas dati liecina, ka insults ir otrais biežākais DALYs (invaliditātes koriģētie dzīves gadi) ietekmētājs pasaulē, izsakot skaitļos – 116,4 milj., piemēram, salīdzinot ar 1990. gada pieejamiem datiem, DALYs pieaudzis par 21,1 milj. (+18,1%). Novēro tendenci, ka sievietēm ir zemāki DALYs (50,8 milj.), nekā vīriešiem (65,6 milj.).

Viszemākie gan YLDs, gan YLLs rādītāji noteikti vecuma grupā līdz 40 gadiem, bet nākamo piecu līdz desmit gadu laikā novēro strauju YLLs jeb potenciāli zaudētu dzīves gadu rādītāja kāpumu augstās insulta mirstības dēļ (skat. 1.7.1. att.) (Johnson *et al.*, 2019).

1.7. Cerebrāls infarkts

Cerebrāls infarkts ir viens no visbiežāk sastopamajiem cerebrovaskulāro notikumu veidiem. Bieži vien to identificē ar jēdzienu išēmisks insults. Cerebrāls infarkts tiek diagnosticēts aptuveni 87% gadījumu no visiem hospitalizētiem gadījumiem. Savukārt, 13% veido hemorāģiskas izcelsmes insulta gadījumu skaits (Virani *et al.*, 2020).

Klīniski cerebrālo infarktu apzīmē ar pierādītu smadzeņu audu fokālu, t.i., perēkļainu bojājumu (Amarenco *et al.*, 2009; Sacco *et al.*, 2013; Avan *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020). Bojājums balstās uz zināmu simptomu un klīnisko sindromu izpausmēm vienas diennakts laikā, izņemot citus etioloģiskus faktorus (skat. 1.7. att.).



1.7. att. Cerebrovaskulāra notikuma noteikšanas shēma (ar izmaiņām no: Sacco *et al.*, 2013)

Visbiežāk par infarkta iemeslu kalpo kāda smadzeņu asinsvada nosprostošanās, kas rezultējas ar asins piegādes traucējumiem. Pārsvarā cerebrāla infarkta notikums ir akūts, retākos gadījumos var būt hronisks (Sacco *et al.*, 2013; Avan *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020).

Cerebrālo infarktu klasificē vairākos apakštipos atbilstoši pēc iespējamā smadzeņu audu bojājuma iemesla. Visbiežākais apakštips ir aterotrombotisks jeb nekardioembolisks cerebrālais infarkts, otrs – kardioembolisks infarkts, savukārt trešais visbiežākais – lakunārs infarkts.

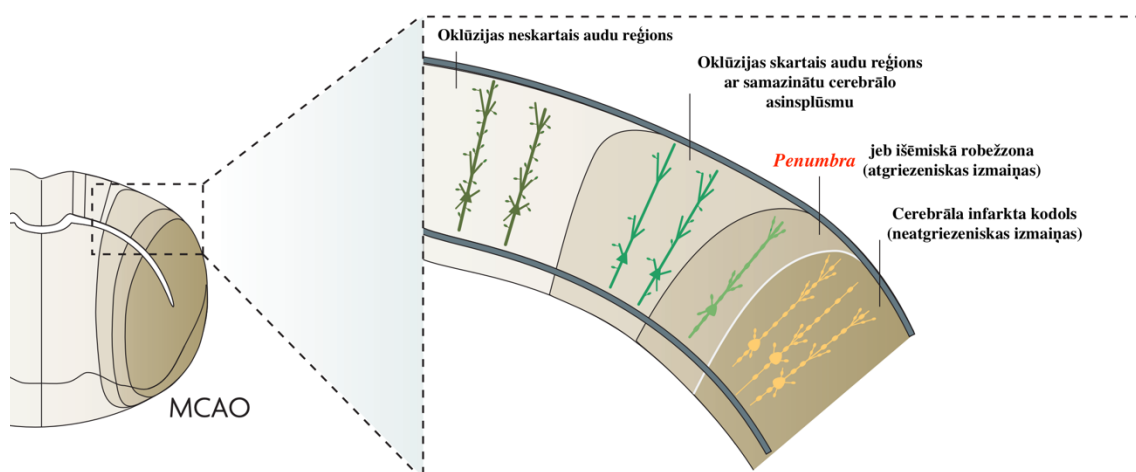
1.7.1. Cerebrālā infarkta kaskāde

Cerebrāls infarkts var veidoties gadījumā, ja tiek traucēta nepārtraukta asins apgāde audos. Visbiežāk tam par iemeslu kalpo daļējs asinsvadu nosprostošanās vai smagos gadījumos – asinsvadu oklūzija. Samazināta cerebrālā asinsplūsma izraisa skābekļa un barības vielu trūkumu jeb hipoksiju, kas sekmē homeostāzes līdzsvara izmaiņas, un, kas galu galā rezultējas ar šūnu nāvi (Russo *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2018).

Vispirms, pēc cerebrovaskulāra notikuma, t.i., cerebrālā infarkta centrālajā daļā jeb serdē notiek neatgriezeniskas izmaiņas – iestājas audu nekroze. Par potenciāli dzīvotspējīgu audu zonu uzskata išēmisko robežzonu jeb *penumbra*, kas tulkojumā no latīņu valodas būtu “pusēna” (skat. 1.7.1.1. att.).

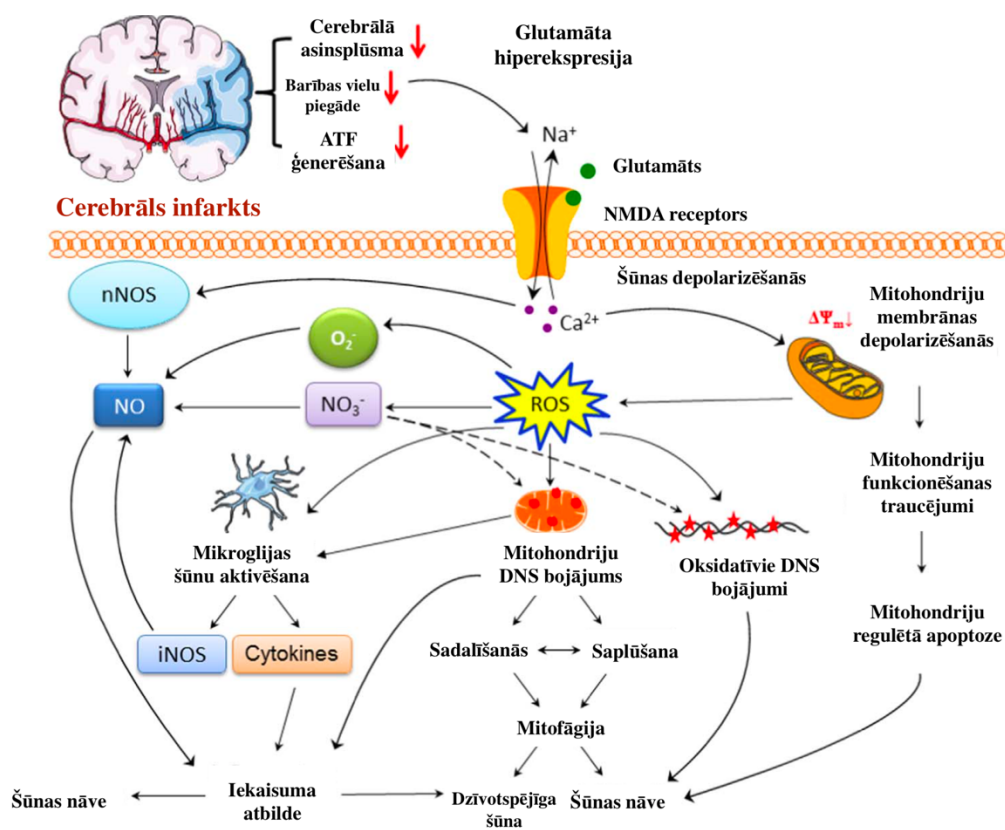
Penumbra zonā krasi samazinās, bet tomēr saglabājas asinsplūsma, kas ļauj uzturēt šūnu metabolismam nepieciešamo izejvielu piegādi un sekojošu dzīvotspēju (Fan *et al.*, 2017; Karsy *et al.*, 2017; Andrabi *et al.*, 2019).

Pēc absolūta ATF izsūkuma notikuma kodolā un bloķētas Na^+/K^+ jonu apmaiņas novēro šūnu depolarizēšanos. Šūnu depolarizēšanās (homeostāzes sabrukums) izraisa Ca^{2+} jonu ieplūšanu šūnās. Kalcija jonu ieplūšana iniciē intracelulārajā telpā esošo atgriezenisko-programmējamo un kontrolējamo šūnu nāvi jeb apoptozi, vai arī neatgriezenisko- pasīvo un nekontrolējamo šūnu nāvi jeb nekrozi (skat. 1.7.1.2. att.) (Karsy *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018).



1.7.1.1. att. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ierosināta cerebrālā infarkta skarto zonu attēlojums (ar izmaiņām no: Murphy & Corbett 2009)

Cerebrāls infarkts ievērojami palielina brīvo radikāļu veidošanās intensitāti. Kritiskā oksidatīvā stresa apstākļos pastiprināti veidojas brīvo radikāļu molekulas. Mitohondriju šūnu membrānas depolarizējas un, brīvajiem elektroniem nokļūstot ārpusē, tie sāk reaģēt ar šūnas citoplazmā esošo molekulāro skābekli, ģenerējot superoksīda radikāļus (O_2^-). Jaunizveidotie superoksīda radikāļi tūlītēji reaģē ar slāpekļa (II) oksīdu, veidojot peroksinitrātus (NO_3^-). Savukārt peroksinitrāti sekmē citotoksisku hidroksilradikāļu (OH^-) veidošanos, kas galu galā ietekmē proteīnu, lipīdu un DNS struktūru izmaiņas (skat. 1.8.1.2. att.) (Tang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2018; Zille *et al.*, 2019).



1.7.1.2. att. Cerebrālās išēmijas kaskādes shematisks attēlojums (ar izmaiņām no: Yang *et al.*, 2018)

Jaunizveidotie brīvie radikāļi un Ca^{2+} jonu hiperekspresija šūnas iekšienē pastiprina iekaisuma mediatoru, t.i., citokīnu, piem., interleikīna-1 un -6; tumornekrozes faktora- α izdalīšanos. Papildus pastiprina arī hemokīnu, piem., interleikīna-8, kā arī dažādu hemoatraktantu (MCP-1) izdalīšanos. Tostarp, papildus pastiprina šūnu (monocītu, leikocītu, limfocītu u.c.) adhēziju veicinošo intercelulāro (ICAM-1), gan vaskulāro (VCAM-1) mediatoru izdalīšanos (Karsy *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Andrabi *et al.*, 2019).

Cerebrāla infarkta gadījumā mitohondriju darbības traucējumi rodas neizbēgami. Traucējumi veidojas secīgu izmaiņu rezultātā, kas ietver pastiprinātu oksidatīvo stresu, absolūtu enerģijas ģenerēšanas sabrukumu, kaskādes beigās iedarbinot, kaspāžu atkarīgo (citohroma *c*) vai neatkarīgo (apoptozes- inducētā faktora) šūnu nāvi (Russo *et al.*, 2018; Andrabi *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020).

1.8. Pašreizējās iespējas un nākotnes vīzijas cerebrāla infarkta ārstēšanā

Akūta cerebrālā infarkta gadījumā kā pirmās izvēles terapija pacientiem ir audu plazminogēna aktivatora (tPA) jeb trombolīzes nozīmēšana (Kernan *et al.*, 2014; Karsy *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Kim 2019). tPA pieder pie antitrombotisko līdzekļu grupas, kas spēj saistīties ar tromba (asins recekļa) fibrīnu un selektīvi konvertēt ar trombu saistīto plazminogēnu par plazmīnu, sašķeļot tromba fibrīna matricu. Audu plazminogēna aktivatora pielietošana būs rezultatīva gadījumā, ja šo terapiju pielietos nākamo četru līdz piecu stundu laikā pēc notikuma, pretējā gadījumā, terapijas efektivitāte būs minimāla. Diemžēl komplikāciju dēļ, pirmās izvēles terapijai ir šaurs terapeitiskais logs. Viena no nopietnākajām komplikācijām pēc trombolīzes veikšanas ir intrakraniāla hemorāģija vai sistēmiska asiņošana (Kaur *et al.*, 2013; Kernan *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2018; Kim 2019). Apskatot pieejamo informāciju Latvijas Zāļu reģistrā var secināt, ka Latvijā ir pieejami divi tPA preparāti, t.i., Actilyse (*alteplasum*) 50mg pulveris ar šķīdinātāju un Metalyse (*tenecteplasum*) gan 8000, 10000V devā (ZVA, 2020).

Otrās izvēles terapijā ietilpst mehāniska trombektomija, kas ļauj evakuēt izveidojušos trombu no artērijas (Kelly *et al.*, 2016). Visaugstākā manipulācijas efektivitāte tiks sasniegta tad, kad to veiks nākamo 6 stundu laikā pēc notikuma. Trombektomijas pielietošanas laika logs-laika periods ir vidēji par divām stundām plašāks (Yang *et al.*, 2017; Andrabi *et al.*, 2019; Motyer *et al.*, 2018; Kim 2019).

Pēdējās desmitgades laikā popularitāti ieguvuši zāļu un zāļu vielu izpētes modeļi, kas varētu un ļautu mazināt akūta cerebrāla infarkta izpausmes un turpmākas manifestācijas. Šobrīd tiek akceptēti vairāki cerebrālā infarkta ārstēšanas savienojumi, tā saucamie tPA- helperi, kas gan pre-klīniski, gan klīniskos modeļos uzrāda pozitīvus administrēšanas rezultātus (Kim 2019). Jāpiebilst, ka savienojumi tika pielietoti kopā ar tPA, lai mazinātu trombolīzes izraisīto neirotoksicitāti. Klīniskos pētījumos pozitīvus rezultātus uzrādīja: ro-kināzes inhibitora fasudila; sfingozīna-1 fosfātu receptoru (ar G proteīnu saistītais receptors, imūnmodulators) modulātoru fingolimoda; CD49d monoklonālās antivielas natalizumaba un selektīva 5-HT_{1A} receptoru agonista repinotāna administrēšana (Karsy *et al.*, 2017; Kim 2019).

1.9. Pašregulācijas mehānismi cerebrāla infarkta gadījumā

Pacientiem, kas pārcietuši CI notikumu novēro manāmu un vērā ņemamu- spontānu organisma funkciju atjaunošanos. Bieži vien, nākamo nedēļu laikā veselības stāvoklis strauji uzlabojas. Šo laika nogriezni mēdz dēvēt par akūto funkciju atjaunošanās fāzi. Pēc pārciestā notikuma atgūtās funkcijas bieži vien ir nepietiekamas, kas neatbilst tām funkcijām un spējām, kuras piemita pacientam pirms CI notikuma (Arai *et al.*, 2011; Lackland *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019).

Pēc akūtās funkciju atjaunošanās fāzes seko hroniskā fāze, kuras laikā novēro krasi samazinātu organisma funkciju turpmāku atjaunošanos (Caleo 2015; Hylin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

Spontānā (akūtā fāze) organisma funkciju atjaunošanās, kas pamatojas uz neiroloģisko funkciju atjaunošanos smadzeņu audos liecina, ka tiek iedarbināti kompensatorie mehānismi, taču tie ir ierobežoti un īslaicīgi. Uzska, ka ilgtermiņā (hroniskā fāze) neiroloģisko funkciju atjaunošanos sekmē neirālās regulācijas jeb reflektorās regulācijas pastiprināta darbība dzīvajos audos, lai kompensētu notikuma skarto zonu (*penumbra*) darbību (Hylin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

1.9.1. Cerebrālā plasticitāte

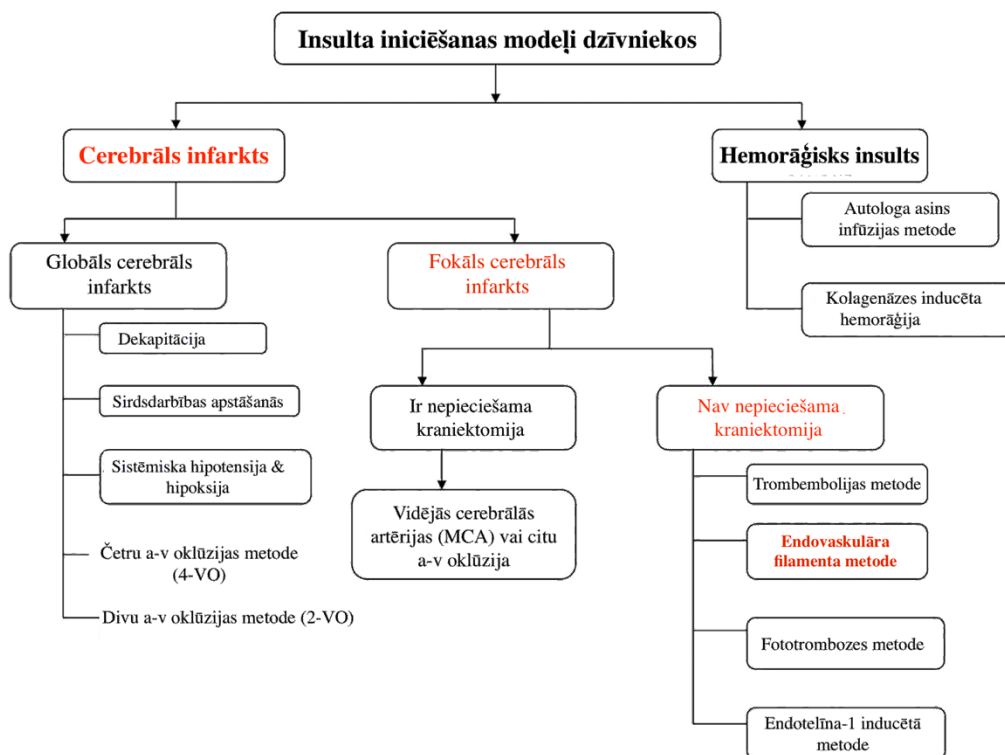
CI notikuma gadījumā CNS smadzenēs tiek iedarbināts audu remodelēšanas jeb pārveidošanas process. Mērķis ir pēc iespējas ātrāk atjaunot bojājuma vietu un kompensēt zaudētās funkcionēšanas spējas (Loubinoux *et al.*, 2017). Mērķa sasniegšanai tiek izmantoti divi darbības mehānismi – audu atjaunošanas un kompensācijas jeb audu aizstāšanas mehānisms (Zhang & Chopp 2015; Hylin *et al.*, 2017; Loubinoux *et al.*, 2017).

Audu atjaunošanas darbības procesā ietilpst smadzeņu audu funkcionalitātes atjaunošana vai pretējā gadījumā – funkcionalitātes zaudēšana. Savukārt, kompensatoro mehānismu darbības procesā ietilpst daļēja funkcionalitātes atjaunošana, kas balstās uz citu smadzeņu rajonu atbildes reakciju, t.i., tā pati *penumbra* vai citi distāli (notikumam attālinātie) un/ vai kontralaterāli (notikumam pretējie) rajoni (Arai *et al.*, 2011; Hylin *et al.*, 2017; Loubinoux *et al.*, 2017). Kompensatorie mehānismi daļēji atjauno smadzeņu audu funkcionalitāti. Daļēju atjaunošanos jeb neiroloģisko deficītu sekmē epilepsijas lēkmju, spasticitātes (paaugstināta tonusa) un sinkinēzes (sīku kontrakciju) izpausmes (Loubinoux *et al.*, 2017).

Cerebrālās plasticitātes pamatmehānismi ir atkarīgi no atbildes reakcijas ātruma, t.i., iepriekš minētām fāzēm – akūtās un hroniskās. Akūto fāzi raksturo spontāna atbildes reakcija pēc notikuma, mēdz definēt arī par adaptīvo plasticitāti (Zhao & Willing 2018). Spontānā atbilde ir atkarīga no *diaschisis* apjoma, sākotnēji skartā/ skarto rajonu spējas reaktivizēties, mediatoru hiperaktivitātes, kā arī pats būtiskākais: divu veidu ģenēzēm, t.i., angioģenēzes notikuma vietā, un neuroģenēzes (glioģenēzes, oligodendroģenēzes un sinaptoģenēzes) (Moskowitz *et al.*, 2010; Arai *et al.*, 2011; Loubinoux *et al.*, 2017). Pēc CI notikuma žurkām cerebrālā plasticitāte sasniedz savu maksimumu, kapacitātes spējas, vidēji pēc 30 dienām, savukārt cilvēkam cerebrālā plasticitāte tiks izsmelta teju divu mēnešu laikā (Loubinoux *et al.*, 2017).

1.10. Insulta iniciēšanas modeļi jeb insulta pirmsklīniska modelēšana

Attīstoties jaunajām tehnoloģijām un zinātnei, ir attīstījušies pētījumos pielietotie eksperimentu modeļi. Insulta iniciēšanas jeb insulta pirmsklīniskos modeļus pielieto arvien vairāk. Modeļu izmantošana un pielietošana pētījumos ir ļāvusi identificēt dažādu patofizioloģisku procesu izmaiņas, dažādu specifisku reakciju kaskāžu secīgumu, kā arī, gan bioķīmisko, gan molekulāro mehānismu izmaiņas smadzeņu audos (Fluri *et al.*, 2015; Kumar & Gupta 2016; McCabe *et al.*, 2018).



1.10. att. Insulta iniciēšanas metodes (ar izmaiņām no: Kumar & Gupta 2016)

Insulta pirmsklīniskai modelēšanai ir būtiska nozīme. Piemērota, precīza un racionāla modeļa izveide un turpmākā izvēle var kalpot par pamatu specifiskas terapijas izstrādei un testēšanas iespējām (Herson, Traystman 2014; Kumar & Gupta 2016). Katram insulta veidam, t.i., cerebrālam infarktā un hemorāģiskam insultam, ir vairāki iniciēšanas modeļi (skat. 1.10. att.) (Macrae, 2011; Kumar & Gupta 2016).

Katram no šiem pētījumu praksē pielietotajiem insulta iniciēšanas modeļiem piemīt arī izmantošanas ierobežojumi. Katram modelim ir priekšrocības un pētījumu ierobežojumi (Casals *et al.*, 2011; Kumar & Gupta 2016; Sommer 2017; McCabe *et al.*, 2018).

1.10.1. Cerebrālā infarkta iniciēšanas modeļi

Cerebrāla infarkta iniciēšana ir atkarīga no tā, kāds ir pētījuma mērķis. Lai izraisītu globālu cerebrālu infarktu, pētījumā var pielietot (skat. 1.10. att.):

1. dekapitāciju jeb galvas atdalīšanu no ķermeņa – absolūti novecojusi, bet viena no vienkāršākajām metodēm, lai acumirkli izraisītu neatgriezenisku globālu išēmiju;
2. sirdsdarbības apstāšanos – diez gan novecojusi un komplicēta metode ar paaugstinātu pētāmo dzīvnieku nāvi;
3. sistēmisku hipotensiju ar hipoksiju – tiek sasniegts asinsspiediens 20-30mmHg un inducēts hipoksijas stāvoklis, izmantojot 4% O₂ un 96% N₂, metodei zema rezultātu atkārtotamība;
4. četru asinsvadu oklūzijas metode (4-VO) – sarežģīta metode, kuras procesā dzīvnieks netiek anestezēts;
5. divu asinsvadu oklūzijas metode (2-VO) – ja salīdzina ar iepriekšējo metodi, tad šī metode ir vienkāršāka, bet galvenais metodes trūkums ir hipotensijas inducēšana (Fluri *et al.*, 2015; Kumar & Gupta 2016; Sommer 2017; McCabe *et al.*, 2018).

Savukārt, ja pētījuma mērķis ir fokāla cerebrālā infarkta iniciēšana, tad nepieciešamības gadījumā izvērtē vai būs jāpielieto kraniotomija – ar vai bez kraniektomijas. Gadījumā, ja nav nepieciešama kraniotomija (visbiežāk), tad pētījumā var pielietot (skat. 1.10. att.):

1. trombemboliju – bieži vien izmanto autologus (saimniekorganisma) trombus, tos ievadot ekstrakraniālos asinsvadus, citos gadījumos izmanto sīkas mikrosfēras, kas inducē lokālas išēmijas iestāšanos;
2. endovaskulāru filamentu – visbiežāk pielietotā, salīdzinoši mazinvasīva metode, kuras pamatā ietilpst smalkas šķiedras jeb filamenta ievietošana miega artērijā, šķiedrai nokļūstot līdz vidējai cerebrālajai artērijai (MCA), tiek nosprostots asinsvads, samazinās cerebrālā asinsplūsma un rezultātā tiek izraisīts cerebrāls infarkts;

3. fototrombozi – ievadot specifisku gaismas jutīgu vielu, piem., eritrozīnu B vai Bengālijas rozā krāsvielu, to apstarojot, lokāli izveido cerebrālu infarktu;
4. endotelīna-1 (ET-1) inducēto metodi – tiek izmantots retardētas darbības vazokonstriktīvs peptīds, kas ierosina lokālu asinsvadu sašaurināšanos, metodei ir izteikts trūkums – gan ET-1 receptori, gan ET-1 konvertējošie enzīmi ir ekspresēti neironos un astrocītos, līdz ar to var tikt ietekmēta turpmākā neiroloģiskā deficīta interpretācija (Fluri *et al.*, 2015; Kumar & Gupta 2016; Sommer 2017; McCabe *et al.*, 2018).

Pētījumos izmantotie cerebrālā infarkta iniciēšanas modeļi spēj uzrādīt vēlamos rezultātus un izpildīt izvirzītos pētījumu mērķus. Pārsvarā visi modeļi tiek veikti veselos, t.i., iepriekš manipulācijām nepakļautos dzīvniekos, respektīvi, bez komorbiditātes (Macrae 2011; Mergenthaler & Meisel 2012; Caleo 2015; Fluri *et al.*, 2015; Kumar & Gupta 2016; McCabe *et al.*, 2018).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Izmēģinājuma dzīvnieki un pētījuma ētika

Pētījumu veica Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedras laboratorijā. Pētījumā tika izmantoti C57BL/6NHsd peļu tēviņi (*Envigo* izmēģinājuma dzīvnieku audzētava, Nīderlande). Izmēģinājuma dzīvnieki tika turēti Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Dabaszinātņu Akadēmiskā centra *in vivo* laboratorijas individuāli ventilējamās būros. Katrā būrī bija 9 līdz 10 peļu tēviņi ar brīvu pieeju specializētai grauzēju barībai (*Altromin* granulas un pulveris mīkstās barības pagatavošanai) un dzeramajam ūdenim. Telpās uzturēja $21 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūru un 50-60% relatīvā gaisa mitrumu. Dzīvnieku turēšanas telpā nodrošināja 12 stundu dienas- nakts ciklu (gaismas ieslēgtas 07:00). Pirms pētījuma uzsākšanas dzīvniekiem tika piemērots 7 dienu ilgs adaptācijas periods telpām.

Izmēģinājuma dzīvnieku procedūras un manipulācijas veica saskaņā ar Eiropas Savienības Direktīvas 2010/63/EU vadlīnijām “*On the protection of animals used for scientific purposes*”, MK noteikumiem Nr. 1131 “Noteikumi par izmēģinājumu dzīvnieku audzētāju, piegādātāju un lietotāju reģistrāciju, kārtībā, kādā veicamas darbības ar izmēģinājumu dzīvniekiem un izmēģinājumu dzīvniekiem nodrošināmās labturības prasības”, kā arī, saskaņā ar Latvijas Universitātes Zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku labturības komisijas rekomendāciju Nr.2018/12/11, un saskaņā ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterinārā dienesta izmēģinājuma dzīvnieku ētikas komitejas atļauju Nr. 100.

2.2. Materiāli un reaģenti

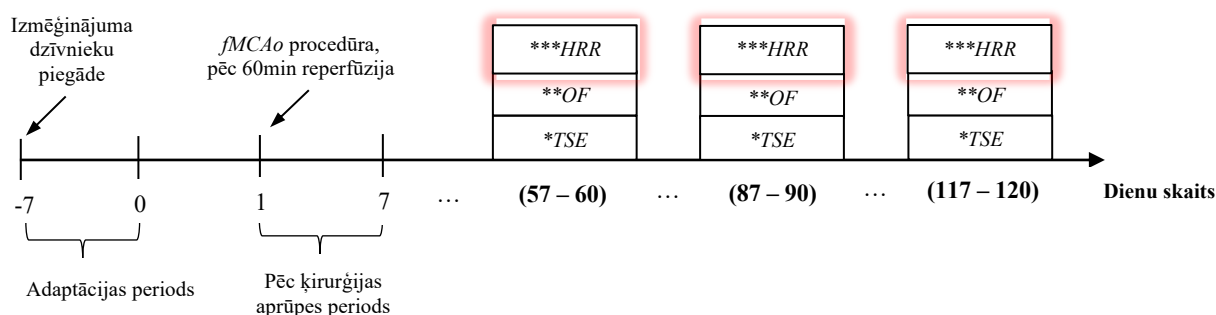
Pētījumā tika izmantoti sekojoši reaģenti buferšķīduma MiRO_5 (*respiration medium*) pagatavošanai: *ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA), bezūdens magnija hlorīds, laktobionskābe, taurīns, monokālija fosfāts, *4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid* (HEPES), D-saharoze, *bovine serum albumin* (BSA), kālija hidroksīds. Visi uzskaitītie reaģenti iepirkti no *Sigma-Aldrich*, ASV.

Reaģenti darba protokola, t.i., substrātu- atjūdzēju- inhibitoru titrēšana, (SUIT-001/008) veikšanai: glutamīnskābe, L- oksidzintarskābe, L- pirovīnogskābe, dzintarskābe, citohroms *c*, adenožīndifosfāta kālija sāls, glicerolfosfāts, *carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone* (CCCP), rotenons, antimicīns A (skat. pirmo pielikumu). Uzskaitītie reaģenti iepirkti no *Sigma-Aldrich*, ASV, izņemot adenožīndifosfāta kālija sāls, kas tika iegādāts no *Merck*, Vācija.

2.3. Pētījuma dizains un eksperimentālās grupas

Vidējās cerebrālās artērijas oklūziju ar endovaskulāro monofilamentu veica 10 – 12 nedēļas veciem pelu tēviņiem. Pētījuma dzīvnieki tika iedalīti divās grupās, kas tālāk apzīmētas kā *Sham* un *fMCAo*. Dzīvnieku skaits grupā: 10 līdz 14 dzīvnieki. *fMCAo* grupas pelēm, izmantojot silikona pārklātu monofilamentu jeb šķiedru, veica vidējās cerebrālās artērijas oklūziju, savukārt *Sham* (nosacīti kontroles grupa) grupas pelēm netika veikta artērijas oklūzija. Izmēģinājuma dzīvniekiem veica uzvedības testus un mitohondriju funkcionalitāti novērtēja ar O₂k oksigrāfiem, pielietojot augstas izšķirtspējas skābekļa patēriņa noteikšanas metodi (HRR).

2.3. attēlā ir attēlots ilgtermiņa pētījuma shematiskais dizains.



2.3. att. Ilgtermiņa pētījuma shematiskais attēlojums, autora veidots attēls

Apzīmējumi:

*OF- *open field* jeb atklātā lauka tests

**TSE- TSE PhenoMaster system jeb dzīvnieku uzvedības reģistrācijas iekārta

***HRR- *high-resolution respirometry* jeb augstas izšķirtspējas skābekļa patēriņa noteikšana

2.4. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzija ar monofilamentu

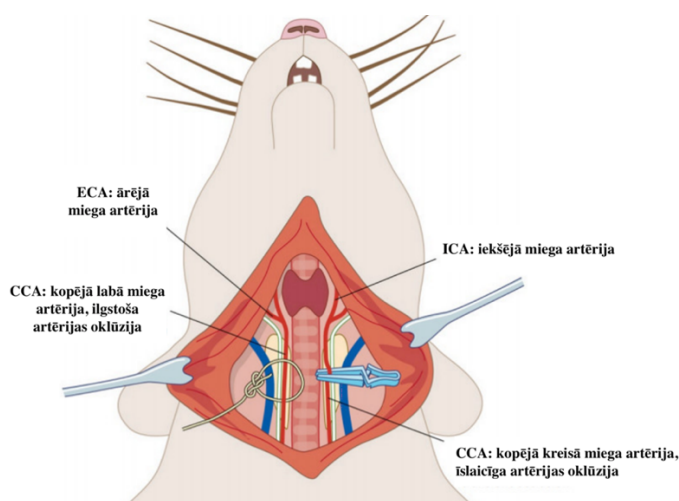
Pirms insulta procedūras uzsākšanas pele tiek nosvērta. Ķirurģiju uzsāk, ja peles svars ir sākot no 18 – 21g. Vismaz 30min pirms operācijas sākuma pelei ievada s.c. 5mg/kg/pelei 100μL karprofēna un s.c. 0,1mg/kg/pelei buprenorfīna. Dzīvnieku ievieto anestēzijas indukcijas kambarī (30% O₂ un 70% N₂O (0,3L/min O₂ un 0,7L/min N₂O), un pievada 4% izoflurāna. Insulta procedūras laikā, pelei turpina uzturēt 1,8 – 2,0% izoflurāna anestēziju.

Ja procedūras laikā novēro elpošanas nomākumu (elpošana kļūst seklāka, peles krūškurvis nevienmērīgi saraujas vai elpošanu apstājas), tad samazina vai pilnīgi pārtrauc anestēzijas padevi, pievada skābekli un viegli masē peles kaklu.

Ķirurģiskās procedūras laikā pele atrodas uz ķermeņa temperatūru uzturoša apsildāmā elementa. Šī sistēma monitorē peles ķermeņa temperatūru, lai novērstu hipotermijas risku ķirurģijas laikā. Lai izvairītos no acu sausuma, operācijas sākumā uz tām uzsmērē *Bepanthen* acu ziedi.

Ķirurģiju uzsāk veicot longitudinālu ādas griezumu jeb ādas garengriezumu galvas kreisajā pusē deniņu rajonā. Ar šķērēm pārgriež galvas ādas kroku, līdz saredz galvaskausu. Ar skalpeli atstumj *m.temporalis* (deniņu muskuli), starp galvaskausa kaulu un muskuli izveido kabatu. Izveidotajā kabatā ievieto elastīgu lāzera doplera zondi, tā, lai zonde atrastos virs vidējās cerebrālās artērijas bifurkācijas jeb sazarošanās zonas. Izmantojot līmi fiksē zondes atrašanās vietu. Ar zondes palīdzību nepārtraukti monitorē cerebrālo asinsplūsmu (*rCBF*).

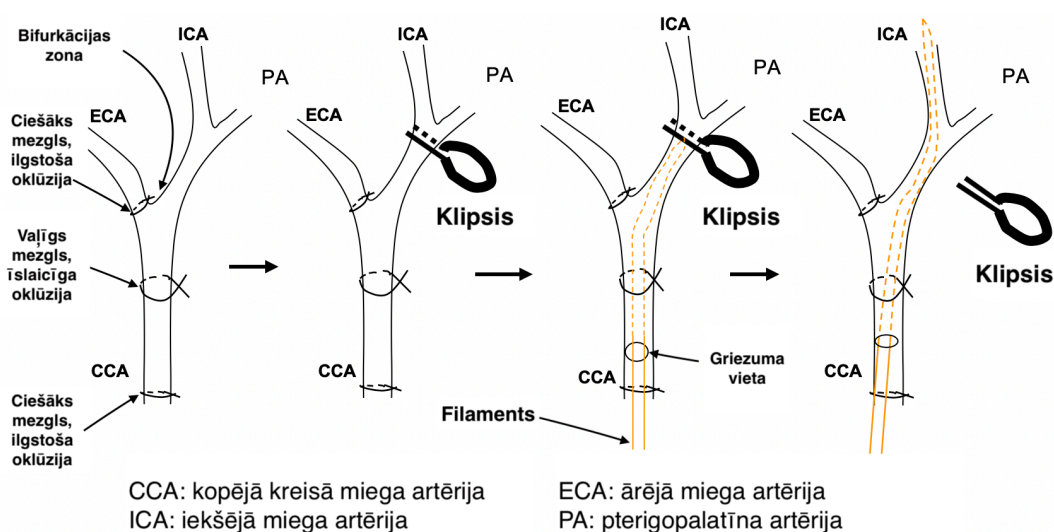
Kakla vidusdaļā veic garengriezumu, atsedz un nošķir kopējo kreiso miega artēriju jeb *arteria carotis communis (CCA)* un tās atzarojumus: ārējo miega artēriju *arteria carotis externa (ECA)* un iekšējo miega artēriju jeb *arteria carotis interna (ICA)* (skat. 2.4.1. att.).



2.4.1. att. Kopējās kreisās miega artērijas īslaicīga oklūzija ar sekojošu vidējās cerebrālās artērijas oklūziju, attēlam ilustratīva nozīme (ar izmaiņām no: Wayman *et al.*, 2016)

Vispirms nosprosto *CCA*, gadījumā, ja cerebrālā asinsplūsma samazinās uz pusi, t.i., 50%, divu minūšu laikā pēc nosprostošanas, tad peli neiekļauj eksperimentā. Nākamajā solī nosprosto *ECA*, izmantojot 7-0 zīda diega pavedienu, atkārtoti nosprosto *CCA* (tiek izveidots vaļīgāks mezgls, skat. 2.4.1.2. att.), kā arī ņem un pievieno klipsi *ICA* (skat. 2.4.2. att.). Nākamajā solī starp nosprostoto *CCA* un vaļīgā mezgla zonu izveido smalku griezumumu.

Griezumā ievieto smalku ar silikona pārklātu 8-0 intraluminālu filamentu, tā, lai filaments vispirms nokļūtu līdz klipsa atrašanās vietai, pēc nokļūšanas, klipsi atlaiž, un turpina filamenta ievietošanu, vienlaicīgi monitorējot lāzera doplera rādītājus, rādītāju samazināšanās liecinās par vidējās cerebrālās artērijas (MCA) oklūziju jeb nobloķēšanu. Manipulācijas rezultātā ir jāfiksē vismaz par 80% samazināta cerebrālā asinsplūsma. Piemēram, pirms manipulācijas sākuma cerebrālās asinsplūsmas rādītājs bija 962, bet pēc filamenta ievietošanas tas kļuva 122. Gadījumā, ja cerebrālā asinsplūsma nesamazinās, vai samazinājusies niecīgi, pārliecinās, vai filaments ir novietojies kreisajā artērijā. Tiklīdz novēro asinsplūsmas samazināšanos, tad vaļīgo mezglu savelk ciešāk (CCA), lai izvairītos no iespējamās filamenta izslīdēšanas no ICA, uzliek šuvi kakla vidusdaļas garengriezumam.



2.4.2. att. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzija, izmantojot intraluminālu filamentu (autora attēls)

Pēc šuves uzlikšanas peli ievieto uz 60min apsildāmā būrī, kura temp. ir 32°C. Pēc vienas stundas atjauno anestēzijas padevi, peli izņem no apsildāmā būra un novieto uz ķermeņa temperatūru uzturošā apsildāmā elementa un pievada gāzes anestēziju. Veic reperfūziju: atbrīvo uzlikto kakla šuvi, atsedz CCA, izņem filamentu un tūlītēji aizšuj griezuma vietu, lai izvairītos no noasiņošanas riska. Procedūras beigās atkārtoti uzliek šuvi kakla vidusdaļas garengriezumam. Sham pelei (nosacītai kontrolei) procedūras soļu secīgums ir identisks, izņemot to, ka filaments tiek ievadīts, lai radītu artērijas sienas kairinājumu. Pēc procedūras un manipulāciju beigām peli ievieto apsildāmā būrī līdz divām stundām.

2.5. Pēc ķirurģijas aprūpes periods

Pēc ķirurģiju procedūru veikšanas *Sham* un *fMCAo* grupas peles ievieto apsildāmā būrī līdz divām stundām. Sākot ar nākamo dienu pēc insulta procedūras, pelēm uzsāk post-operatīvo aprūpi: pirmās trīs dienas pēc operācijas peli anestezējot 4% izoflurāna i.p. (intraperitoneāli – vēdera dobumā) ievada karprofēnu 1mg/mL 0,005mL tilpumā un s.c. 0,1mg/kg/pelei buprenorfina katras 12 stundas. Papildus karprofēna injekcijām pelēm 7 dienas s.c. (subkutāni – zem ādas, mugurā) ievada 0,7mL 20% glikozes šķīduma un 0,5mL Ringera laktāta šķīduma. Ja nākamo četru dienu laikā aprūpētā pele uzrāda pozitīvu pēc operācijas atlabšanas dinamiku (pieaug svars, pele paliek kustīgāka, zūd mazkustīgums), tad pārtrauc ievadīt glikozes šķīdumu. Savukārt, ja 7 dienas pēc operācijas pele joprojām ir samērā mazkustīga, kā arī tās svars nepieaug vai pat ir samazinājies, tad turpina ievadīt glikozes šķīdumu vēl papildus trīs dienas. Ja peles neatlabst un novēro krasu svara zudumu, piemēram, peles svars pirms operācijas 23g., pēc- 16g., tad konsultējoties ar veterināru pieņem lēmumu par nepieciešamību peli eitanizēt (Morton 1998).

2.6. Pētījuma *in vivo* un *ex vivo* testi

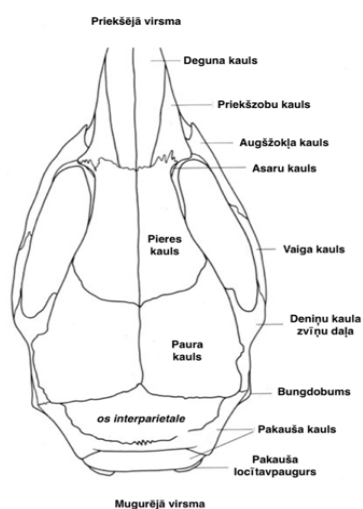
Pēc post-operatīvās aprūpes seko laika periods, kurā operētās peles dzīvo noteiktu laika nogriezni jeb iepriekš pārdomātu dienu skaitu individuāli ventilējamos būros līdz brīdim (55, 85, 115 dienas), kad tās ievieto un monitorē *TSE PhenoMaster system* – automatizētā dzīvnieku uzvedības reģistrācijas iekārtā. Būru iekārta reģistrē peļu aktivitāti 24h diennaktī, tests ilgst līdz četrām diennaktīm. Pēc monitorēšanas beigām peles pārvieto atpakaļ individuālajos būros un nākamajā dienā veic atklātā lauka testu. Uzvedības testu veic un iegūtos rezultātus savos noslēgumu darbos apraksta Helēna Vāne un Agate Ābola. Nākamajā dienā pēc uzvedības testu pabeigšanas, pelēm veic cervikālo dislokāciju, izolē smadzenes un veic augstas izšķirtspējas respirometriju.

2.7. Smadzeņu izolēšana, struktūru atdalīšana un sagatavošana O₂k eksperimentam

Neizmantojot anestēziju, pelēm tiek veikta cervikālā dislokācija. Seko smadzeņu audu izolēšana no galvaskausa, process jāveic pēc iespējas ātrāk, jo mitohondriju funkcionalitāti – skābekļa patēriņu, jānovērtē svaigiem, nesaldētiem audiem.

Vispirms noloka ādas kroku un atsedz galvaskausu tā, lai galvas matainā daļa netraucētu audu izolēšanai. Ar šķēru palīdzību pārgriež mataino ādas daļu. Saredz galvaskausu.

Ar smalku knaiņļu palīdzību skrāpē galvaskausa viduslīniju, padarot kaulu irdenāku un trauslāku. Pakauša rajonā tiek veikts smalks griezum, uzmanīgi un pakāpeniski tiek noņemtas parietālās, interparietālās un frontālas galvaskausa daļas (skat. 2.7.1. att.).

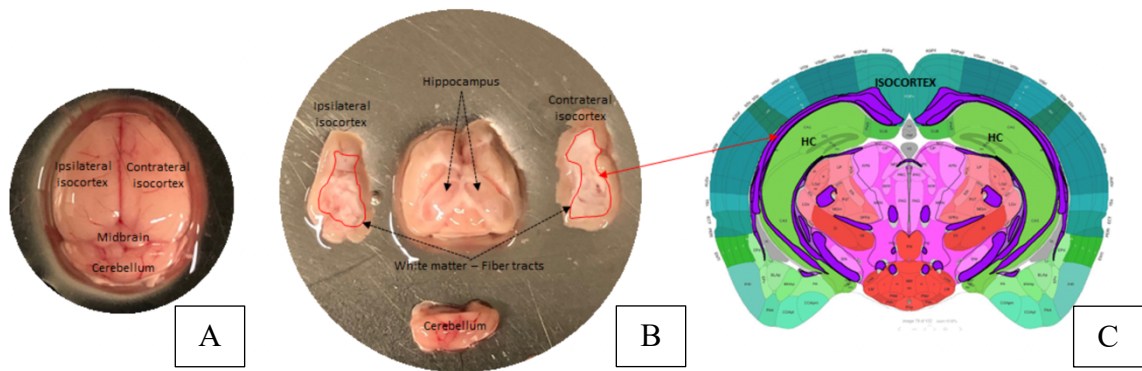


2.7.1. att. Peles galvaskauss dorsāli, t.i., skats vērsts uz mugurpusi (ar izmaiņām no: Cook 1965)

Tiklīdz galvaskausa daļas ir noņemtas, ar smalkas lāpstiņas palīdzību piepaceļ atsegtos smadzeņu audus un tos izņem (smadzeņu apvalks, t.i., *meninges* var radīt pretestību). Izolētos audus tūlītēji novieto uz iepriekš sagatavotas, ledus aukstas nerūsējošā tērauda plāksnes. Izolētos smadzeņu audus noskalo ar MiRO_5 buferšķīdumu, kas ļauj atbrīvoties no liekās asins klātbūtnes.

Tikko izolēti peļu smadzeņu audi ir mīksti un savstarpēji grūti atdalāmi. Ar knaiņļu palīdzību satur smadzenes, paralēli, izmantojot speciālu lāpstiņu maigi atdala abu smadzeņu pusložu garozu. Vispirms uzsāk atdalīt operācijas skarto, kreiso (ipsilaterālo) smadzeņu puslodes garozas daļu no smadzeņu stumbra, vidussmadzeņu un hipokampa audu struktūrām. Kad tiek pabeigta abu smadzeņu pusložu garozu atdalīšana, pārlicinās vai atdalītās struktūras nesatur baltās vielas pavedienus, t.i., šķiedru sakopojumus (skat. 2.7.2. B att.). Pēc rūpīgas audu apskates abas smadzeņu garozas (kreiso un labo) pārvieto atsevišķos MiRO_5 buferšķīduma trauciņos.

Pēc smadzeņu garozu atdalīšanas tiek atsegta hipokampa struktūra. Pirms hipokampu atdalīšanas ar skalpeli pārgriež smadzeņu vidusdaļu. Ar tiem pašiem instrumentiem – speciālu lāpstiņu atdala abus hipokampus, līdzīgi kā garozu atdalīšanas procesā, uzsāk ar kreiso (ipsilaterālo) hipokampu. Hipokampu atdalīšanas procesā papildus uzmanību pievērš baltās vielas šķiedrām. Šķiedras ir jānoņem, attiecīgi pēc hipokampu attīrīšanas no šķiedrām, tos pārvieto buferšķīdumā.



2.7.2. att. Peļu smadzeņu struktūru atdalīšanas process, struktūru izkārtojums: A- izolētas smadzenes; B- atdalītas smadzeņu struktūras (skat. no kreisās puses – kreisā/ ipsilaterālā garozas daļa, hipokampu struktūra, labā/ kontralaterālā garozas daļa un smadzenītes); C- smadzeņu struktūru izkārtojums (A&B autora attēli, C attēls no: The Allen Mouse Brain atlas, 2011)

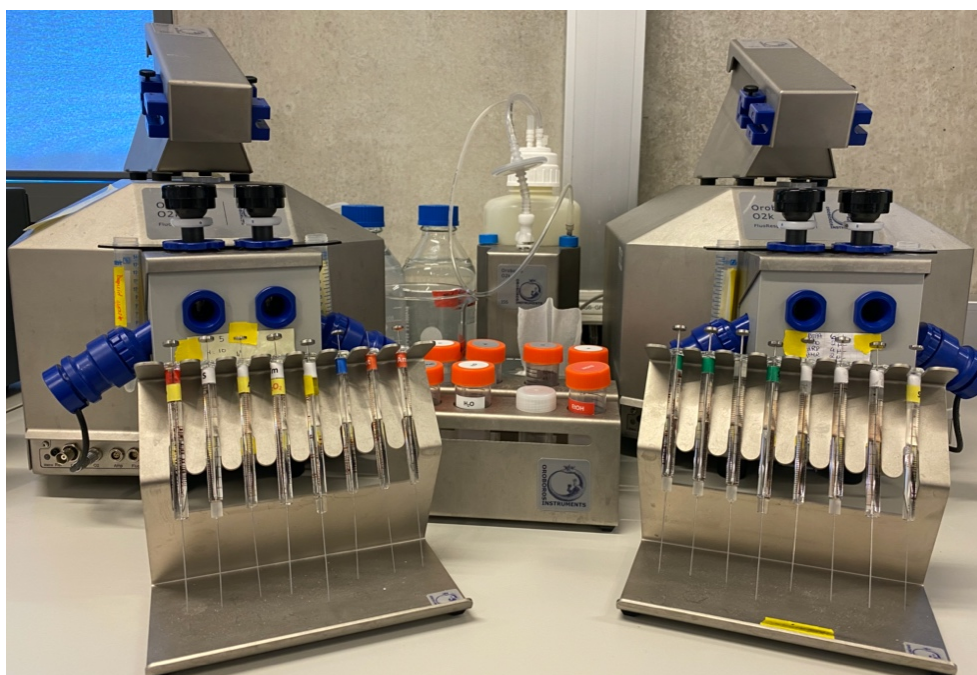
Lai sagatavotu pētāmo audu paraugus eksperimentiem, vispirms ir jānosaka parauga masa. Ar analītiskiem svariem (0,0001g) nosver paraugus, nosakot to masu gramos. Pirms parauga svēršanas to nosusina ar filtrpapīra palīdzību. Pēc nosvēršanas paraugu pārnes Dounča homogenizētājā, pievieno 500µL buferšķīduma (buferšķīduma sastāvdaļas skat. otrajā pielikumā). Homogenizētāju ievieto iepriekš sagatavotā ledus kastē. Kad visi paraugi ir nosvērti un tiem ir pievienoti 500µL buferšķīduma, ledus kastē esošos paraugus sagatavo homogenizēšanai. Eksperimentiem tiek izmantots šķīdums, kurā parauga esošā koncentrācija atbilst 20mg/mL. Tā kā katram paraugam ir atšķirīga masa, bet pētāmai un eksperimentā pielietojamai parauga masas koncentrācijai jābūt vienādai, tad, izmantojot formulu:

$$V_{\text{buferšķīduma}} = \frac{m_{\text{parauga}}}{c_{\text{beigu}}} * 1000$$

(V- tilpums, mL; m- masa, g; c- koncentrācija, mg/mL), tiks aprēķināts nepieciešamais buferšķīduma kopējais tilpums, kas jāpievieno, lai atšķaidītu un sanāktu paraugs ar pētījumam atbilstošu masas koncentrāciju. Pēc aprēķinātā buferšķīduma tilpuma pievienošanas Dounča homogenizētājā, izmantojot A un B virzuļus, ar plūstošām kustībām homogenizē paraugus, eksperimentā izmantojot audu homogenātus jeb Mt Thom. Smadzeņu pusložu paraugu homogenizēšanai izmanto gan A, gan B virzuli, ar katru virzuli kustības atkārtojot 10 reizes, savukārt, hipokampu paraugu homogenizēšanai izmanto B virzuli kustības atkārtojot 10 reizes. Sagatavotos paraugus – homogenātus, ar mērpipetes palīdzību pārnes 2,5mL ependorfu stobriņos, stobriņus uzglabā ledū līdz ievadišanas brīdim O₂k oksigrāfu kambaros.

2.8. Augstas izšķirtspējas respirometrijas metode, izmantojot O₂k oksigrāfu

Augstas izšķirtspējas skābekļa patēriņu, izmantojot svaigus, nesasaldētus CNS audus nosaka ar O₂k oksigrāfu, kas ir aprīkots ar sensoriem skābekļa patēriņa mērījumu noteikšanai, kā arī darba stacija ar atbilstošu programmatūru datu reģistrācijai un turpmākai apstrādei. Katrs oksigrāfs ir aprīkots ar slēgtu kambaru sistēmu un vismaz diviem moduļiem, kur katram modulim ir fluorescences sensori, kas spēj nodrošināt vienlaicīgu vismaz divu kanālu, t.i., skābekļa un fluorescences mērījumus. Pētāmos paraugus oksigrāfā ievada ar *Hamilton* šļirci (10-100µL šļirces) palīdzību (skat. 2.8. att.).

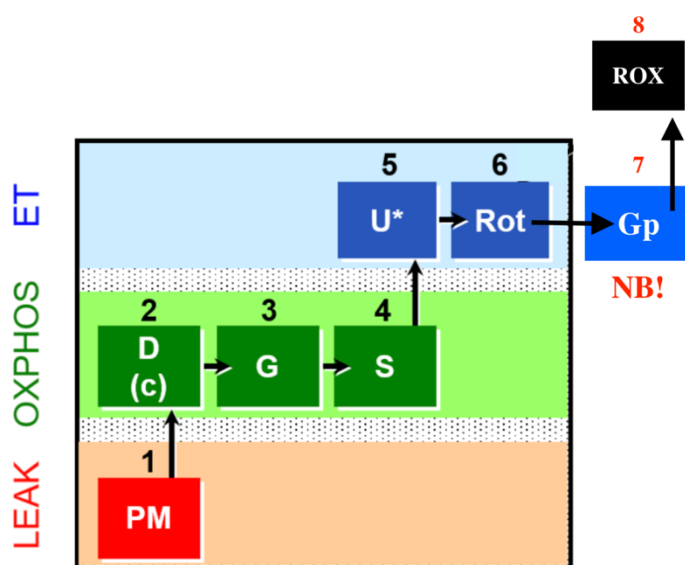


2.8. att. O₂k oksigrāfi ar *Hamilton* šļircēm (autora attēls)

Slēgtā kambaru sistēmā ($V=2,0\text{mL}$), kā pētāmos paraugus izmanto smadzeņu un hipokampa struktūru homogenātus (Mt Thom). Skābekļa patēriņa mērījumus reģistrē reāllaikā, ar detekcijas limitu $\leq 1 \text{ pmol O}_2/\text{s/mL}$ un jutību $< 3 \text{ pmol O}_2/\text{s/mL}$, izmantojot DatLab programmatūru (OROBOROS INSTRUMENTS, Austrija). Eksperimenti tika veikti O₂k oksigrāfiem manuāli ieprogrammētā 37°C temperatūras vidē.

2.9. SUIIT protokoli

Mitohondriju skābekļa patēriņa noteikšanai tika izmantots SUIIT, t.i., substrātu-atjūdzēju- inhibitoru titrēšanas darba protokols. SUIIT protokolus izmanto mitohondrijus saturošu paraugu pētīšanā. Katram darba protokolam ir norādīts substrātu, t.i., reaģentu pievienošanas secīgums, šis secīgums ir numurēts. Mt Thom paraugu skābekļa patēriņa mērījumu noteikšanai izmantoja, SUIIT-001/008 protokolu, t.i., 1PM,2D,2c,3G,4S,5U,6Rot,7Gp,8Ama (skat. 2.9. att. un trešo pielikumu) (MitoPedia:SUIIT, 2020).



2.9. att. SUIIT-001/008 protokola substrātu pievienošanas secīgums un ierosinātie elektronu pārnese stāvokļi (ar izmaiņām no: MitoPedia:SUIIT, 2020)

2.10. Mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumi

Lai noteiktu ilgtermiņa mitohondriju skābekļa patēriņu CNS audos pēc pārciesta cerebrāla infarkta, tika veikta augstas izšķirtspējas respirometrija, pētījumā izmantojot, *Oxygraph-2k* iekārtu (*Oroboros Instruments*, Austrija). Vienlaicīgi tika darbinātas divas darba stacijas (četras slēgtas kambaru sistēmas). Sākumā ar *Hamilton* šļircēm ievada Mt Thom $V=100\mu\text{L}$, $c=20\text{mg/mL}$. Piruvāts (5mM), malāts ($0,5\text{mM}$) un glutamāts (10mM) tika izmantots, lai noteiktu ar kompleksu I saistīto elpošanu. Piruvāts, malāts un glutamāts kopā ar sukcinātu (10mM) tika izmantots, lai noteiktu ar kompleksu I un II saistīto elpošanu. Skābekļa patēriņa mērījumi tika veikti oksidatīvās fosforilācijas jeb *OXPHOS* stāvoklī, pievienojot ADF ($2,5\text{mM}$). Mitohondriju šūnas membrānas integritātes noteikšanai tika pievienots citohroms *c* ($10\mu\text{M}$). Lai noteiktu maksimāli iespējamo skābekļa patēriņu jeb elpošanas kapacitāti, tika pievienots elpošanas un fosforilēšanās atjūdzējs CCCP ($0,5\mu\text{M}$).

Papildus tika veikti skābekļa patēriņa mērījumi, pievienojot glicerolfosfātu ($10\mu\text{M}$). Pirmā elpošanas kompleksa darbības pārtraukšanai tika pievienots I elpošanas kompleksa blokators rotenons ($0,5\mu\text{M}$). Savukārt, trešā elpošanas kompleksa darbības pārtraukšanai un reziduāla skābekļa patēriņa noteikšanai (ROX) tika pievienots antimicīns ($2,5\mu\text{M}$).

Visi eksperimenti tika veikti 37°C aparatūras sistēmas temperatūrā. Gadījumā, ja slēgtā kambarī esošā skābekļa konc. samazinājās līdz $20\mu\text{M}$, kambarī esošo buferšķīdumu reoksigenēja līdz brīdim, kad skābekļa konc. sasniedza $100\mu\text{M}$. Skābekļa patēriņa mērījumi tika reģistrēti automātiski – reāllaikā, izmantojot DatLab programmatūru (OROBOROS INSTRUMENTS, Austrija).

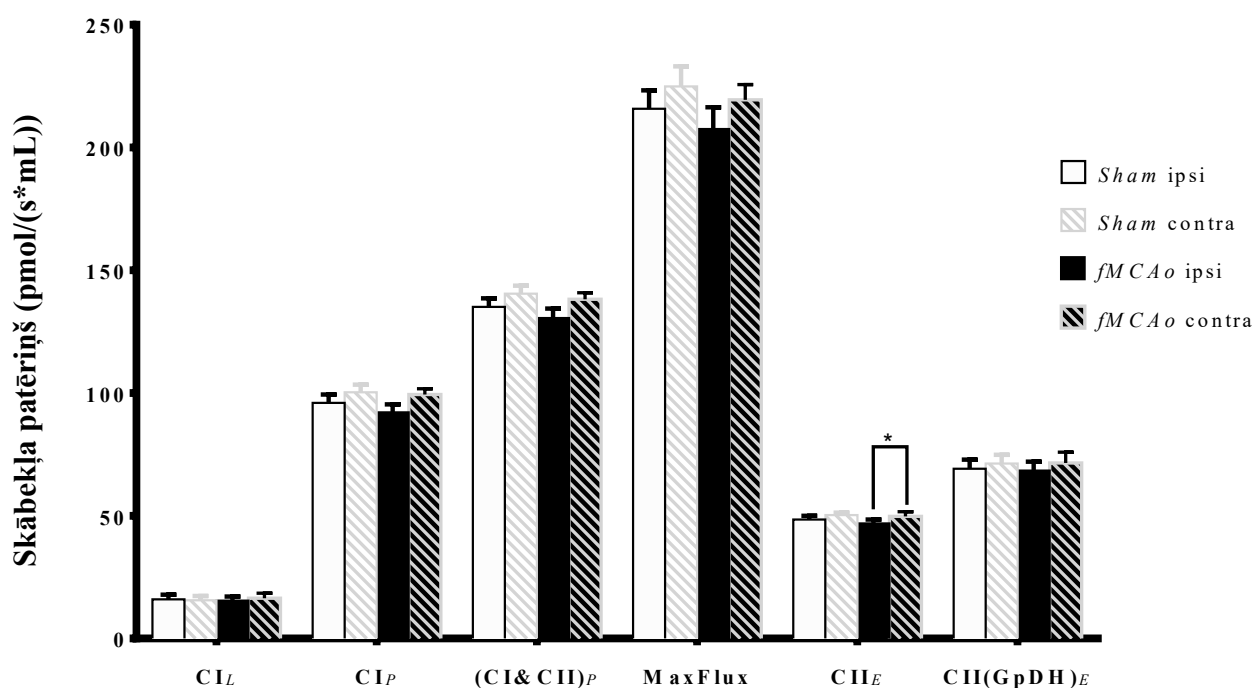
2.11. Statistiskās apstrādes metodes

Testu rezultāti tika izteikti kā vidējās $\pm\text{SEM}$ vērtības. Statistiskā analīze tika veikta, izmantojot *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software, ASV*). Datu statistiskai analīzei katra dzīvnieka labās garozas analīzes rezultātus salīdzināja pret kreisās garozas datiem izmantojot sapārotu *t* testu. *Sham* grupas datus ar *fMCAo* grupas rezultātiem salīdzināja izmantojot nesapārotu *t* testu. Par statistiski ticamiem tika uzskatīti rezultāti, kuru *p* vērtība bija mazāka par 0,05.

3. REZULTĀTI

3.1. Mitochondriālais skābekļa patēriņš peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrās divus mēnešus pēc cerebrāla infarkta

Lai noteiktu skābekļa patēriņu peļu smadzeņu garozas mitohondrijos divus mēnešus pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas, tika pielietota augstas izšķirtspējas skābekļa patēriņa noteikšanas metode, izmantojot divus O₂k oksigrāfus. Rezultāti parāda, ka divus mēnešus pēc cerebrāla infarkta, ir novērojamas skābekļa patēriņa (pmol/(s*mL)) atšķirības *fMCAo* grupas peļu smadzeņu garozas kreisajā un labajā puslodē. Šī atšķirība ir konstatējama *fMCAo* grupas peļu ipsilaterālajā (kreisajā jeb infarkta skartajā) smadzeņu puslodes CII_E rādītājā ar kompleksa II saistīto substrātu (pēc rotenona pievienošanas) elektronu pārnesei (ET) ierosinātā mitohondriju elpošanā, kas ir, statistiski ticami mazāka, salīdzinot ar pretējo jeb kontralaterālo (labo) smadzeņu puslodi (skat. 3.1.1. att.).



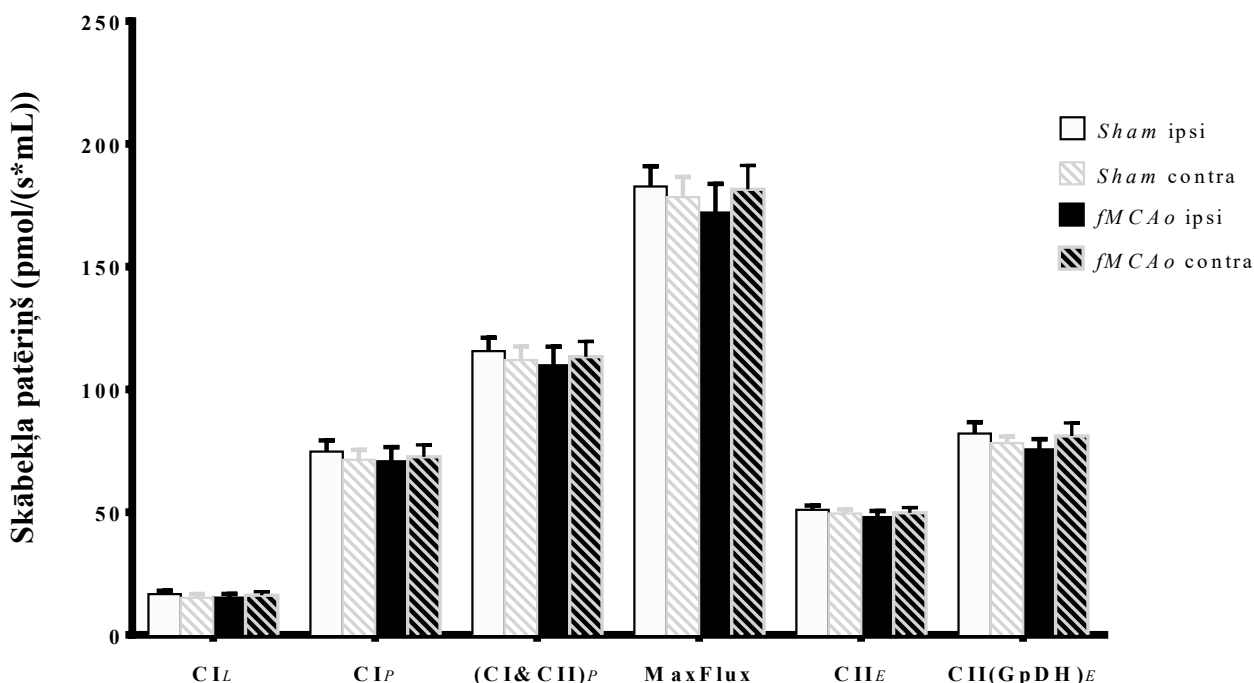
3.1.1. att. Skābekļa patēriņš smadzeņu garozas mitohondrijos divus mēnešus pēc oklūzijas

Apzīmējumi: ierosinātie elpošanas stāvokļi un pievienotie substrāti: CI_L – miera stāvoklis (piruvāts un malāts); CI_P – OXPHOS stāvoklis (adenozīndifosfāts (ADF) un glutamāts); (CI&CII)_P – OXPHOS stāvoklis (sukcināts); MaxFlux – nesapārots elektronu pārnesei (ET), atjūgšanas stāvoklis, kad elektronu pārnesei/ elpošanas kapacitāte sasniedz maksimumu (CCCP); CII_E – ET stāvoklis, bloķēts CI (rotenons);

CII(GpDH)_E – ET stāvoklis (glicerolfosfāts), saīsinājumu atšifrējumu skat. trešajā pielikumā; N = 10, *p ≤ 0,05 vs *fMCAo* contra

Salīdzinot abas peļu smadzeņu puslodes gan vienas grupas starpā, gan starp abām grupām (*fMCAo* vs *Sham*), pārējos smadzeņu garozas skābekļa patēriņa rādītājos divus mēnešus pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas statistiski ticamu atšķirību nenovēro.

Ja *fMCAo* grupas peļu smadzeņu garozas mitohondriju skābekļa patēriņam divus mēnešus pēc CI novēro statistiski ticamu atšķirību vismaz vienā rādītājā, tad iegūtie rezultāti parāda, ka peļu smadzeņu hipokampa struktūrās nav novērojamas skābekļa patēriņa atšķirības *fMCAo* un *Sham* grupās divus mēnešus pēc CI (skat. 3.1.2. att.).

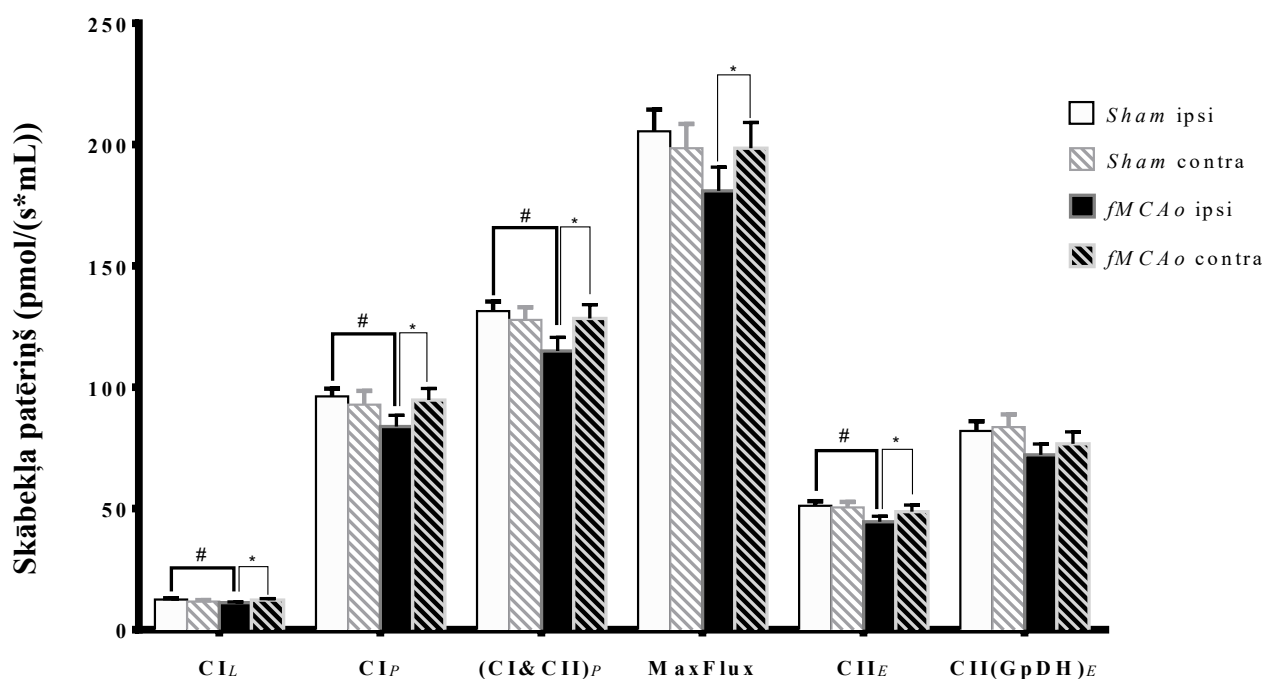


3.1.2. att. Skābekļa patēriņš hipokampa struktūras mitohondrijos divus mēnešus pēc oklūzijas

Apzīmējumi: ierosinātie elpošanas stāvokļi un pievienotie substrāti: **CI_L** – miera stāvoklis (piruvāts un malāts); **CI_P** – OXPHOS stāvoklis (adenozīndifosfāts (ADF) un glutamāts); **(CI&CII)_P** – OXPHOS stāvoklis (sukcināts); **MaxFlux** – nesapārots elektronu pārnese (ET), atjūgšanas stāvoklis, kad elektronu pārnese/ elpošanas kapacitāte sasniedz maksimumu (CCCP); **CII_E** – ET stāvoklis, bloķēts CI (rotenons); **CII(GpDH)_E** – ET stāvoklis (glicerolfosfāts), saīsinājumu atšifrējumu skat. trešajā pielikumā; N = 10

3.2. Mitochondriālais skābekļa patēriņš peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrās trīs mēnešus pēc cerebrāla infarkta

Iegūtie rezultāti liecina, ka trīs mēnešus pēc CI, peļu mitohondriju skābekļa patēriņa rādītāji smadzeņu garozas audos ir statistiski ticami samazinājušies. Ir novērojamas skābekļa patēriņa atšķirības *fMCAo* grupas peļu smadzeņu garozas kreisajā un labajā puslodē. Šīs atšķirības ir konstatējamās *fMCAo* grupas peļu ipsilaterālajā smadzeņu puslodē: CI_L rādītājā jeb miera stāvoklī, ar kompleksa I saistīto substrātu; CI_P un $CI&CII_P$ rādītājā jeb OXPHOS stāvoklī, ar kompleksa I un kompleksa I&II; MaxFlux rādītājā jeb atjūgšanas stāvoklī; CII_E rādītājā jeb ET stāvoklī, ar kompleksa II saistīto substrātu ierosinātā mitohondriju elpošanā, kas ir statistiski ticami mazāka, salīdzinot ar kontralaterālo smadzeņu puslodi. Papildus tam, statistiski ticamas atšķirības ir konstatējamās *fMCAo* un *Sham* grupas peļu ipsilaterālo pusložu mitohondriju skābekļa patēriņa rādītājos, izņemot vienā gadījumā – MaxFlux rādītājā (skat. 3.2.1. att.) nav konstatētas atšķirības. Rezultāti parāda, ka *fMCAo* peļu grupas ipsilaterālajā puslodē skābekļa patēriņš ir zemāks, nekā *Sham* grupas peļu ipsilaterālajā puslodē. No pārējiem analizētajiem rādītājiem, atšķirīgus datus uzrāda $CII(GpDH)_E$, kad salīdzinot abas peļu smadzeņu puslodes gan vienas grupas starpā, gan starp abām grupām, šajā rādītājā trīs mēnešus pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas nenovēro statistiski ticamu atšķirību.

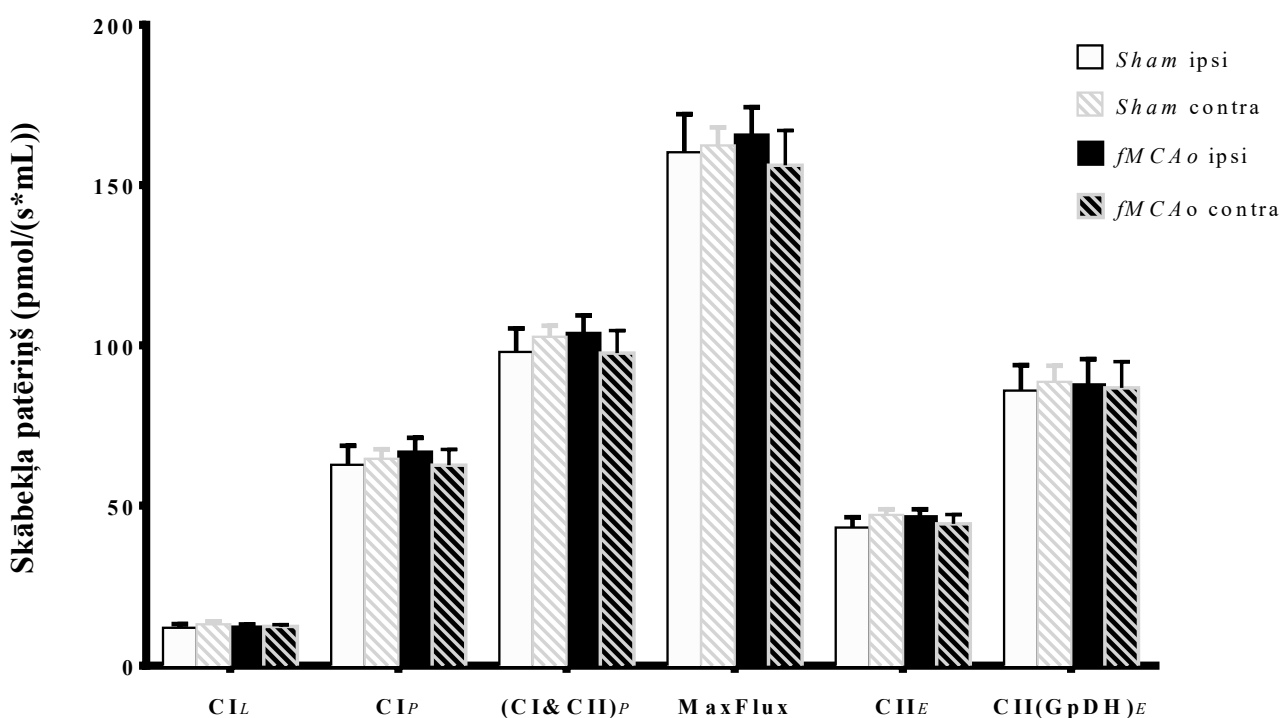


3.2.1. att. Skābekļa patēriņš smadzeņu garozas mitohondrijos trīs mēnešus pēc oklūzijas

Apzīmējumi: ierosinātie elpošanas stāvokļi un pievienotie substrāti: CI_L – miera stāvoklis (piruvāts un malāts); CI_P – OXPHOS stāvoklis (adenozīndifosfāts (ADF) un glutamāts);

(CI&CII)_P – OXPPOS stāvoklis (sukcināts); **MaxFlux** – nesapārots elektronu pārnese (ET), atjūgšanas stāvoklis, kad elektronu pārnese/ elpošanas kapacitāte sasniedz maksimumu (CCCP); **CII_E** – ET stāvoklis, bloķēts CI (rotenons); **CII(GpDH)_E** – ET stāvoklis (glicerolfosfāts), saīsinājumu atšifrējumu skat. trešajā pielikumā; N = 9, *p ≤ 0,05 vs *fMCAo* contra; #p ≤ 0,05 vs *Sham* ipsi

Līdzīgi kā divus mēnešus tā arī trīs mēnešus pēc CI statistiski ticamas atšķirības skābekļa patēriņa rādītājos nenovēro hipokampa struktūrā gan, savstarpēji salīdzinot, *fMCAo* grupas ipsilaterālo ar kontralaterālo hipokampa struktūru, gan, savstarpēji salīdzinot, *fMCAo* grupas un *Sham* grupas ipsilaterālās, un kontralaterālās hipokampa struktūras (skat. 3.2.2. att.).

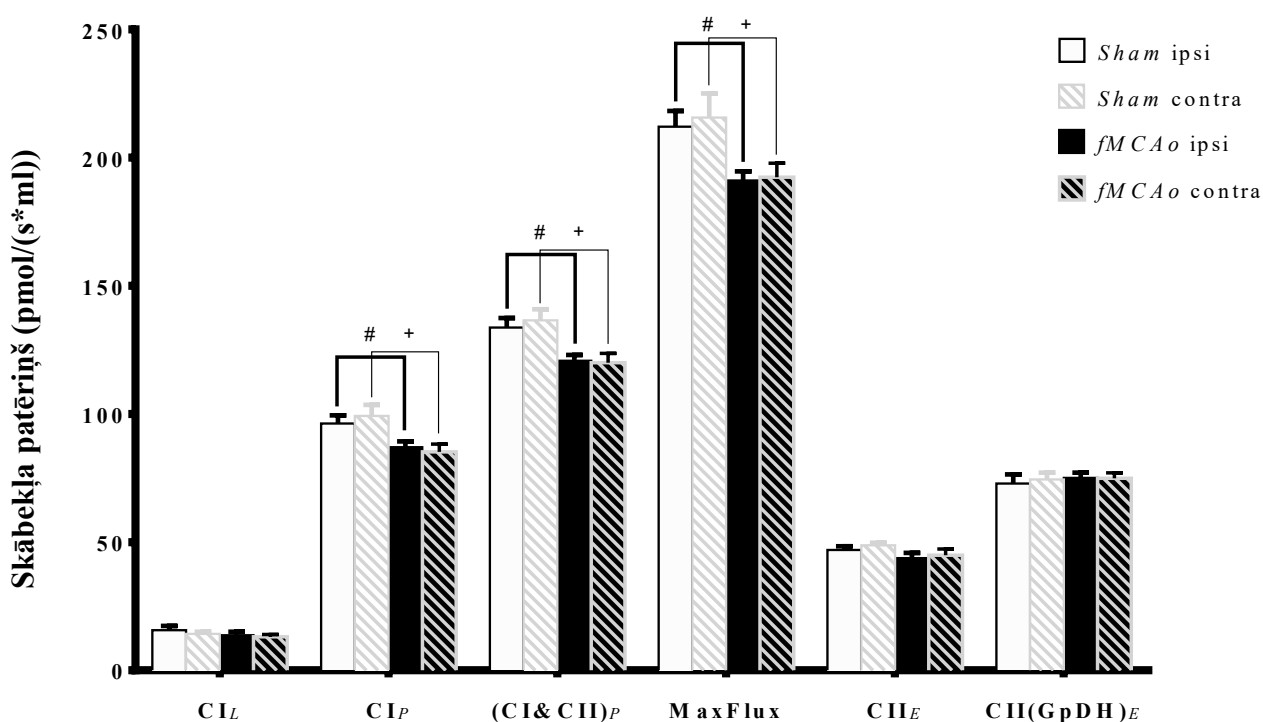


3.2.2. att. Skābekļa patēriņš hipokampa struktūras mitohondrijos trīs mēnešus pēc oklūzijas

Apzīmējumi: ierosinātie elpošanas stāvokļi un pievienotie substrāti: **CI_L** – miera stāvoklis (piruvāts un malāts); **CI_P** – OXPPOS stāvoklis (adenozīndifosfāts (ADF) un glutamāts); **(CI&CII)_P** – OXPPOS stāvoklis (sukcināts); **MaxFlux** – nesapārots elektronu pārnese (ET), atjūgšanas stāvoklis, kad elektronu pārnese/ elpošanas kapacitāte sasniedz maksimumu (CCCP); **CII_E** – ET stāvoklis, bloķēts CI (rotenons); **CII(GpDH)_E** – ET stāvoklis (glicerolfosfāts), saīsinājumu atšifrējumu skat. trešajā pielikumā; N = 9

3.3. Mitochondriālais skābekļa patēriņš peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrās četrus mēnešus pēc cerebrāla infarkta

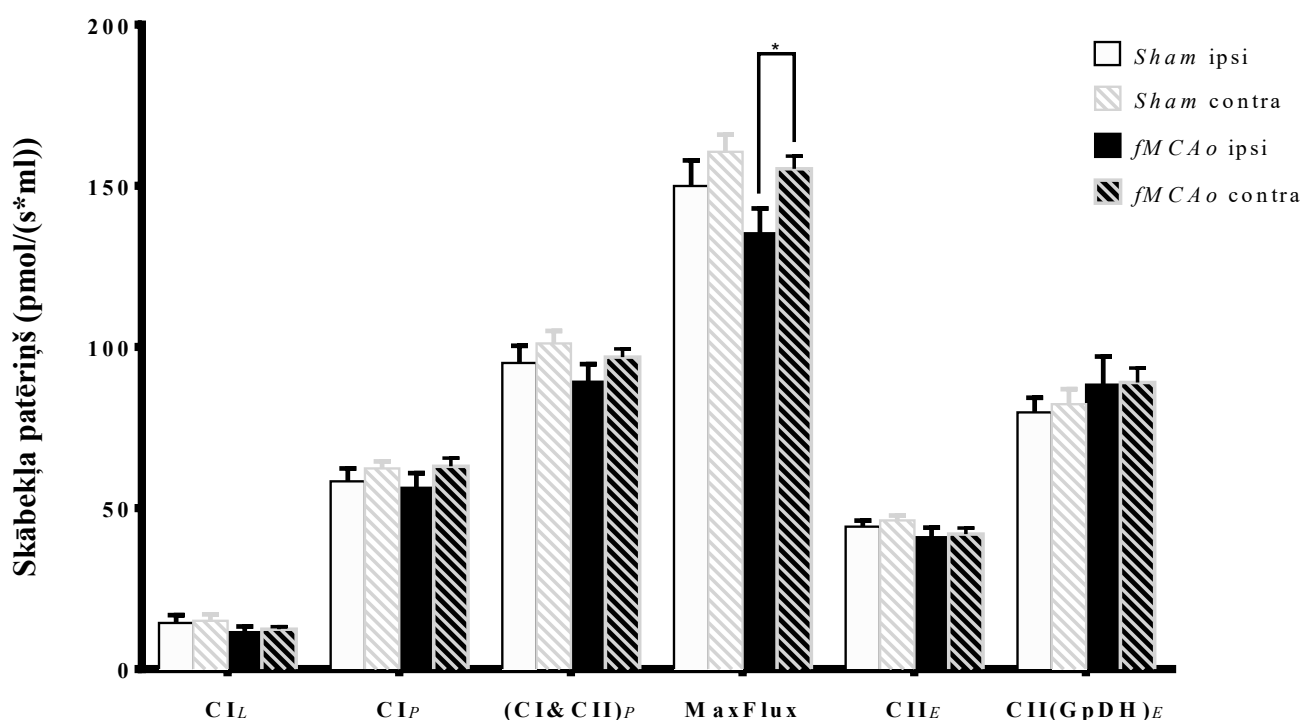
Ceturtajā mēnesī pēc CI ir novērojama atšķirīga skābekļa patēriņa iezīme, jo nenovēro statistiski ticamu atšķirību skābekļa patēriņā starp smadzeņu ipsilaterālo un kontralaterālo puslodi *fMCAo* grupas pelēm. Taču statistiski ticamas skābekļa patēriņa atšķirības ir konstatējamās *fMCAo* grupas peļu ipsilaterālajos un kontralaterālajos smadzeņu pusložu mitohondriju elpošanas rādītājos: CI_P un $CI\&CII_P$ jeb OXPHOS stāvoklī, un MaxFlux jeb atjūgšanas stāvoklī, tos salīdzinot, ar *Sham* grupas ipsilaterālo un kontralaterālo smadzeņu pusložu rādītājiem. Savukārt, CI_L , CII_E un $CII(GpDH)_E$ rādītājos četrus mēnešus pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas statistiski ticamas atšķirības starp abām peļu smadzeņu puslodēm gan vienas grupas starpā, gan starp abām grupām nenovēro (skat. 3.3.1. att.).



3.3.1. att. Skābekļa patēriņš smadzeņu garozas mitohondrijos četrus mēnešus pēc oklūzijas

Apzīmējumi: ierosinātie elpošanas stāvokļi un pievienotie substrāti: CI_L – miera stāvoklis (piruvāts un malāts); CI_P – OXPHOS stāvoklis (adenozīndifosfāts (ADF) un glutamāts); $(CI\&CII)_P$ – OXPHOS stāvoklis (sukcināts); **MaxFlux** – nesapārots elektronu pārnese (ET), atjūgšanas stāvoklis, kad elektronu pārnese/ elpošanas kapacitāte sasniedz maksimumu (CCCP); CII_E – ET stāvoklis, bloķēts CI (rotenons); $CII(GpDH)_E$ – ET stāvoklis (glicerolfosfāts), saīsinājumu atšifrējumu skat. trešajā pielikumā; N = 10, #p ≤ 0,05 vs *Sham* ipsi; +p ≤ 0,05 vs *Sham* contra

Ceturtajā mēnesī pēc cerebrāla infarkta ir parādījušās skābekļa patēriņa atšķirības *fMCAo* grupas peļu kreisās un labās smadzeņu puslodes hipokampa struktūrā. Šī atšķirība ir konstatējama *fMCAo* grupas peļu ipsilaterālajā hipokampa struktūras MaxFlux rādītājā pēc CCCP pievienošanas, elektronu pārnesei (ET) ierosinātā mitohondriju elpošanā, kas ir, statistiski ticami mazāka, salīdzinot ar pretējo jeb kontralaterālo hipokampa struktūru (skat. 3.3.2. att.). Savukārt, pārējos rādītājos, salīdzinot *fMCAo* grupas ipsilaterālo ar kontralaterālo hipokampa struktūru un, savstarpēji salīdzinot, *fMCAo* grupas un *Sham* grupas ipsilaterālās, un kontralaterālās hipokampa struktūras, statistiski ticamu atšķirību nenovēro.



3.3.2. att. Skābekļa patēriņš hipokampa struktūras mitohondrijos četrus mēnešus pēc oklūzijas

Apzīmējumi: ierosinātie elpošanas stāvokļi un pievienotie substrāti: CI_L – miera stāvoklis (piruvāts un malāts); CI_P – OXPHOS stāvoklis (adenozīndifosfāts (ADF) un glutamāts); $(CI\&CII)_P$ – OXPHOS stāvoklis (sukcināts); **MaxFlux** – nesapārots elektronu pārnesei (ET), atjūgšanas stāvoklis, kad elektronu pārnesei/ elpošanas kapacitāte sasniedz maksimumu (CCCP); CII_E – ET stāvoklis, bloķēts CI (rotenons); $CII(GpDH)_E$ – ET stāvoklis (glicerolfosfāts), saīsinājumu atšifrējumu skat. trešajā pielikumā; N = 9 (*Sham*); N = 8 (*fMCAo*), * $p \leq 0,05$ vs *fMCAo* contra

DISKUSIJA

Insults ir viens no izplatītākajiem invaliditātes un nāves cēloņiem pasaulē. Ņemot vērā to, ka globāli iedzīvotāju populācija noveco, insulta prevalence un rekurence pieaug. Insults ir otrais biežākais invaliditātes koriģēto dzīves gadu, t.s., DALYs indikatora ietekmētājs. Sabiedrības veselības novērtējuma rādītāja izmaiņas ļauj uzskatāmi izmērīt šī brīža situāciju un sekojošas pārmaiņas, sekmējot iedzīvotāju populācijas veselības turpmāku saglabāšanu un uzlabošanu (Johnson *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020).

Cerebrāls infarkts (turpmāk CI) ir viens no visbiežāk sastopamo cerebrovaskulāro notikumu veidiem (Avan *et al.*, 2019). Klīniski CI apzīmē ar smadzeņu audu fokālu bojājumu, kam par iemeslu kalpo daļējs vai pilnībā okludēts asinsvads (Yang *et al.*, 2018). CI diagnosticē aptuveni 87% gadījumu, bet ap 13% veido hemorāģiska insulta gadījumu skaits, kam par iemeslu var kalpot asinsizplūdums smadzenēs vai starp smadzeņu apvalkiem (Karsy *et al.*, 2017; Andrabi *et al.*, 2019; Virani *et al.*, 2020).

CI mediē hipoksijas iestāšanos smadzeņu audu struktūrās, savukārt hipoksija sekmē šūnu intracelulārās homeostāzes traucējumus, kas galā var rezultēties ar šūnu nāvi (Fan *et al.*, 2017; Karsy *et al.*, 2017). CI serdē notiek neatgriezeniskas izmaiņas, iestājas audu nekroze, smadzeņu zonu, kurā saglabājas cerebrālā asinsplūsma un, kas ļauj uzturēt šūnu metabolismam nepieciešamo izejvielu piegādi dēvē par *penumbra* (Zhang *et al.*, 2019). Līdz ar to, CI gadījumā tiek iedarbināti cerebrālās plasticitātes mehānismi, kuru mērķi ir pēc iespējas ātrāk atjaunot bojājuma vietu un kompensēt zaudētās funkcionēšanas spējas (Hyllin *et al.*, 2017; Loubinoux *et al.*, 2017). Bez jebkādām šaubām, CI ietekmē katru skarto smadzeņu šūnu un šūnu organoīdus, it īpaši šūnu enerģijas spēkstacijas – mitohondrijus (Kühlbrandt 2015; Huang *et al.*, 2019).

Kaut arī mitohondriju galvenā funkcija ir enerģijas (ATF) ģenerēšana, mitohondriji ietekmē un kontrolē citus šūnas funkcionēšanai nepieciešamos procesus (Nguyen *et al.*, 2018). Mitohondriji ir primārais endogēno ROS formu avots, tostarp, mitohondriji kalpo par galveno mērķi brīvo radikāļu modulējošai un toksiskai darbībai (Casas *et al.*, 2015). CI gadījumā novēro mitohondriju membrānas potenciāla izmaiņas, enerģijas ģenerēšanas izsīkumu un absolūtu brīvo radikāļu hiperekspresiju, līdz ar to turpmākā mitohondriju dzīvotspēja un eksistence išemizētos apstākļos atspoguļo mitohondriju spēju pielāgoties pārejai no pro-apoptotiskiem apstākļiem uz izdzīvošanas apstākļiem nākamo stundu, dienu, vai pat vēl ilgākā laikā (Chen *et al.*, 2011).

Bez šaubām, CI gadījumā mitohondriju bojājumi rodas neizbēgami. CI izraisītās intracelulārās pārmaiņas mediē mitohondriju sekundārās izcelsmes bojājumus – tos, kas nav ģenētiski predisponēti (Niyazov *et al.*, 2016; Kanungo *et al.*, 2018).

Šo sekundāro bojājumu rezultātā tiek ietekmēta gan ATF ģenerēšana, mitohondriju fragmentēšanās un mitohondriju saplūšanas procesi. Tiek ietekmēta mitohondriju iekšējā membrānā lokalizētās OXPHOS mašīnērijas darbība – samazinās gan skābekļa patēriņa daudzums, gan elektronu pārnese jeb elpošanas kapacitāte (He *et al.*, 2020). Lai gan uz doto brīdi zinātniskā literatūrā ir atrodama un ir aprakstīta informācija par pirmsklīniskiem pētījumiem, kas apraksta mitohondriālo funkcionēšanu neilgi pēc CI. Taču var apgalvot, ka pilnībā iztrūkst zināšanu par mitohondriju funkcionalitātes kvalitāti ilgtermiņā, pirmsklīniski izpētot to funkcionēšanu vismaz divus un vairāk mēnešus pēc CI notikuma.

Šajā pētījumā mitohondriju funkcionalitātes kvalitāte, t.i., skābekļa patēriņš, peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrā tika pētīts ilgtermiņā – divus, trīs un četrus mēnešus pēc eksperimentāli radīta CI, pielietojot vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas modeli izmēģinājuma dzīvniekiem (pelēm). Iegūtie ilgtermiņa rezultāti ļauj iegūt priekšstatu par skābekļa patēriņa izmaiņām peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrā vairākus mēnešus pēc izraisīta CI. Var secināt, ka pēc diviem mēnešiem ipsilaterālā jeb CI skartā kreisā smadzeņu puslode uzrāda zemāku skābekļa patēriņu, bet šī statistiski ticamā atšķirība, salīdzinot ar labo jeb kontralaterālo smadzeņu puslodi – ir novērojama tikai CII_E rādītājā. Vēlos uzsvērt – šī atšķirība nav novērojama hipokampa struktūrā. Tātad, var apgalvot, ka skābekļa patēriņa izmaiņas nav būtiskas peļu smadzeņu garozas un hipokampa struktūrā divus mēnešus pēc pārciesta CI.

Ar vecuma saistītu skābekļa patēriņa izmaiņas ilgtermiņā pētījuši Takahashi *et al.*, grupas pētnieki, pētījumā izmantojot, izmēģinājuma dzīvnieku līnijas – C57BL/6 peļu tēviņus. Tika konstatēts ar vecuma izmaiņām saistīta skābekļa patēriņa samazināšanās peļu CNS smadzenēs (abas smadzeņu puslodes analizētas vienā paraugā). Takahashi *et al.*, grupas pētnieki atklāja, ka būtiskas – statistiski ticamas atšķirības sāka parādīties pēc 12 mēnešu vecuma, respektīvi, gan 6, gan 9, gan 12 mēnešu vecām pelēm vecums neizraisīja statistiski ticamas skābekļa patēriņa izmaiņas smadzeņu mitohondrijos. Statistiski ticamu atšķirību novēroja 15 mēnešu vecas grupas pelēm ar kompleksa I saistīto substrātu (piruvāts, malāts, glutamāts un adenoizīndifosfāts) jeb NADH- atkarīgajā mitohondriju elpošanā. Tika pārbaudīta arī ar kompleksa II saistītā elpošana, bet peļu smadzenēs statistiski ticamu atšķirību nenovēroja (Takahashi *et al.*, 2016).

Maģistra darba pētījumā, savstarpēji salīdzinot divus un trīs mēnešu datus, varam novērot tendenci – skābekļa patēriņš ir manāmi samazinājies peļu smadzeņu garozas mitohondrijos trīs mēnešus pēc pārciesta CI. Var secināt, ka trešajā mēnesī statistiski ticamu mitohondriju skābekļa patēriņa rādītāju atšķirību ir skaitliski vairāk.

Šīs atšķirības ir novērojamas, savstarpēji salīdzinot, gan *fMCAo* grupas peļu smadzeņu garozas kreiso un labo puslodi, gan *fMCAo* un *Sham* grupas smadzeņu garozas kreisās puslodes. Turklāt, jāpiebilst, ka līdzīgi kā divus mēnešus pēc pārciesta CI, tā arī trīs mēnešus pēc pārciesta CI hipokampa struktūrās statistiski ticamas atšķirības nenovēro. Neizbēgami rodas jautājums – kāpēc pēc trim mēnešiem, smadzeņu garozas struktūrā ir novērojamas izteiktākas izmaiņas? Iespējams, ka endovaskulāra filamenta inducētās oklūzijas un kreisās peļu smadzeņu garozas struktūras iedarbinātās smadzeņu plasticitātes izsūkuma dēļ rodas šādas – būtiskākas un izteiktākas statistiskās atšķirības. Līdzīgi arī hipokampu struktūrām, iespējams CI inducētie smadzeņu plasticitātes mehānismi joprojām kompensē mitohondriālo skābekļa patēriņa izmaiņas hipokampu struktūrā. Tie ir tikai minējumi, atsaucoties uz 2004. gadā Biernaskie *et al.*, grupas pētījumu rezultātiem, kas parādīja, ka nosacīti kritiskais atlabšanas periods pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas žurkām ir pirmās 30 dienas pēc notikuma (Biernaskie *et al.*, 2004).

Līdzīgi kā Takahashi *et al.*, grupas pētnieki, arī Reutzel *et al.*, grupas pētnieki pētīja ar peļu vecumu saistītās mitohondriju skābekļa patēriņa izmaiņas NMRI līnijas peļu mātišu CNS smadzeņu frontālajā garozā. Rezultāti parādīja, ka savstarpēji salīdzinot 6 mēnešu un triju mēnešu vecas peles, statistiski ticamas atšķirības netika novērotas. Statistiski ticamu rezultātu ieguva, salīdzinot 12 mēn. vecas peles ar trīs mēn. vecām pelēm, kad novēroja statistiski ticamu atšķirību ar kompleksa I saistīto substrātu (piruvāts, malāts, glutamāts un adenozinādifosfāts) jeb NADH- atkarīgajā mitohondriju elpošanā. Papildus tam, būtiskas atšķirības novēroja savā starpā salīdzinot 12, 18 un 24 mēn. peļu vecuma izraisītus skābekļa patēriņa rādītāju izmaiņas frontālajā garozā: gan CI&CI_P rādītājā jeb OXPHOS stāvoklī, gan CII_E rādītājā jeb ET stāvoklī – ar kompleksa I un II saistīto substrātu ierosinātā mitohondriju elpošanā. Reutzel *et al.*, grupas pētnieki secināja, ka šāda veida longitudināli pētījumi ir aktuāli, un ir nepieciešami gan ar vecuma saistītu izmaiņu, gan citu patofizioloģiju (šajā maģistra darbā – pēc CI) pētīšanā, jo tiek izmantoti vairāki pētījuma laika punkti jeb *endpoints*. Respektīvi, pētījumā izmantojot dažāda vecuma izmēģinājuma dzīvniekus, t.i., trīs, 6, 12, 18 un 24 mēn. (Reutzel *et al.*, 2020).

Diskutējot par četrus mēnešu datiem ir jāsecina, ka tie ir viendabīgākie, t.i., novērotās statistiski ticamās atšķirības skābekļa patēriņa rādītājos starp pētījuma grupām ir vienādas, t.i., statistiski ticamas atšķirības novērotas *fMCAo* grupas peļu ipsilaterālajos un kontralaterālajos smadzeņu pusložu mitohondriju elpošanas rādītājos: CI_P; CI&CI_P un MaxFlux, tos salīdzinot, ar *Sham* grupas ipsilaterālo un kontralaterālo smadzeņu pusložu rādītājiem. Četrus mēnešus pēc izraisīta CI, *fMCAo* grupas peļu smadzeņu puslodēs netika konstatētas ticamas atšķirības, salīdzinot CI skarto kreiso puslodi ar labo puslodi. Ja salīdzina ar iepriekšējiem mēnešiem, tad var redzēt, ka šie ir vienīgi iegūtie rezultāti smadzeņu garozas struktūrā ar šādu īpatnību.

Bet ir viens bet – četrus mēnešus pēc pārciesta CI ir konstatētas būtiskas skābekļa patēriņa atšķirības *fMCAo* grupas ipsilaterālajos un kontralaterālajos smadzeņu pusložu mitohondriju elpošanas rādītājos, tos attiecīgi salīdzinot ar *Sham* grupas ipsilaterālo un kontralaterālo smadzeņu pusložu rādītājiem. Vēlos uzsvērt, ka šāda veida tendence ir novērojama tikai četrus mēnešu datiem. Var secināt, ka ceturtajā mēnesī pēc CI ir parādījušās pirmās skābekļa patēriņa atšķirības *fMCAo* grupas peļu ipsilaterālās un kontralaterālās smadzeņu puslodes hipokampa struktūrā. Kas tam varētu kalpot par iemeslu, iespējamā cēloņsakarība var būt šāda, ka CI notikumam distālie jeb attālinātie smadzeņu rajoni vairs nespēj kompensēt CI mediēto audu bojājumu un zudumu notikuma serdē, un, varbūt, arī *penumbra* rajonā, līdz ar to visi iesaistītie kompensatorie mehānismi būs izsmēluši savas rezerves.

Diskusijas uzvedinošus rezultātus ieguva Pandya *et al.*, grupas pētnieki, kur līdzīgi, kā manis iepriekš aprakstītajos pētījumos, tika izmantotas ar vecumu saistītas mitohondriju skābekļa patēriņa izmaiņas ilgtermiņā dažādos CNS smadzeņu audu struktūrās, tostarp, gan frontālajā garozā, gan hipokampa struktūrā. Piebilde – kā izmēģinājuma dzīvniekus izmantoja žurkas, un mitohondriālo elpošanu noteica, izmantojot citu metodi *Seahorse* analizatoru (oksigrāfa analogierīce), nevis O_2k oksigrāfu. Rezultāti liecina, ka mitohondriju ierosinātā elpošana OXPHOS stāvoklī, pēc pievienotā adenozinādifosfāta (ADF) ir statistiski ticami samazinājusies hipokampa struktūrā 24, 12 un četrus mēnešus vecām žurkām, rezultātus salīdzinot ar viena mēneša vecu žurku hipokampa struktūru. Tikpat statistiski ticamu atšķirību ieguva MaxFlux jeb atjūgšanas stāvoklī 24, 12 un četrus mēnešus vecām žurkām, rezultātus salīdzinot, ar viena mēneša veciem dzīvniekiem gan frontālās garozas, gan hipokampa struktūrā. Pandya *et al.*, grupas pētnieki iegūtos šādus rezultātus izskaidro ar to, ka vecumā samazinās to transkriptu jeb mRNS daudzuma īpatsvars, kas atbild par atbilstošu mitohondriju elpošanas kompleksu funkcionēšanu. Līdz ar to, šīs vecuma mediētās izmaiņas korelē ar samazinātu mitohondriju elektronu pārnesei darbību smadzeņu struktūrās (Pandya *et al.*, 2016).

Pētījumam, kurš tika izstrādāts maģistra darba laikā, piemīt augsta novitāte, tas spēj radīt būtiskas jaunas zināšanas un atziņas. Jo līdz šim nav atrodama neviena publikācija, kas būtu aprakstījusi mitohondriālo elpošanu vairākus mēnešus pēc pirmsklīniski izveidota CI. Uzskatu, ka pētījuma rezultāti ir aktuāli un, vēlreiz akcentējot rezultātu novitāti, būtu vērts turpināt mitohondriju skābekļa patēriņa rādītāju noteikšanu pēc CI, sīkāk apskatot līdz pat 12 mēnešiem vecus izmēģinājuma dzīvniekus, kā arī izpētīt iespējamās radušās ROS izmaiņas.

SECINĀJUMI

1. Divus mēnešus pēc endovaskulārā filamenta inducētās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ar sekojošu CI ir radījušas samazinātu mitohondriju skābekļa patēriņu CII_E rādītājā peļu smadzeņu garozas, bet ne hipokampa struktūrā.
2. Samazinātu mitohondriju skābekļa patēriņu novēro trīs mēnešus pēc endovaskulārā filamenta inducētās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas vairākos ar mitohondriālās elpošanas kompleksu I un II saistītos rādītājos, savstarpēji salīdzinot, abas smadzeņu puslodes, kā arī samazināts skābekļa patēriņš ir novērojams CI skartajā puslodē, to, attiecīgi salīdzinot, ar *Sham* grupas smadzeņu puslodi. Hipokampa struktūrā atšķirības mitohondriālā skābekļa patēriņā nenovēro.
3. Četrus mēnešus pēc eksperimentāli izraisīta CI abās peļu smadzeņu garozas puslodēs novēro samazinātu mitohondriju skābekļa patēriņu CI_P ; $CI&CII_P$ un MaxFlux rādītājos, salīdzinot ar *Sham* grupas peļu smadzeņu puslodzi rādītājiem. Šajā mēnesī vairs neparādās atšķirības starp CI skartās smadzeņu puslodes un kontralaterālās puslodes mitohondriālo elpošanu. Pirmo reizi novēro samazinātu mitohondriju skābekļa patēriņu hipokampa struktūrā MaxFlux rādītājā.
4. Iegūtas jaunas zināšanas par CI ilgtermiņa ietekmi uz mitohondriju funkcionalitāti, tam izraisot statistiski ticamu skābekļa patēriņa samazināšanu izmēģinājuma dzīvniekiem šajā organismam vitāli svarīgajā organellā. Nepieciešami turpmāki pētījumi, kas parādīs CI ilgtermiņa ietekmi uz smadzeņu audiem saistībā ar ROS producēšanos.

PATEICĪBAS

Izsaku sirsnīgu pateicību Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedras kolēģiem par atbalstu, pacietību un sapratni. Vēlos pateikties darba vadītājai Prof., Dr. med. Baibai Jansonei par uzticēšanos, ieguldīto laiku, vērtīgiem padomiem un ieteikumiem darba tapšanas laikā. Izmantojot iespēju, vēlos pateikties katram docētājam par ieguldīto laiku un darbu studentu izglītošanā, izsaku pateicību administratīvajam personālam, it īpaši LU Medicīnas fakultātes vecākajai lietvedei Jutai Bārtulei.

Liels paldies ģimenei un draugiem par atbalstu un spītību visa maģistra darba rakstīšanas laikā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. et al.**, (2002). The genetic systems of mitochondria and plastids. In: *Molecular Biology of the Cell*, 210-14.
- Allen Institute for Brain Science** (2011). Mouse Coronal Atlas. [tiešsaiste] – [atsauce 03.03.2020.] Pieejams: http://mouse.brain-map.org/experiment/thumbnails/100048576?image_type=atlas
- Altmann, R.** (1894). Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. **Im: Zweite vermehrte Auflage**, 160.
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L.R. et al.**, (2009). Classification of stroke subtypes. *Cerebrovascular diseases*, 27: 493-501. doi.org/10.1159/000210432
- Amigo, I., da Cunha, F.M., Forni, M.F. et al.**, (2016). Mitochondrial form, function and signalling in aging. *Biochemical Journal*, 473: 3421-49. doi.org/10.1042/BCJ20160451
- Andrabi, S.S., Parvez, S., Tabassum, H.** (2019). Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets. *Protoplasma*, 257: 335-43. [10.1007/s00709-019-01439-2](https://doi.org/10.1007/s00709-019-01439-2)
- Angajala, A., Lim, S., Phillips, J.B. et al.**, (2018). Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immuno-metabolism. *Frontiers in immunology*, 9: 1-19. doi.org/10.3389/fimmu.2018.01605
- Arai, K., Lok, J., Guo, S. et al.**, (2011). Cellular mechanisms of neurovascular damage and repair after stroke. *Journal of child neurology*, 26: 1193-98. doi.org/10.1177/0883073811408610
- Ashrafi, G., Schwarz, T.L.** (2013). The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 20: 31-42. doi.org/10.1038/cdd.2012.81
- Avan, A., Digaleh, H., Di Napoli, M. et al.**, (2019). Socioeconomic status and stroke incidence, prevalence, mortality, and worldwide burden: an ecological analysis from the Global Burden of Disease Study 2017. *BMC medicine*, 17: 1-30. doi.org/10.1186/s12916-019-1397-3
- Biernaskie, J., Chernenko, G., Corbett, D.** (2004). Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *Journal of Neuroscience*, 24: 1245-54. [10.1523/JNEUROSCI.3834-03.2004](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3834-03.2004)
- Caleo, M.** (2015). Rehabilitation and plasticity following stroke: Insights from rodent models. *Neuroscience*, 311 180-94. doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.10.029
- Casals, J.B., Pieri, N.C., Feitosa, M.L. et al.**, (2011). The use of animal models for stroke research: a review. *Comparative medicine*, 61: 305-13. PMID: [22330245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22330245/)

- Casas, A.I., Dao, V.T.V., Daiber, A. et al.**, (2015). Reactive oxygen-related diseases: therapeutic targets and emerging clinical indications. *Antioxidants & redox signaling*, 23: 1171-85. doi.org/10.1089/ars.2015.6433
- Chatfield, K.C., Sparagna, G.C., Chau, S. et al.**, (2019). Elamipretide improves mitochondrial function in the failing human heart. *JACC: Basic to Translational Science*, 4: 147-57. [10.1016/j.jacbts.2018.12.005](https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.12.005)
- Chen, S.D., Yang, D.I., Lin, T.K. et al.**, (2011). Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *International journal of molecular sciences*, 12: 7199-15. doi.org/10.3390/ijms12107199
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E. et al.**, (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 515: 431-35. doi.org/10.1038/nature13909
- Cook, M.J.** (1965). The anatomy of the laboratory mouse. **In:** *The anatomy of the laboratory mouse*, 74-5.
- Dard, L., Blanchard, W., Hubert, C. et al.**, (2020). Mitochondrial functions and rare diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 71: 1-28. doi.org/10.1016/j.mam.2019.100842
- de Souza Breda, C.N., Davanzo, G.G., Basso, P.J. et al.**, (2019). Mitochondria as central hub of the immune system. *Redox biology*, 26: 1-17. doi.org/10.1016/j.redox.2019.101255
- Diezi, M., Buclin, T., Kuntzer, T.** (2013). Toxic and drug-induced peripheral neuropathies: updates on causes, mechanisms and management. *Current opinion in neurology*, 26: 481-88. [10.1097/WCO.0b013e328364eb07](https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328364eb07)
- Fan, J., Dawson, T.M., Dawson, V.L.** (2017). Cell death mechanisms of neurodegeneration. *In Neurodegenerative Diseases*, 15: 403-25. [10.1007/978-3-319-57193-5_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57193-5_16)
- Fernández-Vizarra, E., Enríquez, J.A., Pérez-Martos, A. et al.**, (2011). Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion*, 11: 207-13. doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.011
- Fluri, F., Schuhmann, M.K., Kleinschnitz, C.** (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug design, development and therapy*, 9: 3445-54. [10.2147/DDDT.S56071](https://doi.org/10.2147/DDDT.S56071)
- Friedman, J.R., Nunnari, J.** (2014). Mitochondrial form and function. *Nature*, 505: 335-43. doi.org/10.1038/nature12985
- Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S. et al.**, (2016). Mitochondrial diseases. *Nature reviews Disease primers*, 2: 1-22. doi.org/10.1038/nrdp.2016.80

- Guzik, A., Bushnell, C.** (2017). Stroke epidemiology and risk factor management. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 23: 15-39. [10.1212/CON.0000000000000416](https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000416)
- Hathidara, M.Y., Saini, V., Malik, A.M.** (2019). Stroke in the Young: a Global Update. *Current neurology and neuroscience reports*, 19: 1-8. doi.org/10.1007/s11910-019-1004-1
- He, Z., Ning, N., Zhou, Q. et al.,** (2020). Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 146: 45-58. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005
- Herson, P.S., Traystman, R.J.** (2014). Animal models of stroke: translational potential at present and in 2050. *Future neurology*, 9: 541-51. doi.org/10.2217/fnl.14.44
- Huang, M.L.H., Chiang, S., Kalinowski, D.S. et al.,** (2019). The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019: 1-26. [10.1155/2019/6392763](https://doi.org/10.1155/2019/6392763)
- Hylin, M.J., Kerr, A.L., Holden, R.** (2017). Understanding the mechanisms of recovery and/or compensation following injury. *Neural plasticity*, 2017: 1-12. doi.org/10.1155/2017/7125057
- Johnson, C.O., Nguyen, M., Roth, G.A. et al.,** (2019). Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18: 439-58. [doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30034-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30034-1)
- Jones, M.R., Urits, I., Wolf, J. et al.,** (2019). Drug-Induced Peripheral Neuropathy, a Narrative Review. *Current clinical pharmacology*, 14: 1-11. [10.2174/1574884714666190121154813](https://doi.org/10.2174/1574884714666190121154813)
- Kanungo, S., Morton, J., Neelakantan, M. et al.,** (2018). Mitochondrial disorders. *Annals of translational medicine*, 6: 1-17. [10.21037/atm.2018.12.13](https://doi.org/10.21037/atm.2018.12.13)
- Karsy, M., Brock, A., Guan, J. et al.,** (2017). Neuroprotective strategies and the underlying molecular basis of cerebrovascular stroke. *Neurosurgical focus*, 42: 1-15. doi.org/10.3171/2017.1.FOCUS16522
- Kaur, H., Prakash, A., Medhi, B.** (2013). Drug therapy in stroke: from preclinical to clinical studies. *Pharmacology*, 92: 324-34. doi.org/10.1159/000356320
- Kausar, S., Wang, F., Cui, H.** (2018). The role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its implications for neurodegenerative diseases. *Cells*, 7: 1-19. [10.3390/cells7120274](https://doi.org/10.3390/cells7120274)
- Kelly, P.J., Kavanagh, E., Murphy, S.** (2016). Stroke: New Developments and Their Application in Clinical Practice. *In Seminars in neurology*, 36: 317-23. [10.1055/s-0036-1586261](https://doi.org/10.1055/s-0036-1586261)

- Kernan, W.N., Ovbiagele, B., Black, H.R. et al.**, (2014). Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 45: 2160-36. doi.org/10.1161/STR.0000000000000024
- Kim, J.S.** (2019). tPA helpers in the treatment of acute ischemic stroke: are they ready for clinical use? *Journal of stroke*, 21: 160-74. doi.org/10.5853/jos.2019.00584
- Kühlbrandt, W.** (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology*, 13: 1-11. doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x
- Kukat, C., Davies, K.M., Wurm, C.A. et al.**, (2015). Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 11288-93. [10.1073/pnas.1512131112](https://doi.org/10.1073/pnas.1512131112)
- Kumar, A., Gupta, V.** (2016). A review on animal models of stroke: An update. *Brain research bulletin*, 122: 35-44. doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.02.016
- Lackland, D.T., Roccella, E.J., Deutsch, A.F. et al.**, (2014). Factors influencing the decline in stroke mortality: a statement from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 45: 315-53. doi.org/10.1161/01.str.0000437068.30550.cf
- Li, P.A., Hou, X., Hao, S.** (2017). Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration. *Journal of neuroscience research*, 95: 2025-29. doi.org/10.1002/jnr.24042
- Liu, F., Lu, J., Manaenko, A. et al.**, (2018). Mitochondria in ischemic stroke: new insight and implications. *Aging and disease*, 9: 924-37. [10.14336/AD.2017.1126](https://doi.org/10.14336/AD.2017.1126)
- Llopis, J., McCaffery, J.M., Miyawaki, A. et al.**, (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 6803-08. [10.1073/pnas.95.12.6803](https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6803)
- Loubinoux, I., Brihmat, N., Castel-Lacanal, E. et al.**, (2017). Cerebral imaging of post-stroke plasticity and tissue repair. *Revue neurologique*, 173: 577-83. doi.org/10.1016/j.neurol.2017.09.007
- Macrae, I.M.** (2011). Preclinical stroke research—advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *British journal of pharmacology*, 164: 1062-78. doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01398.x
- Mannella, C.A.** (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1763: 542-48. doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.006
- McCabe, C., Arroja, M.M., Reid, E. et al.**, (2018). Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra. *Neuropharmacology*, 134: 169-77. doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.022

- McFarland, R., Taylor, R.W., Turnbull, D.M.** (2010). A neurological perspective on mitochondrial disease. *The Lancet Neurology*, 9: 829-40. [doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70116-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70116-2)
- Mergenthaler, P., Meisel, A.** (2012). Do stroke models model stroke? *Disease models & mechanisms*, 5: 718-25. [10.1242/dmm.010033](https://doi.org/10.1242/dmm.010033)
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191: 144-48. doi.org/10.1038/191144a0
- MitoPedia: SUIT.** MitoPedia: SUIT - Substrate-uncoupler-inhibitor titration protocols. [tiešsaiste] – [atsauce 21.03.2020.] Pieejams: https://www.bioblast.at/index.php/MitoPedia:_SUIT#All_SUIT_protocols
- Modig, K., Talbäck, M., Ziegler, L. et al.,** (2019). Temporal trends in incidence, recurrence and prevalence of stroke in an era of ageing populations, a longitudinal study of the total Swedish population. *BMC geriatrics*, 19: 1-9. [10.1186/s12877-019-1050-1](https://doi.org/10.1186/s12877-019-1050-1)
- Molnar, M.J., Kovacs, G.G.** (2018). Mitochondrial diseases. In: *Handbook of clinical neurology*, 147-55.
- Moskowitz, M.A., Lo, E.H., Iadecola, C.** (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 67: 181-98. doi.org/10.1016/j.neuron.2010.07.002
- Motyer, R., Asadi, H., Thornton, J. et al.,** (2018). Current evidence for endovascular therapy in stroke and remaining uncertainties. *Journal of internal medicine*, 283: 2-15. doi.org/10.1111/joim.12653
- Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R.S. et al.,** (2016). Mitochondrial function, biology, and role in disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, 118: 1960-91. doi.org/10.1161/RES.0000000000000104
- Murphy, T.H., Corbett, D.** (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 861-72. doi.org/10.1038/nrn2735
- Nguyen, H., Zarriello, S., Rajani, M. et al.,** (2018). Understanding the role of dysfunctional and healthy mitochondria in stroke pathology and its treatment. *International journal of molecular sciences*, 19: 1-20. doi.org/10.3390/ijms19072127
- Niyazov, D.M., Kahler, S.G., Frye, R.E.** (2016). Primary mitochondrial disease and secondary mitochondrial dysfunction: importance of distinction for diagnosis and treatment. *Molecular syndromology*, 7: 122-37. doi.org/10.1159/000446586
- Nunnari, J., Suomalainen, A.** (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*, 148: 1145-59. doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035

- Osellame, L.D., Blacker, T.S., Duchon, M.R.** (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 26: 711-23. doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003
- Ovbiagele, B., Nguyen-Huynh, M.N.** (2011). Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics*, 8: 319-29. doi.org/10.1007/s13311-011-0053-1
- Pandya, J.D., Royland, J.E., MacPhail, R.C. et al.**, (2016). Age-and brain region-specific differences in mitochondrial bioenergetics in Brown Norway rats. *Neurobiology of aging*, 42: 25-34. doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.027
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V. et al.**, (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837: 408-17. doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006
- Pizzorno, J.** (2014). Mitochondria—fundamental to life and health. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, 13: 8-15. PMID: [26770084](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26770084/)
- Reutzel, M., Grewal, R., Dilberger, B. et al.**, (2020). Cerebral Mitochondrial Function and Cognitive Performance during Aging: A Longitudinal Study in NMRI Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020: 1-12. doi.org/10.1155/2020/4060769
- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., Kamikawa, R.** (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Current Biology*, 27: 1177-92. doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015
- Roy-O'Reilly, M., McCullough, L.D.** (2018). Age and sex are critical factors in ischemic stroke pathology. *Endocrinology*, 159: 3120-31. doi.org/10.1210/en.2018-00465
- Russo, E., Nguyen, H., Lippert, T. et al.**, (2018). Mitochondrial targeting as a novel therapy for stroke. *Brain circulation*, 4: 84-94. [10.4103/bc.bc_14_18](https://doi.org/10.4103/bc.bc_14_18)
- Sacco, R.L., Kasner, S.E., Broderick, J.P. et al.**, (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 44: 2064-89. doi.org/10.1161/STR.0b013e318296aeca
- Scorrano, L.** (2013). Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *European journal of clinical investigation*, 43: 886-93. doi.org/10.1111/eci.12135
- Shaughnessy, D.T., McAllister, K., Worth, L. et al.**, (2014). Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environmental health perspectives*, 122: 1271-78. doi.org/10.1289/ehp.1408418
- Slimību profilakses un kontroles centrs (SPKC).** Statistikas dati par iedzīvotāju mirstību, 2019. [tiešsaiste] – [atsauce 15.02.2020.] Pieejams: <https://spkc.gov.lv/lv/statistika-un-petijumi/statistika/veselibas-aprupes-statistika1>

- Sommer, C.J.** (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133: 245-61. doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0
- Sorensen, A.G., Ay, H.** (2011). Transient ischemic attack: definition, diagnosis, and risk stratification. *Neuroimaging Clinics*, 21: 303-13. doi.org/10.1016/j.nic.2011.01.013
- Spinelli, J.B., Haigis, M.C.** (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature cell biology*, 20: 745-54. doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1
- Sprenger, H.G., Langer, T.** (2019). The good and the bad of mitochondrial breakups. *Trends in cell biology*, 29: 888-900. doi.org/10.1016/j.tcb.2019.08.003
- Suomalainen, A., Battersby, B.J.** (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19: 77-92. doi.org/10.1038/nrm.2017.66
- Takahashi, K., Ohsawa, I., Shirasawa, T. et al.,** (2016). Early-onset motor impairment and increased accumulation of phosphorylated α -synuclein in the motor cortex of normal aging mice are ameliorated by coenzyme Q. *Experimental gerontology*, 81: 65-75. doi.org/10.1016/j.exger.2016.04.023
- Tan, D.Q., Suda, T.** (2018). Reactive oxygen species and mitochondrial homeostasis as regulators of stem cell fate and function. *Antioxidants & redox signaling*, 29: 149-68. doi.org/10.1089/ars.2017.7273
- Tang, Y.C., Tian, H.X., Yi, T. et al.,** (2016). The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein & cell*, 7: 699-713. doi.org/10.1007/s13238-016-0307-0
- Thomas, L.W., Ashcroft, M.** (2019). Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76: 1759-77. doi.org/10.1007/s00018-019-03039-y
- Virani, S.S., Alonso, A., Benjamin, E.J. et al.,** (2020). Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141: 139-596. doi.org/10.1161/CIR.0000000000000757
- Wayman, C., Duricki, D.A., Roy, L.A. et al.,** (2016). Performing permanent distal middle cerebral with common carotid artery occlusion in aged rats to study cortical ischemia with sustained disability. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 108: 1-12. [10.3791/53106](https://doi.org/10.3791/53106)
- Weissig, V.** (2019). Drug Development for the Therapy of Mitochondrial Diseases. *Trends in molecular medicine*, 26: 50-57. doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.002
- Weng, M.S., Chang, J.H., Hung, W.Y. et al.,** (2018). The interplay of reactive oxygen species and the epidermal growth factor receptor in tumor progression and drug resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37: 1-11. doi.org/10.1186/s13046-018-0728-0

- Ylikallio, E., Suomalainen, A.** (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of medicine*, 44: 41-59. doi.org/10.3109/07853890.2011.598547
- Zāļu valsts aģentūra (ZVA).** Latvijas zāļu reģistrs. [tiešsaiste] – [atsauce 16.03.2020.]
Pieejams: <https://www.zva.gov.lv/zvais/zalu-registrs/>
- Zhang, Z.G., Buller, B., Chopp, M.** (2019). Exosomes—beyond stem cells for restorative therapy in stroke and neurological injury. *Nature Reviews Neurology*, 15: 193-203. doi.org/10.1038/s41582-018-0126-4
- Zhang, Z.G., Chopp, M.** (2015). Promoting brain remodeling to aid in stroke recovery. *Trends in molecular medicine*, 21: 543-48. doi.org/10.1016/j.molmed.2015.07.005
- Zhao, L.R., Willing, A.** (2018). Enhancing endogenous capacity to repair a stroke-damaged brain: An evolving field for stroke research. *Progress in neurobiology*, 163: 5-26. doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.01.004
- Zille, M., Ikhsan, M., Jiang, Y. et al.,** (2019). The impact of endothelial cell death in the brain and its role after stroke: A systematic review. *Cell Stress*, 3: 330-47. [10.15698/cst2019.11.203](https://doi.org/10.15698/cst2019.11.203)

PIELIKUMI

1. pielikums

Darba protokolam (SUIT-001/008) nepieciešamais reaģentu saraksts, autora sastādīta tabula

Nosaukums	Mērķis	O2k titranta simbols	Šķīdinātājs	Titranta konc. (c=mM)
Glutamīnskābe (glutamāts)	SUIT	G	H ₂ O	10
L-oksizintarskābe (malāts)	SUIT	M	H ₂ O	2
L-pirovīnogskābe (piruvāts)	SUIT	P	H ₂ O	5
Dzintarskābe (sukcināts)	SUIT	S	H ₂ O	10
Citohroms <i>c</i>	Mt-membrānas integritātes noteikšanai	c	H ₂ O	0,01
Adenozīndifosfāta kālija sāls	SUIT	D	H ₂ O-(Mg)	2,5
Glicerolfosfāts	SUIT	Gp	H ₂ O	10
Karbonilcianīda 3- hlorofenilhidrazons (CCCP)	Fosforilēšanās atjūdzējs	U	Dimetilsulfoksīds (DMSO)	0,5
Rotenons	Blokators	Rot	EtOH	0,5
Antimicīns A	Blokators	AmA	EtOH	2,5

MiRO₅ buferšķīdumam (V=1000mL) nepieciešamo reaģentu saraksts, autora sastādīta tabula

Sastāvdaļas	Koncentrācija šķīdumā (C _{beigu} ,mM)	Masa, g	Ražotājs, valsts	Raksturojums
Etilēndiamīntetraetiķskābe (EGTA)	0,5	0,190	<i>Sigma- Aldrich,</i> ASV	Smago metālu helators, augsta afinitāte pret Ca ²⁺
Bezūdens magnija hlorīds (MgCl ₂)	3	0,286	<i>Sigma- Aldrich,</i> ASV	Vitāli nepieciešams ATF-āzes darbībai un ATF sintēzei
Laktobionskābe	60	21,498	<i>Sigma- Aldrich,</i> ASV	Mitohondriju intracelulārā K ⁺ nodrošināšanai
Taurīns	20	2,502	<i>Sigma- Aldrich,</i> ASV	Mitohondriju membrānu stabilizators
Monokālīja fosfāts (KH ₂ PO ₄)	10	1,361	<i>Merck,</i> Vācija	Sekmē enzīmātisko reakciju darbību
Piperazīnetānsulfonskābe (HEPES)	20	4,77	<i>Sigma- Aldrich,</i> ASV	Vispārpieņemts savienojums buferšķīdumu gatavošanā
D-saharoze	110	37,65	<i>Sigma- Aldrich,</i> ASV	Sekmē šķīduma izotoniskumu
Vērša seruma albumīns (BSA)	1 (g/L)	1	<i>Sigma- Aldrich,</i> ASV	Mitohondriju membrānu stabilizators

**Mitohondriju skābekļa patēriņa noteikšanai izmantotā SUIT-001/008 protokola secīgums,
substrātu atšifrējums un nozīme autora sastādīta tabula**

Pievienošanas secīgums	Substrāts/ reaģents	Komplekss	Nozīme, komentāri
0Mt	Mt Thom	-	-
1(P)M	Piruvāts	CI (Komplekss I)	NADH- saistītais substrāts. <i>Leak</i> (L), t.s., nefosforilējošais – miera stāvoklis, bez pievienotiem adenilātiem
1P(M)	Malāts	CI (Komplekss I)	NADH- saistītais substrāts. <i>Leak</i> (L), t.s., nefosforilējošais – miera stāvoklis, bez pievienotiem adenilātiem
2D	ADP	CI (Komplekss I)	NADH- saistītais substrāts. Aktīvs OXPHOS (P) stāvoklis, pieaug skābekļa patēriņš
2c	Citohroms <i>c</i>	CI (Komplekss I)	Mitohondriju ārējās membrānas integritātes noteikšanai
3G	Glutamāts	CI (Komplekss I)	NADH- saistītais substrāts. Aktīvs OXPHOS (P) stāvoklis, skābekļa patēriņš atkārtoti pieaug
4S	Sukcināts	CI & CII (Komplekss I un II)	Pastiprina Krebsa cikla aktivitāti. Aktīvs OXPHOS (P) stāvoklis, skābekļa patēriņš atkārtoti pieaug
5U	Atjūdzējs (CCCP)	CI & CII (Komplekss I un II)	Elpošanas jeb fosforilēšanās atjūdzējs. Tiek sasniegts max. skābekļa patēriņš un max. elektronu pārnese kapacitāte. Atjūgšanas stāvoklis
6Rot	Rotenons	CII (Komplekss II)	Pirmā elektronu pārnese kompleksa blokators
7Gp	Glicerolfosfāts	CII & GpDH (Komplekss II un glicerolfosfāta dehidrogenāze)	ET stāvoklis. Pastiprina glikolīzi, palielina skābekļa patēriņu
8Ama	Antimicīns A	-	Trešā elektronu pārnese kompleksa blokators, izmanto reziduālā skābekļa noteikšanai (ROX)

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs

izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Recenzents: _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Maģistra darbs aizstāvēts maģistra studiju programmas „Farmācija” Maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2020., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: docente, Kristīne Saleniece, dr.pharm. _____
(paraksts)