

**LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE**

**EVITA ROSTOKA**

**BRĪVO RADIKĀĻU UN DNS PĀRRĀVUMU FARMAKOĻĒGĪSKĀ  
KOREKCIJA**

**Promocijas darbs**

**Doktora grāda iegūšanai medicīnas nozarē  
Apakšnozare: medicīniskā bioķīmija**

**Rīga, 2015**

Promocijas darbs tika izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē, Medicīniskās bioķīmijas katedrā; Latvijas Organiskās sintēzes institūta Bioķīmijas grupā; Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Endokrinoloģijas centrā laika posmā no 2007. līdz 2014. gadam.



Šis darbs ir izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā „Jaunas starpnozarju grupas izveide efektīvu diabētiskās nefropātijas ārstēšanas līdzekļu meklējumiem” (Nr. 1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/002).

Darbs sastāv sekojošām nodaļām- ievads, literatūras apskats, materiāli un metodes, rezultāti un diskusija, secinājumi, publikācijas, ziņojumi par pētījuma tēmu, pateicības, literatūras saraksts un pielikumi.

Darba forma: disertācija medicīnas nozarē, medicīniskās bioķīmijas apakšnozarē

Darba zinātniskais vadītājs: **prof. Dr. habil. biol. Nikolajs Sjakste**

Darba recenzenti:

- 1) asoc. prof. Dr. biol. **Una Riekstiņa**, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte
- 2) asoc. prof. Dr. biol. **Andrejs Šķesters**, Rīgas Stradiņa universitātes Bioķīmijas laboratorija
- 3) prof. Dr. habil. biol. **Ilja Zavodniks**, Jankas Kupalas Grodņas Valsts universitātes Bioķīmijas katedra

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 23. septembrī plkst. 14.00 Latvijas Universitātes Muzeja zālē, Raiņa bulvārī 19, Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Medicīnas, farmācijas un bioloģijas nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs \_\_\_\_\_ /*prof. Dr. med. Valdis Pīrāgs*/

padomes sekretāre \_\_\_\_\_ /*Dr. pharm. Kristīne Saleniece*/

© Latvijas Universitāte, 2015

© Evita Rostoka, 2015

## KOPSAVILKUMS

Pastiprināta brīvo radikāļu veidošanās dažādu vides un organisma patoloģisko stāvokļu ietekmē var izraisīt nevēlamas komplikācijas. To starpā DNS integritātes izmaiņas un mutācijas, tādējādi izmainot šūnas aktivitāti un funkciju bioloģiskajos procesos, kas var izraisīt slimību vai slimību komplikāciju attīstību.

Promocijas darba mērķis bija eksperimentāli pārbaudīt dabas vielu un LOSI sintezēto 1,4-DHP atvasinājumu spēju neitralizēt brīvos radikāļus, koriģēt slāpekļa oksīda sintēzes ceļus un pasargāt DNS molekulas integritāti oksidatīvā un nitrozatīvā stresa apstākļos.

Tika izpētīta dabas vielu: baikaleīna, luteolīna, kemferola, miricetīna, kvercetinā, indol-3-karbinola, likopēna, kafijskābes estera, ellagskābes un resveratrola, ietekme uz slāpekļa oksīda un iNOS mRNS un proteīnu līmeņiem LPS inducētā akūtā iekaisuma apstākļos. Otrā dzīvnieku modeļa ietvaros, tika izanalizēta 1,4-DHP: J-9-125, etkarbatona, metkarbatona, glutapirona, AV-153-Na, un flavonola miricetīna slāpekļa oksīda sintēzi regulējošās un DNS integritāti pasargājošās īpašības STZ izraisītā 1TCD apstākļos. Kā arī pacientiem ar 1TCD tika izpētīts DNS pārrāvumu līmenis un to korekcijas iespējas ar AV-153-Na *ex vivo*.

Mūsu iegūtie dati liecina, ka apskatītās dabas vielas LPS stimulētās sepses apstākļos darbojas organospecifiski, ietekmējot iNOS biosintēzi dažādos līmeņos. Potenciālākais slāpekļa oksīda produkcijas inhibitors bija luteolīns, kas normalizēja aknās gan iNOS gēna, gan proteīna ekspresijas līmeņus un arī slāpekļa oksīda produkciju asinīs, kā arī indol-3-karbinola un kvercetinā noteiktu koncentrāciju kombinācija samazināja NO<sup>·</sup> koncentrāciju vairākos orgānos LPS inducētās sepses apstākļos.

1,4-DHP atvasinājumi, neskatoties uz savu strukturālo līdzību, uzrādīja aktivitāti dažādos slāpekļa oksīda biosintēzes posmos un tiešā vai netiešā veidā ietekmējot DNS molekulas integritāti. DNS pārrāvumu līmenis 1TCD pacientu asinīs bija augstāks nekā kontroles grupā, ko veiksmīgi samazināja AV-153-Na.

Tādējādi var secināt, ka dabas vielas un 1,4-DHP var koriģēt slāpekļa oksīda un slāpekļa oksīda sintāžu līmeņus audos, kā arī 1,4-DHP var tik uzskatīti par potenciālām DNS molekulas integritāti pasargājošām vielām.

**Atslēgvārdi:** NO<sup>·</sup>, iNOS, eNOS, DNS pārrāvumi, 1,4- dihidropiridīni, dabas vielas

## SATURS

KOPSAVILKUMS .....	3
IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI.....	8
IEVADS.....	11
DARBA MĒRĶIS .....	12
DARBA UZDEVUMI .....	12
DARBA HIPOTĒZE .....	13
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	14
1.1. Brīvie radikāļi.....	14
1.1.1. Slāpekļa oksīds .....	14
1.1.2. Slāpekļa oksīda sintāzes (EC 1.14.13.39) struktūra un NO biosintēze.....	17
1.1.3. Inducējamā slāpekļa oksīda sintāze.....	18
1.1.4. Endoteliālā slāpekļa oksīda sintāze .....	21
1.1.5. Neironālā slāpekļa oksīda sintāze.....	22
1.1.6. Superoksīda radikālis, hidroksilradikālis, ūdeņraža pārskābe .....	23
1.2. DNS oksidatīvie bojājumi un to reparācija .....	25
1.3. Oksidatīvā stresa modeļi .....	32
1.3.1. Streptozotocīna izsauktais 1. tipa cukura diabēts .....	32
1.3.2. Lipopolisaharīda inducētā sepse.....	34
1.4. Flavonoīdi.....	37
1.4.1. Flavonu grupas dabas vielas .....	39
1.4.2. Flavonolu grupas dabas vielas .....	41
1.5. Karotinoīdu grupas dabas vielas .....	44
1.5.1. Likopēns .....	44
1.6. Alkoloīdu grupas dabas vielas .....	45
1.6.1. Indol-3-karbinols .....	45
1.7. Polifenolu grupas dabas vielas .....	46
1.7.1. Kafijskābes esteris .....	46
1.7.2. Ellagskābe.....	46
1.7.3. Resveratrols .....	47
1.8. Dabas vielu saistība ar DNS un to toksicitāte .....	47
1.9. 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumi.....	48
2. MATERIĀLI UN METODES .....	56
2.1. Klīniskais pētījums, analizējamās grupas raksturojums.....	56
2.2. Eksperimentālie dzīvnieki .....	56

2.2.1. Akūta iekaisuma modeļa ierosināšana, eksperimenta dizains un vielu ievadīšana .....	57
2.2.2. 1. tipa cukura diabēta modeļa ierosināšana, eksperimenta dizains un vielu ievadīšana .....	58
2.3. Materiāli .....	59
2.4. Metodes .....	60
2.4.1. Vienas šūnas elektroforēze sārmainos apstākļos .....	60
2.4.2. RNS izolēšana, attīrīšana, cDNS sintēze .....	61
2.4.3. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija .....	62
2.4.4. Slāpekļa oksīda koncentrācijas noteikšana audos un asinīs .....	63
2.4.5. Imūnhistoķīmija.....	64
2.4.6. Nitrātu/nitrītu koncentrācijas noteikšana dzīvnieku asins serumā un urīnā.....	64
2.4.7. Glikozes līmeņa pārbaude dzīvnieku asinīs.....	65
2.4.8. 1,4-DHP DNS vienpavedienu reparējošo īpašību analīze 1TCD pacientu asinīs <i>ex vivo</i> .....	65
2.4.9. EPR spektrometrijas metode <i>in vitro</i> .....	65
2.4.10. Plazmīdas DNS izdalīšana no <i>Escherichia coli</i> .....	66
2.4.11. DNS bojājumu analīze Fentona reakcijas apstākļos 1,4-DHP klātbūtnē..	67
2.4.12. Datu statistiskā apstrāde .....	68
3. REZULTĀTI.....	69
3.1. Dabas vielu efekts uz slāpekļa oksīda sintēzi LPS inducētā akūtā iekaisuma apstākļos dažādos orgānos žurkās .....	69
3.1.1. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku aknās lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē .....	69
3.1.2. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku smadzeņu garozā lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē .....	71
3.1.3. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dzīvnieku aknās lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē .....	72
3.1.4. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dzīvnieku smadzeņu garozā lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē .....	74

3.1.5. Slāpekļa oksīda koncentrācijas noteikšana ar EPR spektrometrijas metodi dažādos dzīvnieku audos lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē .....	75
3.2. DNS vienpavediena pārrāvumu, oksidatīvā un nitrozatīvā stresa korekcija ar 1,4-DHP un flavonolu, miricefīnu STZ stimulētā 1TCD apstākļos .....	93
3.2.1. Vienpavediena DNS pārrāvumu analīze ar vienas šūnas elektroforēzes metodi žurku streptozotocīna 1. tipa cukura diabēta modelī dažādu 1,4-DHP klātbūtnē .....	93
3.2.2. Endoteliālās slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku nierēs streptozotocīna 1TCD modelī 1,4-DHP klātbūtnē .....	97
3.2.3. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku nierēs streptozotocīna 1. tipa cukura diabēta modelī 1,4- DHP klātbūtnē .....	101
3.2.4. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dažādos dzīvnieku audos streptozotocīna inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī AV- 153- Na klātbūtnē.....	104
3.2.5. Endoteliālās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dažādos dzīvnieku audos streptozotocīna inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī AV- 153- Na klātbūtnē.....	106
3.2.6. Glikozes koncentrācijas kontrole veselajos dzīvniekos un STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos 1,4-DHP klātbūtnē.....	108
3.2.7. Nitrātu/nitrītu koncentrācijas svārstības veselajos dzīvniekos un STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos AV-153-Na, miricetīna un to kombinācijas klātbūtnē .....	108
3.3. Klīniskais pētījums.....	110
3.3.1. Vienpavediena DNS pārrāvumu analīze ar vienas šūnas elektroforēzes metodi 1. tipa cukura diabēta pacientu un indivīdos bez iepriekš diagnosticēta diabēta perifērajās venozajās asinīs šūnu kodolos.....	110
3.4. 1,4-DHP antiradikāļu un DNS molekulu pasargājošo īpašību analīze <i>in vitro</i> .....	111
3.4.1. DNS analīze <i>in vitro</i> neitrālos apstākļos Fentona reakcijas apstākļos 1,4-DHP klātbūtnē .....	111
3.4.2. 1,4- DHP spējas neitralizēt brīvos radikāļus izpēte ar EPR spektrometriju .....	112

3.4.3. Vienpavediena DNS pārrāvumu analīze ar vienas šūnas elektroforēzes metodi 1. tipa cukura diabēta pacientu un pacientos bez iepriekš diagnosticēta diabēta perifērajās venozajās asinīs AV-153-Na klātbūtnē .....	114
4. DISKUSIJA .....	116
4.1. Dabas vielu ietekme uz slāpekļa oksīda sintēzi LPS izsuktā iekaisuma modelī .....	116
4.1.1. Lipopolisaharīda izsuktā akūtā iekaisuma modeļa raksturojums .....	116
4.1.2. Flavonolu grupas pārstāvju nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana .....	117
4.1.3. Flavonu grupas pārstāvju nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana .....	119
4.1.4. Karotinoīdu nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana .....	121
4.1.5. Polifenolu nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana .....	122
4.1.6. Alkoloīdu nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana.....	124
4.2. 1, 4- dihidropiridīna atvasinājumu antioksidatīvo un DNS pasargājošo spēju analīze.....	126
4.2.1. Streptozotocīna izsuktā 1. tipa cukura diabēta modeļa raksturojums .....	126
4.2.2. Glutapirons .....	128
4.2.3. J-9-125 .....	129
4.2.4. Metkarbatons .....	131
4.2.5. Etkarbatons .....	132
4.2.6. AV-153-Na .....	132
4.3. Flavonolu grupas dabas vielas un to kombinācijas ar 1,4-DHP antioksidatīvo un DNS aizsargājošo spēju analīze 1. tipa cukura diabēta apstākļos .....	134
4.3.1. Miricetīns.....	134
4.3.2. 1,4- dihidropiridīna atvasinājuma, AV-153-Na, kombinācija ar flavonolu grupas pārstāvi, miricetīnu .....	136
4.4. 1,4- dihidropiridīnu hidroksilradikāli neitralizējošo īpašību analīze <i>in vitro</i> ..	136
4.5. DNS pārrāvumu līmeņa atšķirības 1. tipa cukura diabēta pacientu un pacientu bez autoimūnām saslimšanām perifēro venozo asiņu kodolu saturošajās šūnās....	138
5. SECINĀJUMI.....	140
6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU .....	141
7. PATEICĪBAS .....	143
8. IZMANTOTĀ LITERTŪRA.....	144
9. PIELIKUMI .....	164

## IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

H<sup>·</sup> – ūdeņraža radikālis  
μNOS-1 – nNOS paveids muskuļos  
1,4-DHP – 1,4-dihidropiridīnu grupas preparāti  
ITCD – 1. tipa cukura diabēts  
8-OH-Ade – 8-hidroksiadenīns  
8-OH-Gua – 8-hidroksiguanīns  
A – adenīns  
AP – abāziskas DNS vietas  
AP-1 – aktivēšanas proteīns 1  
APE1 – AP endonukleāze 1  
ARE – antioksidantu atbildes elementus  
ATP – adenoziņa trifosfāts  
AU – patvaļīgās vienības  
AVONA – vienfaktoru dispersijas analīzi  
BER – bāzu ekscīzijas reparācija  
BH<sub>4</sub> – tetrahidrobiopterīns  
bp – bāzu pāri  
C – citozīns  
Ca<sup>2+</sup> – kalcija jons  
CaM – kalmodulīns  
CaMKII – kalcija/kalmodulīna-atkarīgā proteīnkināze II  
cAMP – cikliskais adenoziņa monofosfāts  
CAT – katalāzes  
Ca<sub>v</sub>1-3 – kalcija kanāli  
Ca<sub>v</sub>2,2 – N-tipa kalcija kanāli  
cDNS – komplementārais DNS  
cGMP – cikliskais 3', 5'-guanozīnmonofosfāts  
C-H – oglekļa- ūdeņraža  
CO<sub>2</sub> – oglekļa dioksīds  
CO<sub>3</sub><sup>-</sup> – karbonāta radikālis  
COX – ciklooksigenāze  
Cu<sup>+</sup> – vara (I) jons  
DETC – dietiltiokarbamīds  
DIM – 3,3'-diindolilmetāns  
DMPO – 5,5 –dimetil-1-pirolīn-N-oksīds  
DMSO – dimetilsulfoksīds  
DNS – dezoksiribonukleīnskābe  
dRP – dezoksiribozesfosfāts  
EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrijs sāls  
eNOS – endoteliālās slāpekļa oksīda sintāze  
EPR – elektronparamagnētiskās rezonanse  
FAD – flavīnadenīndinukleotīds  
Fe<sup>2+</sup> – dzelzs (II) jons  
Fe<sup>3+</sup> – dzelzs (III) jons  
FeCl<sub>3</sub> – dzelzs (III) hlorīds  
FEN-1 – *flap endonuclease I*



FeSO<sub>4</sub> – dzelzs (II) sulfāts  
 FMN – flavīnmononukleotīds  
 GAPDH – glicerāldehīda-3-fosfāta dehidrogenāze  
 GLUT2 – glikozes transportētājproteīns 2  
 GPx – glutationa peroksidāze  
 H<sup>+</sup> – protoni  
 H<sub>2</sub>O – ūdens  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – ūdeņraža pārskābe  
 HCl – sālsskābe  
 i/p – intraperitoneāli  
 IFN<sub>γ</sub> – interferons gamma  
 IKK – IκB kināze  
 IL-1β – interleikīns 1 beta  
 IL-6 – interleikīns 6  
 iNOS – inducējamā slāpekļa oksīda sintāze  
 IRAK – interleikīna-1 receptoru asociētā kināze  
 IκB – kodola faktora kapa B inhibitors  
 JNK – Jun N- terminālkināzes  
 JNK/SAP – c-Jun N- terminālās kināzes/stresa aktivētas proteīnkināze  
 Keap 1 – *Kelch like ECH-associated protein*  
 LBP – LPS-saistošais proteīns  
 LOO<sup>·</sup> – lipīdu peroksīds  
 LOSI – Latvijas Organiskās sintēzes institūts  
 LP-BER – „ielāpa” reparācija  
 LPS – lipopolisaharīds  
 MAPK – mitogēnu-aktivētās proteīnkināzes  
 mCD14 – monocītu diferenciācijas klusters 14  
 MD-2 – limfocītu antigēns 96  
 metHB – methemoglobīns  
 MyD88 – mieloīdās diferenciācijas primārās atbildes proteīns 88  
 MYH – *Escherichia coli* MutY DNS glikozidāzes homologs  
 MnSOD – mangānsuperoksīddismutāze  
 mRNS – matricas ribonukleīnskābe  
 N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – dislāpekļa trioksīds  
 N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – dislāpekļa tetoksīds  
 Na<sup>+</sup> – nātrijs jons  
 NaCl - nātrijs hlorīds  
 NADH – nikotīnamīdadenīdinukleotīds  
 NADPH – nikotīnamīdadenīdinukleotīdfosfāts  
 NADPH oksidāze - nikotīnamīdadenīdinukleotīdfosfāta oksidāze  
 NaOH – nātrijs hidroksīds  
 NEI – endonukleāze VIII, 5-formiluracil/5-hidroksimetiluracil DNS glikozidāze  
 NF-κB – kodola faktors kapa B  
 -NH<sub>2</sub> – aminogrūpa  
 nNOS – neironālā slāpekļa oksīda sintāze  
 NO<sup>+</sup> – nitrozonijs jons  
 NO<sup>·</sup> – slāpekļa oksīds  
 NO<sub>2</sub> – slāpekļa dioksīds  
 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – nitrīts jons

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – nitrāts jons  
NOS – slāpekļa oksīda sintāze  
NOSI – neironālā slāpekļa oksīda sintāze  
NOSIII – endoteliālās slāpekļa oksīda sintāze  
NOX – NADPH oksidāze  
Nrft2 – *nuclear factor erythroid 2-related 2*  
NTH – DNS glikozidāze un apirimidīnisku vietu liāze (endonukleāze III)  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – superoksīda radikālis  
OGG1 – DNS 8-oksiguanīna glikozidāze  
OH<sup>-</sup> – hidroksilanjons  
OH<sup>·</sup> – hidroksilradikālis  
OksiHb[Fe(II)-O<sub>2</sub>] – oksihemoglobīns  
ONOO<sup>-</sup> – peroksinitrīts, peroksinitrītanjons  
p38 MAPK – mitogēnaktivētā proteīnkināze p-38  
p50 – NF-κB aktivitāti inhibējošā vienība p-50  
p53 – audzējsupresors p-53  
p65 – NF-κB aktivitāti inhibējošā vienība p-65  
PARP – poli-ADP-ribozes polimerāze  
PKC – proteīnkināze C  
PSD-93 – postsinaptiskais blīvuma proteīns 93  
PSD-95 – postsinaptiskais blīvuma proteīns 95  
PSKUS – Paula Stradiņa Klīniskā universitātes slimnīca  
RNOS – reaktīvie slāpekļa radikāļi  
RNS – ribonukleīnskābe  
ROS – reaktīvie skābekļa radikāļi  
RV – relatīvās vērtības  
S.E.M. – vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda  
SDS – nātrija dodecilsulfāts  
SF/AF – superspiralizētā forma/atvērto formu  
sGC – guanilātciklāzes  
SN-BER – viena nukleotīda ievietošanas reparācija  
SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> – sulfāts jons  
SOD – superoksīda dismutāze  
sONE – pretplūsmas mRNS molekulas  
SR-B1 – B klases tipa saistītājreceptoru 1. proteīna transportieris  
STATS-1 – signāla pārnēsētājs un transkripcijas aktivators 1  
STZ – streptozotocīns  
T – timīns  
TATA – promotera konsensus sekvenca  
TLR4 – troll-līdzīgais receptors 4  
TNF-α – tumonekrozesfaktors alfa  
TRAF6 – TNF receptora asociētais faktors 6  
Tris – tri(hidroksimetil)aminometāns  
U – uracils  
UTR – eNOS mRNS 3'-netranslējošais reģions  
UV – ultravioletais starojums

## IEVADS

Slāpekļa oksīds ir viena no vissvarīgākajām signālmolekulām zīdītāju organismos. 1998. gadā 12. oktobrī *Robert Furchgott, Lois Ignarro* un *Ferid Murad* saņēma Nobela prēmiju Medicīna un Fizioloģijā par to, ka pierādīja, ka slāpekļa oksīds ir signālmolekula kardiovaskulārajā sistēmā. Kopš tā laika interese par tās lomu organisma fizioloģiskajos un patoloģiskajos procesos neizsīkst. Fizioloģiskos apstākļos slāpekļa oksīda molekula ir iesaistīta signālpārnese ceļos un imūnajā atbildē. Tomēr nekontrolēti paaugstinoties NO<sup>•</sup> līmenim dažādos patoloģiskos organisma stāvokļos, tā iesaistās reakcijās ar bioloģiskajām molekulām un brīvajiem radikāļiem, izraisot bojājumus. Galvenie slāpekļa oksīda citotoksiskie efekti tiek realizēti ar NO<sup>•</sup> metabolīta, peroksinitrīta, starpniecību, tiešā vai netiešā veidā izsaucot DNS molekulas oksidatīvus bojājumus (Pacher et al., 2007). To neadekvātas reparācijas gadījumā var attīstīties citotoksiski un mutagēni efekti (Svilar et al., 2011), kas stimulē dažādu slimību vai komplikāciju attīstību. To parāda, piemēram, pētījumi, kur tika atrasts augstāks DNS pārrāvumu līmenis asins limfocītos pacientiem ar hepatītu C ar cirozes pazīmēm un hepatocellāro karcinomu nekā kontroles grupā un pacientiem, kuriem ir hepatīts C bez cirozes pazīmēm (Shawki et al., 2014). Savukārt, hroniskas nieru slimības apstākļos, hemodialīzes pacientiem paaugstināts DNS bojājumu līmenis limfocītos korelē ar kardiovaskulāro komplikāciju attīstību un vēža incidenci (Corredor et al., 2014). Tādējādi ir būtiski atrast vielas, kas uzrādītu DNS molekulas integritāti pasargājošas īpašības paaugstināta riska apstākļos.

Flavonoīdu grupas dabas vielas ir mazas molekulas, kas brīvi difundē šūnā un var mijiedarboties ar DNS molekulu (Rusak et al., 2010). Tām piemīt brīvo radikāļu neitralizējošas īpašības un ir dati par to spēju reaģēt ar peroksinitrītu (Heijnen et al., 2001b), tādā veidā inaktivējot toksisko molekulu. Dabas vielas nomāc iNOS ekspresiju, kas ir atbildīgs par pārmērīgu slāpekļa oksīda līmeņa pieaugumu (Augustyniak et al., 2010).

1,4- dihidropiridīnu atvasinājumi ir cita vielu grupa, kas uzrāda antioksidatīvas un peroksinitrīta molekulu neitralizējošas īpašības (Lopez-Alarcon et al., 2004; Augustyniak et al., 2010), ka arī ir dati, ka 1,4-DHP atvasinājumi nomāc iNOS produkciju (Tan et al., 2008; Altamirano et al., 2013) tādējādi samazinot peroksinitrīta veidošanās iespējamību.

Latvijas Organiskās sintēzes institūtā sintezētie 1,4- DHP atvasinājumi jau ir uzradījuši antiradikāļu, antioksidatīvas (Lovakovic et al., 2011) un DNS molekulu pasargājošās īpašības *in vitro* (Ryabokon et al., 2005).

Mūsu pētījuma rezultāti parāda dabas vielu spēju ietekmēt slāpekļa oksīda un iNOS produkciju dažādos orgānos akūta iekaisuma apstākļos un Latvijas Organiskās sintēzes institūtā sintezētu 1,4-DHP atvasinājumu antioksidatīvās un antiradikāļu īpašības *in vitro*, kā arī to spēju modulēt slāpekļa oksīda sintāžu līmeņus un ietekmēt DNS molekulas integritāti *in vivo*.

Promocijas darba eksperimentālā daļa ir izstrādāta Latvijas Organiskās sintēzes institūta Bioķīmijas grupā un Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Medicīniskās bioloģijas katedrā.

## **DARBA MĒRĶIS**

Eksperimentāli noskaidrot dabas un LOSI sintezēto 1,4-DHP atvasinājumu antioksidatīvās, antiradikāļu un DNS molekulas integritāti pasargājošas īpašības oksidatīvā un nitrozatīvā stresa apstākļos.

## **DARBA UZDEVUMI**

1. Noskaidrot flavonu: baikaleīna, luteolīna, un to kombināciju spēju ietekmēt slāpekļa oksīda produkciju LPS stimulētā akūtā iekaisuma apstākļos žurkās.
2. Izanalizēt flavonolu: kvercetīna, kemferola un miricetīna, slāpekļa oksīda līmeni modulējošās īpašības LPS stimulētā akūtā iekaisuma apstākļos žurkās.
3. Izpētīt LPS inducētā akūtā iekaisuma izraisītās slāpekļa oksīda produkcijas izmaiņas žurkās karotinoīda likopēna klātbūtnē.
4. Pārbaudīt polifenolu savienojumu: kafijskābes estera, ellagskābes, resveratrola, slāpekļa oksīda produkciju ietekmējošas īpašības žurkās pēc akūta iekaisuma inducēšanās ar lipopolisaharīdu.
5. Pārbaudīt indol-3-karbinola un tā kombinācijas ar kvercetīnu spēju mazināt slāpekļa oksīda produkciju LPS inducētā iekaisuma apstākļos.
6. Izpētīt 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumu: AV-153-Na, etkarbatona, metkarbatona, J-9-125, kā arī flavonola miricetīna spēju modulēt slāpekļa

oksīda sintāžu: iNOS un eNOS ekspresiju un saglabāt DNS integritāti streptozotocīna inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos žurkās.

7. Salīdzināt DNS vienpavedienu pārrāvumu līmeni 1. tipa cukura diabēta pacientu un kontroles grupas asinīs.
8. Izanalizēt 1,4-DHP spēju neitralizēt hidroksilradikāli un pasargāt DNS molekulu Fentona reakcijas apstākļos *in vitro*.
9. Izpētīt 1,4-DHP atvasinājuma AV-153-Na spēju reparēt DNS vienpavediena bojājumus 1. tipa cukura diabēta pacientu perifēro venozo asiņu šūnu kodolos *ex vivo*.

## **DARBA HIPOTĒZE**

Antioksidatīvo un DNS molekulu pasargājošu preparātu klātbūtnē tiek samazināta slāpekļa oksīda produkcija nitrozatīva un oksidatīva stresa apstākļos līdz ar to tiek mazināts DNS molekulas oksidatīvo bojājumu risks.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Brīvie radikāļi

Brīvie radikāļi ir atoms vai molekula ar vienu nesapārotu elektronu, piemēram, slāpekļa oksīds ( $\text{NO}^\cdot$ ), superoksīda radikālis ( $\text{O}_2^-$ ), hidroksilradikālis ( $\text{OH}^\cdot$ ). Ūdeņraža pārskābe nav brīvais radikālis, bet gan prekursors, kas UV radiācijas vai reakcijās ar metāla joniem ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ), veido hidroksilradikāli (Kalyanaraman, 2013).

### 1.1.1. Slāpekļa oksīds

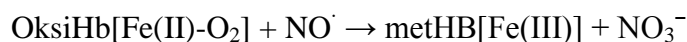
Slāpekļa oksīda molekula sastāv no slāpekļa un skābekļa atomiem, kur ir slāpekļa septiņi un skābekļa astoņi elektroni. Slāpekļa oksīda reaktivitāte ir atkarīga no tā fizikālajām īpašībām: neliels izmērs, augsta difundētspēja, lipofilitāte.  $\text{NO}^\cdot$  reaģē tikai ar molekulām, kurām ir viens nesapārots elektrons, piemēram, brīvajiem radikāļiem vai pārejas metālu joniem. Slāpekļa oksīda reakciju produkti arī ir spējīgi reaģēt ar bioloģiskām molekulām un var izraisīt toksisku efektu (Habib and Ali, 2011). Visi  $\text{NO}^\cdot$  efekti tiek dalīti tiešos un netiešos. Pie tiešiem pieskaita, tos efektus, ko izraisa slāpekļa oksīds pats par sevi, bet pie netiešajiem, kuros piedalās  $\text{NO}^\cdot$  reakciju produkti (Thomas et al., 2010).

Slāpekļa oksīda molekulas izsauktie procesi šūnā ir atkarīgi no tā koncentrācijas. Endogēni sintezētā  $\text{NO}^\cdot$  koncentrācija var variēt no mazāk kā 2 nM endotelioģēnos līdz vairāk kā 1  $\mu\text{M}$  koncentrācijai makrofāgos. Ilgstoša  $\text{NO}^\cdot$  10-30 nM klātbūtne šūnās izraisa cGMP-atkarīgo fosforilāciju, kas tik zemās koncentrācijās uzrāda protektīvo efektu šūnā un inducē tās proliferāciju. 30-60 nM  $\text{NO}^\cdot$  koncentrācija izraisa Akt fosforilāciju, kas sekmē aizsardzību pret apoptozi. Aptuveni 100 nM  $\text{NO}^\cdot$  koncentrācija izraisa hipoksijas inducējamā faktora 1 alfa stabilizāciju, kas stimulē angioģenēzi, šūnu proliferāciju un pasargā pret audu bojājumiem. 400 nM  $\text{NO}^\cdot$  koncentrācijas ietekmē p53 var tik gan fosforilēts, gan acetilēts, kas izraisa citostatisku un apoptotisku efektu. 1  $\mu\text{M}$   $\text{NO}^\cdot$  koncentrācijā notiek vitālo proteīnu tādu kā PARP-1 nitrēšana, bet augstākas  $\text{NO}^\cdot$  koncentrācijas nomāc mitohondriālo elpošanu – ATP sintēzi (Thomas et al., 2010).

### 1.1.1.1. Slāpekļa oksīda tiešais efekts

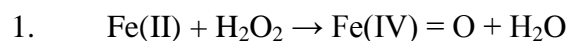
Slāpekļa oksīda tiešie efekti ir vairāk saistīti ar eNOS un nNOS inducēto nM slāpekļa oksīda koncentrāciju, kas šūnā eksistē vien dažas minūtes. Pie tiešajiem efektiem tiek pieskaitītas reakcijas ar metāliem, kur veidojas nitrozilētie metālu kompleksi. Slāpekļa oksīds reaģē ar vairākiem metālus saturošiem proteīniem, bet *in vivo* apstākļos lielākā tā loma ir reakcijās ar hēma grupu. Visnozīmīgākā, kā tiek uzskatīts, ir šķīstošās, hēmu saturošās guanilātciklāzes (sGC) reakcija ar slāpekļa oksīdu, kā rezultātā mainās proteīna konformācija. sGC tiek aktivēta un izraisa guanozīntrifosfāta konversiju par ciklisko guanozīnmonofosfātu, kas savukārt aktivē specifiskas proteīnkināzes, fosfodiesterāzes un jonu kanālus (cGMP) (Wink et al., 2000; Hobbs and Stasch, 2010; Habib and Ali, 2011). Tas izraisa kaskādi ar efektiem, tai skaitā bazālā asinsvadu muskulatūras tonusa uzturēšanu, trombocītu agregācijas nomākšanu, neurotransmisiju u.c. Slāpekļa oksīds nomāc citohromu P450 aktivitāti (Wink et al., 2000), kas var izraisīt toksiskus efektus. Hroniska iekaisuma un septiska šoka laikā tiek stimulēta iNOS un NO<sup>•</sup> sintēze, tādējādi nomācot citohroma P450 aktivitāti, kā rezultātā tiek traucēts zāļu metabolisms (Wink et al., 2000). NO<sup>•</sup> nomāc arī slāpekļa oksīda sintāžu aktivitāti, saistoties ar to hēma grupu. Konstitucionālās formas ir vairāk pakļautas šai regulācijai nekā inducējamā. Tādējādi noteikta NO<sup>•</sup> koncentrācija inaktivē šīs NOS formas pat pie paaugstināta kalcija jonu līmeņa šūnās. iNOS savukārt netiek inaktivēta un tā ir atbildīga par RNOS veidošanos *in vivo* (Wink et al., 2000).

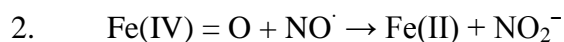
Slāpekļa oksīda aktivitāte ir saistīta ne tikai ar kovalento saišu veidošanu ar metālu joniem (nitrozilēšana), bet arī vairāki metālu-skābekļa kompleksi reaģē ar NO<sup>•</sup>. Oksihemoglobīns, reaģējot ar slāpekļa oksīdu, veido methemoglobīnu un nitrātu.



Tiek uzskatīts, ka šis ir viens no ceļiem, kā tiek regulēta NO<sup>•</sup> koncentrācija audos un tiek nomākta slāpekļa oksīda netiešo efektu izpausme.

Slāpekļa oksīda molekula noteiktos apstākļos var reducēt augstas potences metālu savienojumus ar skābekli (2. reakcija), kas rodas pēc to reakcijas ar ūdeņraža pārskābi (1. reakcija). Augstas potences metālu savienojumi ir ļoti reaktīvi un var izraisīt bojājumus šūnā.





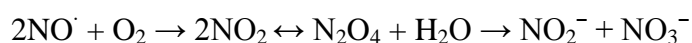
Slāpekļa oksīds reaģē arī ar bioloģisko molekulu brīvajiem radikāļiem. Iekaisuma un citu patoloģisku procesu ietekmē tiek aktivēta lipīdu peroksidācija, kuras rezultātā veidojas brīvie radikāļi, kas turpina lipīdu oksidēšanas procesu līdz šūnu membrānu sabrukšanai. Slāpekļa oksīds reaģē ar šiem savienojumiem, tādā veidā inaktivējot tos un apstādinot lipīdu peroksidācijas procesu (Wink et al., 2000; Trostchansky et al., 2010).

### 1.1.1.2. Slāpekļa oksīda netiešais efekts

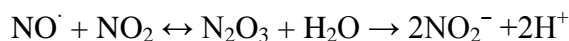
Slāpekļa oksīda netiešie efekti bieži tiek saistīti ar patofizioloģiskiem procesiem, kuru rezultātā veidojas paaugstināta slāpekļa oksīda koncentrācija audos. Tie tiek iedalīti oksidatīvās un nitrozatīvās reakcijās. Oksidatīvās reakcijas izraisa hidroksilāciju un elektrona zaudējumu, process tiek saukts par oksidatīvo stresu, bet nitrozatīvās reakcijās RNOS nodod  $\text{NO}^+$  (nitrozonija jons) nukleofilām grupām (tioli, amīni) – nitrozatīvais stress. (Habib and Ali, 2011).

$\text{NO}^\cdot$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$  (dislāpekļa trioksīds),  $\text{ONOO}^-$  un  $\text{NO}_2$  (slāpekļa dioksīds) ir galvenie RNOS. Reaģējot ar skābekli, savā starpā un brīvajiem radikāļiem, tie veido dažādus reaktīvus produktus, kas ir atbildīgi par bioloģisko molekulu bojājumiem. Nitrīts ( $\text{NO}_2^-$ ) ir galvenais slāpekļa oksīda metabolīts ūdens šķīdumos.

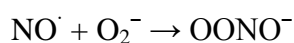
Reaģējot ar molekulāro skābekli,  $\text{NO}^\cdot$  izveido slāpekļa dioksīdu, nitrātu ( $\text{NO}_3^-$ ) un nitrītu (Wink et al., 2000).



Paaugstinoties slāpekļa oksīda koncentrācijai, audos pieaug arī RNOS koncentrācija, reaģējot savā starpā un ar citiem reaktīviem RNOS metabolītiem (Thomas et al., 2010).

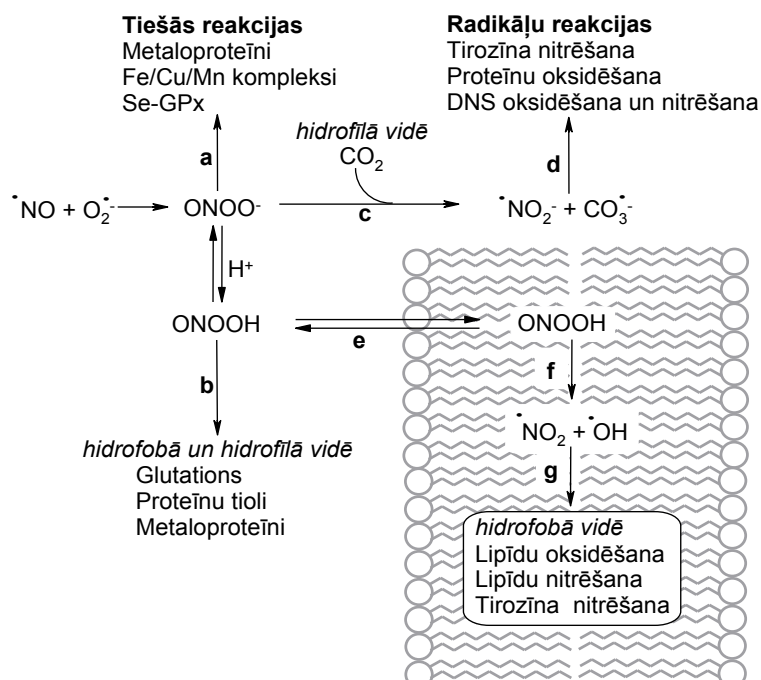


$\text{NO}_2^-$  ir viena elektrona oksidants, kas viegli oksidē aminoskābes: cisteīnu un tirozīnu, izveidojot attiecīgos radikāļus, kā arī tas var reakcijā ar bioloģisko molekulu radikāļiem veidot nitrētus savienojumus (Szabo et al., 2007).  $\text{N}_2\text{O}_3$  nav oksidants, bet tas nitrozilē nukleofilas molekulas (tiolus). Slāpekļa oksīdam, reaģējot ar superoksīdanjonu, veidojas peroksinitrīts (Wink et al., 2000).





Peroksinitrīts neitrālos šķīdumos uzvedas kā spēcīgs oksidants, kas var oksidēt tiolus, iniciēt lipīdu peroksidācijas procesus, nitrēt tirozīnu, pārraut DNS molekulu, nitrēt un oksidēt DNS bāzes, oksidēt metionīnu, utt. Šos efektus realizē gan pati peroksinitrīta molekula, gan arī tās metabolīti (Szabo et al., 2007) (sk. 1.1.att.).

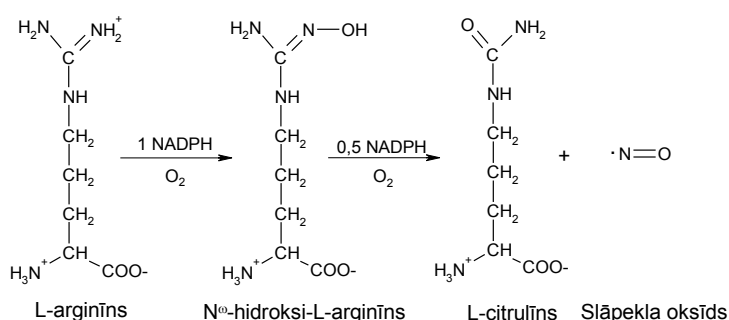


**1.1. att. Peroksinitrīta reakcijas.** Peroksinitrīta anjons (ONOO<sup>-</sup>) neirālos šķīdumos ir līdzsvarā ar peroksinitrītskābi (ONOOH). Abas šīs molekulas var reaģēt ar bioloģiskām molekulām (a un b) Peroksinitrīta anjona reakcija ar CO<sub>2</sub> (oglekļa dioksīdu) (c) izraisa karbonāta (CO<sub>3</sub><sup>-</sup>) un slāpekļa dioksīda radikāļu veidošanos (d) Savukārt peroksinitrītskābe šūnas hidrofobos rajonos, sadalās par slāpekļa dioksīda radikāli un hidroksilradikāli (f), kas izraisa lipīdu peroksidāciju un nitrē proteīnu un lipīdus (g) (adaptēts no (Szabo et al., 2007)).

### 1.1.2. Slāpekļa oksīda sintāzes (EC 1.14.13.39) struktūra un NO<sup>•</sup> biosintēze

Slāpekļa oksīda sintāzes sintezē NO<sup>•</sup> molekulu, katalizējot oksidāciju vienam no terminālajiem N atomiem L- arginīna guanidīna grupā (Bryan et al., 2009). Oksidācija notiek divos etapos, pirmkārt, izveidojot N<sup>0</sup>-hidroksli-L-arginīnu kā starpproduktu, bet otrajā ciklā iegūstot L- citrulīnu un slāpekļa oksīdu (sk. 1.2. att.) (Stuehr and Ghosh, 2000; Förstermann, 2010).

NOS ir homodimērs, kas sastāv no diviem identiskiem monomēriem, kuri satur oksigenāzes (N- gals), kur notiek NO' sintēze, un reduktāzes (C- gals) domēnus (Förstermann, 2010). NOS homodimērs satur piecas kofaktoru grupas: flavīnadenīdinukleotīdu (FAD), flavīnmononukleotīdu (FMN), hēma daļu, tetrahydrobiopterīnu (BH<sub>4</sub>) un Ca<sup>2+</sup> - kalmodulīna daļu, kas ir nepieciešami NOS dimerizācijai un pilnvērtīgai slāpekļa oksīda sintēzei (Stuehr and Ghosh, 2000; Bryan et al., 2009). NOS tiek iedalītas divās grupās, 1) konstitucionālās – endoteliālās slāpekļa oksīda sintāzes (NOSIII, eNOS), neironālā slāpekļa oksīda sintāzes (NOSI, nNOS), un 2) inducējamās- inducējamā slāpekļa oksīda sintāze (NOSII, iNOS)(Stuehr and Ghosh, 2000; Förstermann, 2010).



## 1.2. att. Slāpekļa oksīda biosintēze.

Šis ir ļoti complicēts un koordinēts process, tomēr slimību gadījumā, kuru patoģenēzē ir oksidatīvais stress, notiek kofaktoru oksidācija, NOS atjūgšanās un tiek izraisīts L-arginīna deficīts, radot NO' produkcijas traucējumus (Bryan et al., 2009). NOS monomēri un pat izolēti reduktāzes domēni ir spējīgi pārnest elektronu no NADPH uz flavīniem: FAD un FMN, kā arī tiem ir ierobežota spēja reducēt molekulāro skābekli, iegūstot superoksīda radikāli, bet sintezēt pilnvērtīgu NO' molekulu tie nespēj (Stuehr and Ghosh, 2000; Förstermann, 2010).

### 1.1.3. Inducējamā slāpekļa oksīda sintāze

Cilvēka inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes gēns atrodas 17q11.2-q12 hromosomā, gēna izmērs ir 37 kb un tam ir 26 eksoni un 25 introni. Pirmo reizi inducējamā slāpekļa oksīda sintāze tika atrasta makrofāgos. Parasti iNOS gēns šūnā ir neaktīvā stāvoklī. Tā ekspresiju un aktivitāti stimulē baktēriju lipopolisaharīdi, citokīni, augšanas faktori. Pēc indukcijas notiek iNOS gēna transkripcija, iNOS gēns

tiek translēts iNOS proteīnā, kas L-arginīna klātbūtnē, sintezē lielu slāpekļa oksīda daudzumu (Du and Geller, 2010).

Maksimālai iNOS promotera aktivācijai ir nepieciešama LPS un citokīnu (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ) sinerģiska darbība. LPS un IFN $\gamma$  sinerģiska darbība grauzēju makrofāgos stimulē iNOS promotera aktivitāti, bet grauzēju asinsvadu gludās muskulatūras šūnām un hepatocītiem iNOS ekspresijas stimulācijai ir nepieciešama arī TNF- $\alpha$  un IL-1 $\beta$  klātbūtne. LPS un citokīni izraisa sekojošu transkripcijas faktoru, NF- $\kappa$ B, STATS-1, AP-1 u.c. aktivāciju, kas ir nepieciešami iNOS aktivēšanai (Du and Geller, 2010).

Līdz šim nav skaidrības, kur un cik liels ir iNOS promoters. Pētnieki uzrāda to dažādās vietās, dažāda garuma un dažādas citokīnu inducējamības pakāpes atkarībā no šūnām, audiem un pētāmās sugas. Tiek pētīti arī cilvēka iNOS gēna promotera sekvenču polimorfismi. Ir aprakstītas dažas šo polimorfismu un slimību saistības. Piemēram, CCTTT(n) pentanukleotīdu atkārtojumi 2,5kb pozīcijā ir saistīti ar sekojošu slimību izpausmes smagumu: malāriju, 1. tipa cukura diabētu, kuņģa vēzi, celiakiju un citām. AAAT insercijas polimorfisms 700bp pozīcijā iNOS gēna promotera daļā ir saistīts ar iNOS promotera augstāku aktivitāti un ekspresiju, ko saista ar cukura diabēta komplikāciju risku, īpaši homozigotas stāvoklī (Pautz et al., 2010).

Zīdītāju iNOS gēna promotera sekvenču uzrāda homoloģiju ar vairāku transkripcijas faktoru, AP-1, NF- $\kappa$ B, PARP-1, STAT-1 un citu, saistīšanās vietām. Veicot pētījumus *in silico*, tika proponēts, ka iNOS gēna promotera daļā varētu būt ap 2700 transkripcijas faktoru saistīšanās vietas, bet tikai dažas no tām ir pierādītas. Transkripcijas faktors NF- $\kappa$ B līdz šim ir uzskatīts par galveno iNOS ekspresijas regulētāju. LPS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\beta$ , oksidatīvais stress stimulē iNOS gēna ekspresiju caur NF- $\kappa$ B aktivāciju. iNOS gēna ekspresijas inhibīcija notiek caur NF- $\kappa$ B aktivācijas inhibīciju (antioksidanti, glikokortikoīdi) (Kleinert et al., 2010).

iNOS ekspresija tiek regulēta ar daudzu signālpārneses ceļu palīdzību, kas tiek aktivēti vai bloķēti, atbildot, uz kādu konkrētu signālu vai to kopu. Ļoti būtiski, kādās šūnās un audos šie ceļi tiek ietekmēti, jo atbildes reakcija nav visur vienāda. Atkarībā no šūnu tipa cAMP/proteīnkināze A signālpārneses ceļa aktivācija vai nu paaugstina iNOS ekspresiju (cilvēka Jurkat leukēmijas T-limfocītos, žurku mezangija šūnās, peļu fibroblastos), vai nu samazina iNOS ekspresiju (žurku LPS/citokīnu stimulētajās

insulinomas  $\beta$  šūnās, žurku hepatocītos), vai arī neuzrāda efektu (cilvēka epiteliālās šūnās). Līdzīgi ir ar PKC signāltransdukcijas ceļa aktivācijas ietekmi uz iNOS ekspresiju. Inkubējot cilvēka šūnas ar citokīniem vai endotoksīniem, tiek aktivēts MAPK (mitogēnaktivētās proteīnkināzes), īpaši p38 MAPK, un Jun N-terminālnkināzes (JNK), ceļš, kas stimulē iNOS ekspresiju. Tiek uzskatīts, ka P38 MAPK ir galvenais signāltransdukcijas ceļš, kas ir iesaistīts iekaisuma gēnu ekspresijas stimulācijā. Caur NF- $\kappa$ B, STAT-1 $\alpha$  vai interferona regulētājfaktoru 1 realizējas P38 MAPK aktivējošais efekts uz iNOS promotera aktivitāti. Ar dažādu citokīnu receptoru starpniecību notiek Janus kināžu (JAK) fosforilācija-aktivācija, kas stimulē STAT (signāla pārnēsētājs un transkripcijas aktivators) translokāciju uz kodolu, kur aktivē STAT-atkarīgo gēnu ekspresiju. JAK-STAT signāltransdukcijas ceļš ir būtisks cilvēka, peļu un žurku iNOS gēna indukcijas procesā. Serīna/treonīna proteīnu fosforilācijas ceļa aktivācija var gan stimulēt, gan nomākt iNOS gēna ekspresiju, atkarībā no audiem. Līdzīgi var teikt par PARP-1 ietekmi uz NF- $\kappa$ B pastarpināto iNOS ekspresiju. Tā ietekme ir atkarīga gan no audiem, kuros notiek iNOS ekspresija, gan no stimula, kas to izsauc. Pastāv vēl vismaz 20 iNOS ekspresiju regulējošie signāltransdukcijas ceļi (Kleinert et al., 2010; Pautz et al., 2010).

Eksperimentos ar cilvēku materiālu ir atrastas nesakritības starp iNOS gēna promotera aktivitāti un iNOS mRNS koncentrāciju, ko skaidro ar iNOS mRNS degradāciju. Ir zināmi pieci sekvenču motīvi, piemēram, AUUUA vai AUUUUA, iNOS mRNS 3'-UTR daļā. Šīs sekvences ir iesaistītas iNOS mRNS stabilitātes regulācijā. AU- bagātie elementi destabilizē iekaisuma proteīnu un onkogēnu mRNS translāciju. Tie piesaista eksosomas (daļiņas ar 3' un 5' nukleāžu aktivitāti) pie mRNS molekulas, tādējādi veicinot to degradāciju. Ir dati arī par iNOS mRNS translācijas procesa regulāciju, piemēram, kardiomiocīti ekspresē faktoru, kas inhibē iNOS proteīna ekspresiju, mijiedarbojoties ar iNOS mRNS 5'- un 3'- UTR sekvencēm (Kleinert et al., 2010; Pautz et al., 2010).

iNOS enzīms ir homodimērs. iNOS homodimerizācija ir atkarīga no BH<sub>4</sub> biopieejamības, kas ir galvenais homodimerizācijas kofaktors. Mehānisms, kas regulē BH<sub>4</sub> sintēzi, tiešā veidā ietekmē iNOS enzīma aktivitāti. iNOS aktivitāti regulē arī arginīna biopieejamība, arginīna transporta regulēšana un arginīna patēriņš citos procesos. Ir dati, ka pastāv arī iNOS aktivitāti regulējošas vielas, piemēram, kalirīns, kas mijiedarbojoties ar iNOS proteīnu, nomāc tā dimerizāciju. Peļu makrofāgos ir

atrasts 110 kDa proteīns, kas nomāc dimerizāciju, saistoties ar iNOS N-galu. iNOS mijiedarbojas arī ar kalcija/kalmodulīna-atkarīgo proteīnkināzes II proteīnkināzi (CaMKII), kuras hroniska inhibīcija negatīvi ietekmē iNOS atbildes reakciju uz citokīnu indukciju (Kleinert et al., 2010; Pautz et al., 2010).

Apkopojot visu augstākminēto slāpekļa oksīda sintēzes regulācija cilvēkā notiek sekojošos līmeņos: 1. iNOS ekspresijas modulācija, kas sevī ietver promotera aktivitātes regulāciju, iNOS mRNS stabilitātes ietekmēšanu un iNOS proteīna stabilitātes regulēšanu; 2. iNOS enzīma aktivitātes līmeņa ietekmēšana; 3. iNOS enzīma substrāta un kofaktoru biopieejamība; 4. arginīna transportiera aktivitāte un ekspresija (Pautz et al., 2010).

#### **1.1.4. Endoteliālā slāpekļa oksīda sintāze**

eNOS ir konstitucionālā slāpekļa oksīda sintāze, kas tika pirmo reizi atrasta endoteliālās šūnās. eNOS kodējošais gēns atrodas cilvēka 7q36 hromosomā, gēna izmērs ir 21 kb, 26 eksoni un 25 introni (Du and Geller, 2010).

Caur sekundārajiem mesendžeriem asinsvadu endotēlijā tādi agonisti kā acetilholīns un bradikinīns stimulē inozitol-1,4,5-trifosfāta veidošanos. Inozitol-1,4,5-trifosfāts piesaistās pie endoplazmatiskā tīkla un izraisa  $Ca^{2+}$  izdalīšanos no intracelulārā depo. Īslaicīgais  $Ca^{2+}$  līmeņa paaugstinājums, izsauc kalcija piesaisti pie kalmodulīna. Šis komplekss ir vitāli svarīgs kofaktors konstitucionālo NOS formu aktivācijai. eNOS sintezē NO' pulsējošā,  $Ca^{2+}$ /CaM- atkarīgā veidā. eNOS producē nelielu NO' daudzumu līdz kalcija koncentrācija šūnā samazinās (Bryan et al., 2009). Endoteliālās slāpekļa oksīda sintāzes producētais slāpekļa oksīds ir antitrombozes un antisklerotisks faktors. Tas paplašina asinsvadus, nomāc trombocītu agregāciju, ierobežo asinsvadu miocītu proliferāciju (Förstermann, 2010).

Bazālo eNOS ekspresiju nodrošina pozitīvās regulācijas domēni I un II, saistot dažādus transkripcijas faktoros. Šie reģioni satur arī dažādus metilētos nukleotīdus, kas samazina eNOS transkripciju endoteliocītos (Chatterjee et al., 2008). eNOS promoterim nav tipiskā TATA apgabala, bet tam ir aktivācijas proteīns 1, aktivācijas proteīns 2, kodola faktors-1, sterola-regulējošais un „bīdes” stresa atbildes un citi elementi. LPS un TNF- $\alpha$  nomāc eNOS gēna ekspresiju, samazinot eNOS mRNS stabilitāti. eNOS mRNS ir aptuveni 4052 nukleotīdu garš un tā pussabrukšanas

periods ir 10-35 stundas. Tādējādi proteīnu translācijas process var notikt vēl ilgi pēc eNOS gēna ekspresijas nomākšanas. Pēctranskripcijas eNOS mRNS regulāciju veic *cis*-aktīvie RNS elementi, kas atrodas eNOS mRNS 3'-netranslējošajā reģionā (UTR). Cits pēctranskripcijas regulējošais mehānisms ir pretplūsmas mRNS molekulas (sONE) atkarīgā regulācija, sONE tiek transkribētas no mRNS kodējošajam pretējā DNS pavediena. Ir dati, ka, nomācot eNOS mRNS sONE elementu transkripciju, nozīmīgi pieaug eNOS mRNS daudzums un otrādi (Chatterjee et al., 2008).

Ļoti būtisks eNOS enzīma aktivitāti regulējošais faktors ir substrāta, L-arginīna, un kofaktoru pieejamība. BH<sub>4</sub> ir neaizstājams NOS kofaktors, kas stabilizē NOS dimēra struktūru un piesaista L-arginīnu. BH<sub>4</sub> biopieejamības samazināšana, izraisa NOS atjūgšanos, kas noved pie superoksīda radikāļa un H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produkcijas (Chatterjee et al., 2008).

eNOS proteīna aktivitāti var stimulēt arī faktori, kas neietekmē intracelulāro kalcija līmeni. Viens no tādiem faktoriem ir plūstošo asiņu „bīdes” stress, kas caur noteiktu serīna atlikumu fosforilāciju eNOS molekulā, stimulē elektronu plūsmu reduktāzes domēnā, tādējādi paaugstinot eNOS jutību pret kalciju. Pastāv vairākas proteīnkināzes, kas fosforilē eNOS, atbildot uz hormonu vai mehānisku endoteliālo šūnu stimulāciju. (Förstermann, 2010). eNOS lokalizācijai šūnā arī ir aktivitāti regulējoša funkcija. eNOS, lielākoties, atrodas kaveolās pie plazmatiskās membrānas. Tur tās uzrāda visaugstāko aktivitāti, salīdzinot ar formām, kas ir saistītas ar Goldži aparātu, citoskeletu, aktīnu. Mainot eNOS atrašanās vietu, tiek ietekmēta tās spēja producēt NO, neietekmējot eNOS mRNS un proteīna līmeņus (Chatterjee et al., 2008).

### 1.1.5. Neironālā slāpekļa oksīda sintāze

Sākotnēji nNOS tika identificēta smadzenēs, bet vēlāk tā konstatēta arī virsnieru dziedzerā šūnās, plaušu, kuņģa un dzemdes epiteliālās šūnās, nieru *macula densa*, aizkuņģa dziedzerā β-šūnās, makrofāgos un citur (Wink et al., 2000; Mattila and Thomas, 2014).

nNOS ir kalcija-kalmodulīna atkarīgais enzīms, tā aktivitāti regulē vielas, kas fizioloģiskos apstākļos regulē kalcija līmeni šūnās. Kalcija koncentrācijas līmeņi šūnā

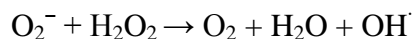
mainās ātri, tādējādi arī NO<sup>•</sup> sintēze notiek nelielos daudzumos, īsos laika sprīžos. nNOS ir atrasts gan brīvā, gan piesaistītā veidā. Nieru *macula densa* šūnās nNOS forma ir ietverta mazās vezikulās. Skeleta muskulatūrā nNOS paveids, kas tiek atrasts muskulatūrā,  $\mu$ NOS-1, ir saistīts pie sarkolemmas- distrofina kompleksa. Smadzeņu neironos nNOS ir saistīts pie PSD-95 vai PSD-93 (postsinaptiskais blīvuma proteīns). Pēc NMDA (N-metil-D-aspartāta) receptora aktivēšanas, šūnā paaugstinās kalcija līmenis un kalmodulīns pievienojas pie nNOS. Ca<sup>2+</sup>-CaM komplekss kopā ar BH<sub>4</sub> izraisa nNOS pārvietošanos no plazmas membrānas uz citoplazmu, kur pēc defosforilēšanas tā aktivējas, un sākas NO<sup>•</sup> biosintēze. Ca<sup>2+</sup>/kalmodulīna atkarīgās proteīnkināzes II un proteīnkināzes A, C vai G inaktivē nNOS (Wink et al., 2000).

Neskatoties uz to, ka nNOS ir konstitucionāli ekspresēta NOS izoforma, tomēr tā ekspresiju šūnā var stimulēt ķīmiskas, psiholoģiskas un bioloģiskas izcelsmes stress vai ievainojums. Interesanti, ka nNOS ekspresija pēc stimulācijas ar LPS un IFN- $\gamma$  samazinās žurku smadzenēs, kuņģī, taisnajā zarnā un liesā (Wink et al., 2000).

### 1.1.6. Superoksīda radikālis, hidroksilradikālis, ūdeņraža pārskābe

Aktīvie skābekļa radikāļi (ROS – *reactive oxygen species*) ir skābekli saturošas vielas, kas sevī ietver gan brīvos radikāļus (O<sub>2</sub><sup>-</sup> un OH<sup>•</sup>), gan vielas, kas viegli sadalās tajos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Pie ROS ir pieskaitāmi dažādu vielu peroksīdi, piemēram, lipīdu peroksīdi (LOO<sup>•</sup>), proteīnu un nukleīnskābju peroksīdmolekulas. Tās veidojas hidroksilradikāļa un superoksīda radikāļa ietekmē, atņemot vienu elektronu organiskiem savienojumiem (Lushchak, 2014).

Superoksīda radikālis ir skābekļa molekula ar vienu nesapārotu elektronu – O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Nešķīst lipīdos, tam ir zema difundētspēja. Tas var reaģēt ar ūdeņraža peroksīdu, piesaistot ūdeņradi, veidojot hidroksilradikāli (Lushchak, 2014).



Savukārt ūdeņraža peroksīds ir vājš oksidētājs, kas šķīst lipīdos un var migrēt cauri membrānām. Dzelzs un vara jonu klātbūtnē Fentona un *Haberr-Weiss* reakcijās tas veido hidroksilradikāli (OH<sup>•</sup>) un hidroksilanjonu (OH<sup>-</sup>) (Kalyanaraman, 2013).

Fentona reakcija:



*Haber-Weiss* reakcija:





Pastāv vairāki ceļi, kas ir atbildīgi par superoksīda radikāļa ražošanu. Ksantīnoksidāzes reducē skābekli, atņemot vienu vai divus elektronus, attiecīgi veidojot superoksīda radikāli vai ūdeņraža pārskābi, tādā veidā hipoksantīnu pārvēršot urīnskābē. Uz fagocītu šūnu membrānas atrodas NADPH oksidāzes (NOX) enzīmi, kas ģenerē superoksīda radikāli un ūdeņraža pārskābi baktēriju nonāvēšanai. Iekaisuma un infekcijas gadījumā tas ir galvenais ROS avots. Pārējo enzīmu, kuru aktivitātes rezultātā veidojas superoksīda radikālis, galvenā funkcija nav superoksīda radikāļa ražošana. Tas ir starpprodukts, kas šo enzīmu traucētas funkcijas rezultātā, veidojas anomāli. Šādi enzīmi ir ciklooksigenāze, lipooksigenāze, citrohroms P450, kā arī elpošanas ķēdes mitohondrijos.

Lai aizsargātu organismu no pārmērīgas ROS produkcijas, organismā eksistē enzimatiska aizsardzības sistēma: superoksīda dismutāzes (SOD), peroksidāzes, katalāzes (CAT), kā arī mazas antioksidantu molekulas: vitamīni E un C, beta karotīns, glutations u.c., kā arī adaptīva gēnu ekspresijas regulācijas sistēma. Pastāv trīs superoksīda dismutāzes formas: citoplazmatiskā, mitohondriālā un ekstracelulārā. SOD katalizē reakciju, kur no superoksīda radikāļa veidojas ūdeņraža pārskābe un skābekļa molekula, tādējādi samazinot  $\text{O}_2^-$  saturu audos. Līdz ar to tiek samazinātas peroksinitrīta molekulas veidošanās iespējas, nepieļaujot  $\text{NO}^\cdot$  un  $\text{O}_2^-$  reakciju. Kā arī tiek nomākta  $\text{O}_2^-$  stimulētā dzelzs jonu atbrīvošanās no proteīniem, kas satur dzelzs-sēra centrus. Tādā veidā netiek pieļauta Fentona reakcija un hidroksilradikāļa veidošanās.  $\text{H}_2\text{O}_2$  molekula ir stabilāka par  $\text{O}_2^-$ , tā var difundēt tālāk. Katalāzes un peroksidāzes sadala to līdz skābekļa un ūdens molekulām. Lielās  $\text{H}_2\text{O}_2$  koncentrācijas palīdz reducēt glutaciona peroksidāze (GPx). GPx oksidē reducēto glutaciona formu, bet pretējo reakciju veic glutaciona reduktāze, izmantojot NADPH kā koenzīmu. Pastāv arī neenzimātiskais aizsardzības mehānisms. Piemēram, vitamīni E pasargā no lipīdu peroksidācijas, reaģējot ar lipīdu peroksilradikāli. Vitamīns C reaģē citoplazmā ar ROS, izveidojot askorbāta radikāli. Tas reaģē ar otru askorbāta radikāli, veidojot dehidroaskorbātu un askorbātu, kas ir citoplazmatiskais antioksidants (Kalyanaraman, 2013).

Atbildot uz ROS, tiek modulēta arī antioksidatīvos procesos iesaistīto enzīmu (SOD, GPx, CAT, GST u.c.) mRNS un proteīnu ekspresija. Pieaugot oksidatīvajam stresam, citoplazmas komplekss, kas sastāv no Keap 1 (*Kelch like ECH-associated*



*protein*) proteīna un Nrft2 (*nuclear factor erytroid 2- related 2*), disociē. Nrft2 migrē uz šūnas kodolu, kur, piesaistoties antioksidatīvu gēnu promotera reģionam, inducē to transkripciju (Kalyanaraman, 2013). ROS aktivē arī NF-κB, AP-1 un MAP kināžu signālceļus un līdz ar to tiek stimulēta to enzīmu gēnu transkripcija, kas ir iesaistīti iekaisuma reakcijās un antioksidatīvos procesos organismā (Lushchak, 2014).

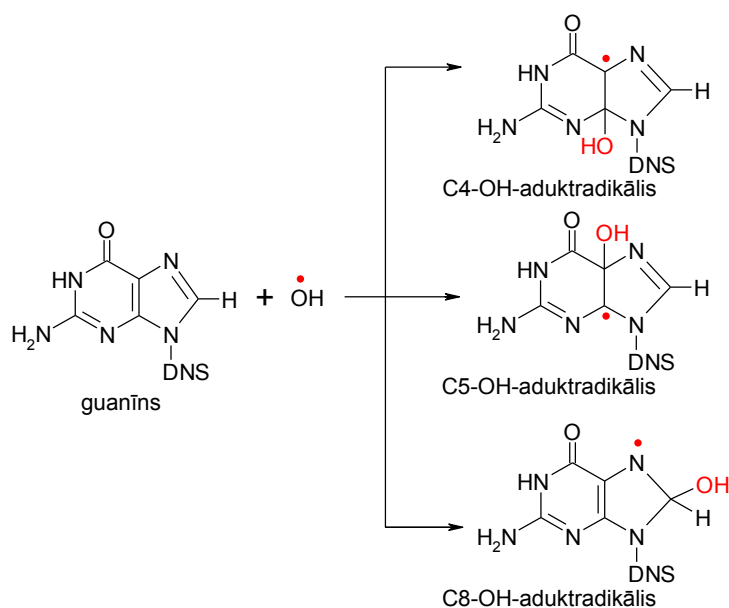
Tomēr, ja notiek pārmērīga ROS produkcija un organisma aizsargmehānismi netiek ar to galā, veidojas oksidatīvā stresa apstākļi (Lushchak, 2014). Brīvie radikāļi izmaina proteīnu konformāciju un īpašības, palaiž lipīdu peroksidācijas procesus šūnu membrānās, kas noved pie šūnu membrānu caurlaidības palielināšanās (Wink et al., 2000). Tie arī bojā DNS molekulu, izraisot vienpavediena un divpavedienu pārrāvumus, abāzisku vietu veidošanos un bāžu modifikāciju, kam seko mutācijas un citotoksiski efekti (Svilar et al., 2011).

## **1.2. DNS oksidatīvie bojājumi un to reparācija**

Brīvie radikāļi veidojas aerobos organismos normāla metabolisma rezultātā. Pastāv patoloģiski stāvokļi, piemēram, iekaisums, kuru rezultātā ROS un RNOS veidojas lielākā daudzumā, kas savukārt var izraisīt DNS bojājumus un šūnas funkcionālas vai strukturālas izmaiņas (Coussens and Werb, 2002).

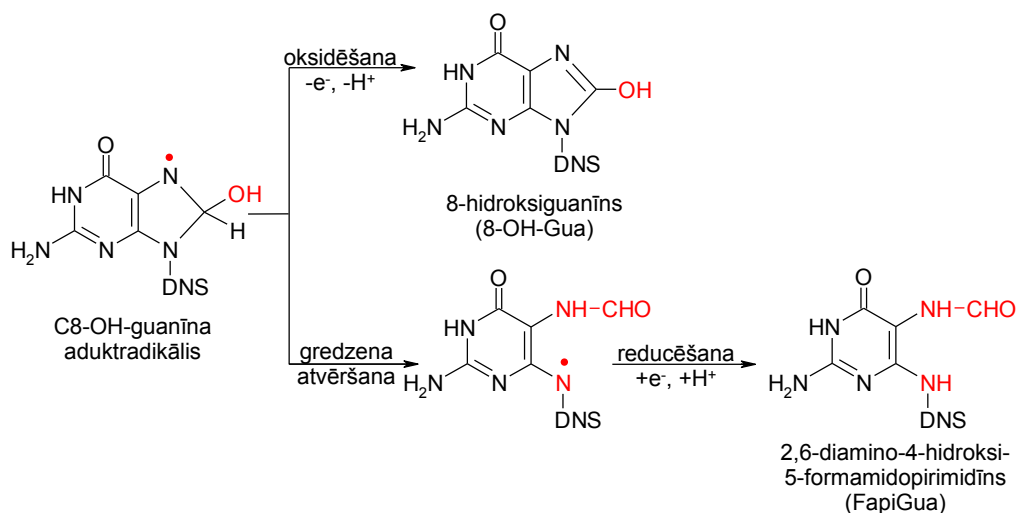
Sekojoši tiks apskatīti brīvo radikāļu izraisītie DNS bojājumi, kas sevī ietver purīnu un pirimidīnu oksidāciju, ribozes molekulas bojājumus, kompleksos jeb tandēmbojājumus un kovalentu DNS bāžu sasaisti ar proteīnu molekulām (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).

Guanīnam, reaģējot ar OH<sup>•</sup>, veidojas C4-OH-, C5-OH- un C8-OH- guanīna aduktradikāļi (sk. 1.3. att.).



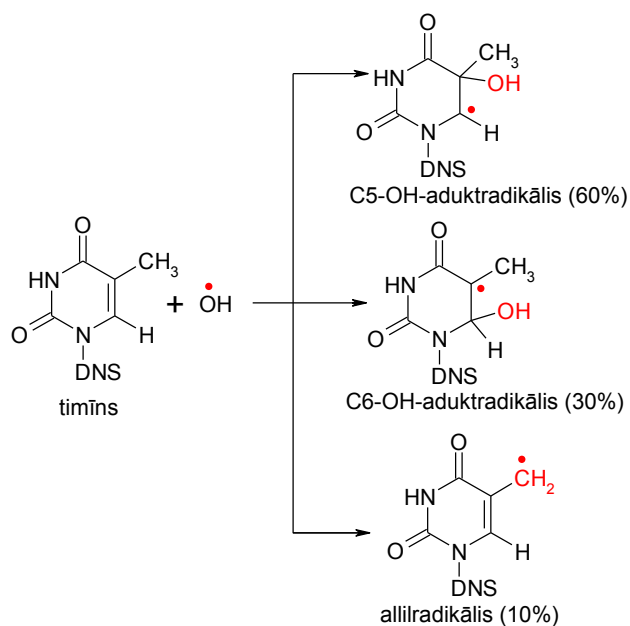
1.3. att. Guanīna reakcija ar hidroksilradikāli un tās produkti (adaptēts no Dizdaroglu, 2012).

Tālāk bojātās bāzes var tikt ķīmiski pārveidotas, piemēram, C5-OH- radikālis tiek reducēts, C4-OH- oksidēts, bet C8-OH- radikālis var tikt oksidēts un reducēts. Var notikt arī C8-C7 saites pārrāvums, atverot imidazola gredzenu, kā rezultātā veidojas FapyAde un FapyGua (sk. 4. att.). Hidroksilradikālis ir spējīgs atņemt H no guanīna -NH<sub>2</sub> grupas N9 un N1 pozīcijām. Purīna molekulu C8-OH- aduktradikāļa viena elektrona oksidācija izraisa 8-hidroksiguanīna (8-OH-Gua) un 8-hidroksiadenīna (8-OH-Ade) veidošanos (sk. 1.4. att.). Reaģējot OH<sup>•</sup> ar adenīnu, veidojas tā C4-OH- un C8-OH- aduktradikāļi, C5-OH- veidojas tikai 5% gadījumos (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).



1.4. att. C-8-OH- guanīna aduktradikāļa oksidēšanās un reducēšanās reakcijas (adaptēts no Dizdaroglu, 2012).

Pirimidīnu molekulām OH<sup>•</sup> pievienojas pie C5-C6 dubultsaites, veidojot C5-OH- (60% gadījumos) un C6-OH-aduktradikāļus (30% gadījumos) (sk. 1.5. att.). Timīnam H<sup>•</sup> radikālis tiek atņemts no metilgrupas, izveidojot tā saucamo allilradikāli 10% gadījumos (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).



1.5. att. Timīna reakcija ar hidroksilradikāli un tās produkti (adaptēts no Dizdaroglu, 2012).

Citidīnam C5-OH-aduktradikāli veidojas 87% un C6-OH- 10% gadījumos. Pirimidīnu C5-OH- un C6-OH-aduktradikāļu oksidācijai, sekojošā ūdens molekulas

pievienošana un deprotonizēšanas rezultātā, izveidojas timīnglikols un citozīnglikols. Savukārt allilradikālis pēc oksidācijas veido 5-hidroksimetiluracilu un 5-formiluracilu (sk. 1.1. tab.). Turpmāko reakciju produktu veidi ir atkarīgi no skābekļa pieejamības, kas reaģē ar pastarpinātiem radikāļiem, veidojot peroksilradikāļus, kas ir nestabili, un sadaloties veido turpmākos produktus (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).

1.1. tabula. DNS bāžu oksidatīvo bojājumu piemērs

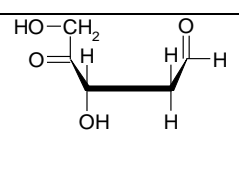
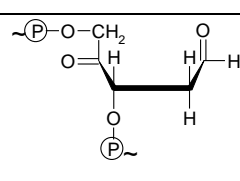
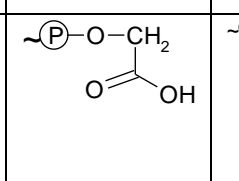
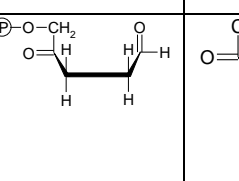
5- formiluracils	5- hidroksimetil- uracils	timīnglikols	citozīnglikols	uracilglikols
5- hidroksiuracils	4,6-diamino-5- formamido- pirimidīns	2,6- diamino- 4- hidroksi-5- formamido- pirimidīns	spiroimino- dihidantoīns	guanidino- hidantoīns

Adaptēts no: Dizdaroglu, 2012.

Hidroksilradikālis var atņemt H no jebkura DNS cukura atlikuma C atoma, veidojot dažādus produktus, kur cukura atlikums ir vai nu atdalīts no DNS molekulas, vai paliek DNS molekulā kā atvērts gredzens, vai arī veido DNS molekulas pārrāvuma galu (sk. 1.2. tab.)(Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012).

1.2. tabula. Ribozes molekulas oksidatīvo bojājumu piemērs

2- dezoksipentoze- 4-uloze	2- dezoksipentoze- 4-uloze	glikolskābe	2,3-didezoksi- pentoze- 4- uloze	2,5- didezoksi- pentoze-4-
----------------------------------	----------------------------------	-------------	--	----------------------------------

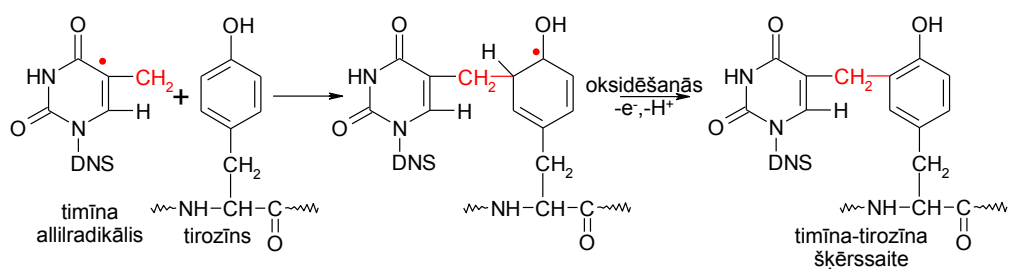
				uloze
atdalīta no DNS molekulas	DNS sastāvā	piesaistīta DNS 3'-galā	piesaistīta DNS 3'-galā	piesaistīta DNS 5'-galā

Adaptēts no: Dizdaroglu, 2012.

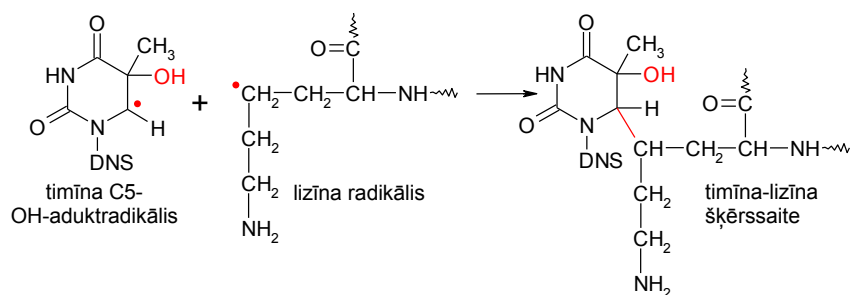
DNS tandēmojājumi veidojas, ja bojātās bāzes atrodas blakus uz vienas spirāles ķēdes vai arī uz pretējām, veidojot iekšķēdes vai starpķēžu saites. Ir novērotas G-T, G-C un A-T iekšķēžu saites. DNS molekulas starpķēžu saites ir atrastas starp T un A. Tikai dažus DNS tandēmojājumus šūna spēj reparēt. Tas ir atkarīgs no bojājuma tipa, attāluma starp bojājumiem, DNS ķēdes pārrāvumu esamības. Tie tandēmojājumu veidi, ko DNS glikozidāzes vai endoproteāzes nespēj reparēt, eksistē šūnā, iespējams, ietekmējot šūnas funkciju. Bojājumi, kas atrodas viens otram pretī uz DNS ķēdēm, var izveidot DNS pārrāvumus.

Hidroksilradikālis izraisa arī DNS un proteīnu saišu veidošanos. Ir atrastas saites starp T un tirozīnu. Kovalentā sasaiste veidojas starp timīna allilradikāli un tirozīna gredzena 3. pozīciju, ir konstatētās arī timīna-lizīna un citozīna-tirozīna saites zīdītāju hromatīnā (Evans et al., 2004; Dizdaroglu, 2012) (sk. 1.6. att.).

A.



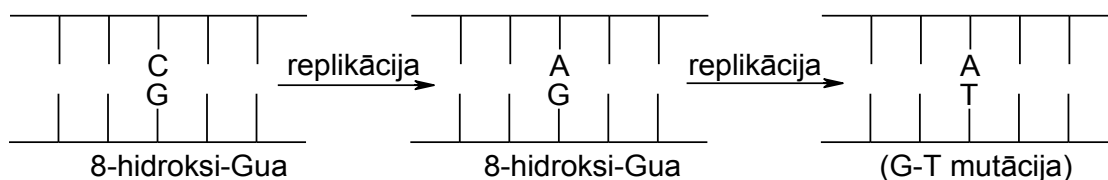
B.



1.6. att. Kovalento saišu veidošanās starp timīnu un aminoskābēm oksidatīvo DNS bojājumu rezultātā: A. timīns-tirozīns, B. timīns-lizīns (adaptēts no Dizdaroglu, 2012).

Galvenais reparācijas mehānisms, ko pielieto šūna, lai labotu oksidatīvos DNS bojājumus ir bāzu ekscīzijas reparācija (BER). Neatkarīgi no bojājuma veida: abāziskas vietas (AP), bāzes bojājums, DNS vienpavediena pārrāvums, DNS oksidatīvā bojājuma reparācija tiek iedalīta trīs posmos: 1. bojājuma atpazīšana, 2. ķēdes pārgriešana, spraugas aizpildīšana un 3. DNS ķēdes sintēze un savienošana. Proteīnu kompleksi, kas piedalās šajos posmos, ir atkarīgi no tā, kāds DNS bojājums ir jālabo, kā arī no tā, kādi starpprodukti veidojas reparācijas procesā (Svilar et al., 2011).

Pirmais reparācijas posms notiek, monofunkcionālai DNS glikozidāzei atpazīstot un izgriežot uracilu un alkilētās bāzes. Tiek pārgriezta N-glikozīdsaite, tādējādi izveidojot abāziskas DNS (AP) vietas. Savukārt oksidētās bāzes atpazīst un izgriež bifunkcionālās DNS glikozidāzes ar AP liāzes aktivitāti. Līdz šim ir atklātas piecas DNS glikozidāzes, kas ir specifiskas oksidētām DNS bāzēm. OGG1 un NTH1, kas pieder pie Nth saimes. NEIL1, NEIL2 un NEIL3 ir NEI saimes pārstāvji. Glikozidāzēm piemīt dažāda liāžu aktivitāte, tādējādi veidojot DNS vienpavediena pārrāvumus ar dažādiem galiem. Ir atrasta arī specifiska DNS glikozidāze – MYH, kas izgriež nemodificēto A no A un 8-OH-Gua pāra DNS molekulā, šī procesa traucējumi var izraisīt punktveida mutācijas (Svilar et al., 2011; Hegde et al., 2012b) (sk. 1.7. att.).



1.7.att. **8-hidroksi-Gua** izsauktā punktveida mutācija (adaptēts no Svilar et al. 2011).

ROS vai monofunkcionālo glikozidāžu izveidotās AP vietas hidrolizē AP endonukleāze 1 (APE1), izveidojot zīdītāju šūnās vienkāršā pārrāvumus ar 3' OH un 5' dezoksiribozes fosfāta (dRP) galiem. Šie DNS glikozidāžu vai APE1 izveidotie DNS gali nav piemēroti DNS sintēzei vai savienošanai, tamdēļ tos nogriež BER otrajā posmā. BER un vienkāršā pārrāvumu reparācijai šis posms ir identisks, specifiski ir tikai enzīmi, kas apstrādā dažādos DNS galus. APE1 un polinukleotīdu kināzes 3' fosfotāze ir divi galvenie DNS galu modulējošie enzīmi. APE1 izveidotos dRP DNS galus zīdītāju šūnās nogriež DNS polimerāze  $\beta$ , kurai piemīt 5'dRP liāzes aktivitāte. 5'dRP DNS galu oksidācija, kas bieži notiek oksidatīvā stresa apstākļos, DNS polimerāzes  $\beta$  darbību padara neefektīvu. Oksidētais 5'dRP gals tiek atdalīts tā saucamajā spraugas aizpildīšanas procesā kopā ar 2-8 papildus nukleotīdiem, kurus nogriež endonukleāze FEN-1 (*flap endonuclease I*) (Svilar et al., 2011; Hegde et al., 2012b).

Atkarībā no tā, cik liels ir bojājums, izšķir viena nukleotīda ievietošanas reparāciju (SN-BER) un „ielāpa” reparāciju (LP-BER, *long patch repair*), kura lielums var variēt no 2-8 nukleotīdiem augšupejoši no bojājuma vietas. SN-BER veic DNS polimerāze  $\beta$ . LP-BER kopā ar FEN-1 piedalās vesela virkne enzīmu. To, kurš no spraugas aizpildīšanas procesiem tiks ierosināts, ir atkarīgs no DNS pavediena 5'-fosforibozes gala (normāls vai oksidēts) un tā, kādā dzīves ciklā atrodas šūna. Ir dati, ka LP-BER notiek DNS replikācijas laikā. Spraugas ligēšanu veic DNS ligāze III $\alpha$  un DNS ligāze I (Svilar et al., 2011; Hegde et al., 2012b).

### 1.3. Oksidatīvā stresa modeļi

#### 1.3.1. Streptozotocīna izsauktais 1. tipa cukura diabēts

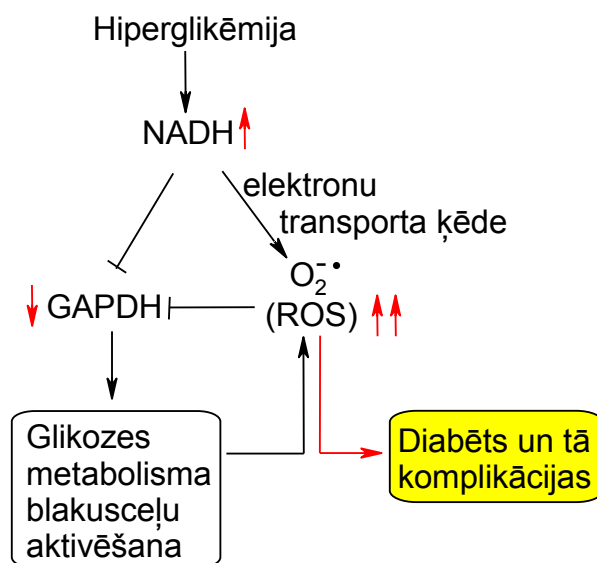
Streptozotocīns ir nitrozourīnvielas atvasinājuma un glikozes savienojums. Lai izraisītu 1TCD žurkās, STZ var ievadīt divējāda veidā. Ja ievada vienu lielu devu 35-65 mg/kg intraperitoneāli vai intravenozi, tas izraisa ātru  $\beta$  šūnu nāvi un hiperglikēmiju. Savukārt, ja STZ ievada mazākās devās 20-40 mg/kg vairākkārtīgi, tiek izsaukts citokīnu inducēts insulīts un sekojošs 1TCD (King, 2012). Lai pierādītu 1. tipa cukura diabētu un streptozotocīna ietekmi uz  $\beta$  šūnām, izvērtē insulīna un glikozes līmeņus asinīs (Szkudelski, 2001).

GLUT2 glikozes transportieris nogādā STZ aizkuņģa dziedzera  $\beta$  šūnās. Tur STZ nitrozourīnvielas atlikums alkilē DNS molekulu un izraisa DNS fragmentēšanos. STZ molekula, metabolizējoties  $\beta$  šūnās, uzrāda NO $\cdot$  donora īpašības, kas līdzdarbojas DNS molekulas destrukcijas procesā. STZ stimulē arī brīvo radikāļu veidošanos  $\beta$  šūnās. Vienlaikus, stimulējot ksantīnoksidāzes aktivitāti, nomācot Krebsa ciklu un samazinot skābekļa uzņemšanu mitohondrijos, STZ paaugstina superoksīda radikāļa koncentrāciju. Tā rezultātā veidojas ūdeņraža pārskābe un hidroksilradikālis. Ņemot vērā paaugstināto NO $\cdot$  un O $_2^-$  līmeni  $\beta$  šūnās, ir iespējama peroksinitrīta veidošanās, kas piedalās šūnas lielo molekulu destrukcijā, tai skaitā DNS. Tādā veidā STZ inducēto DNS bojājumu rezultātā tiek aktivēta poli-ADP-ribozilēšana, kas izsmeļ jau samazinātās ATP rezerves, STZ nomāktā Krebsa cikla rezultātā. Tas nomāc insulīna sintēzi un sekrēciju.  $\beta$  šūnas iet bojā (Szkudelski, 2001).

Ilgstoši paaugstināts cukura līmenis asinīs izsauc papildus acetil-CoA produkciju. Tas, nonākot Krebsa ciklā, izraisa NADH pastiprinātu produkciju, tādējādi izsaukos mitohondriālās elektronu transporta ķēdes pārmērīgu noslogojumu. Pārmērīgi lielam NADH daudzumam oksidējoties, pastiprināti veidojas ROS, kas inaktivē gliceraldehīda 3-fosfāta dehidrogenāzi (GAPDH). Glikolīzes otrais posms tiek nomākts, un uzkrājas glikolīzes starpprodukti. Lai kompensētu nomākto metabolisma ceļu, tiek stimulēti alternatīvie glikozes metabolisma ceļi, kas ir saistīti ar pastiprinātu brīvo radikāļu veidošanos un palielina oksidatīvā stresa risku (Brownlee, 2001; Yan, 2014) (sk. 1.8. att.). Pirmais ir saistīts ar tā saucamo patoloģisko poliolu vielmaiņas ceļu. Otrais diabētisko komplikāciju attīstības ceļš ir



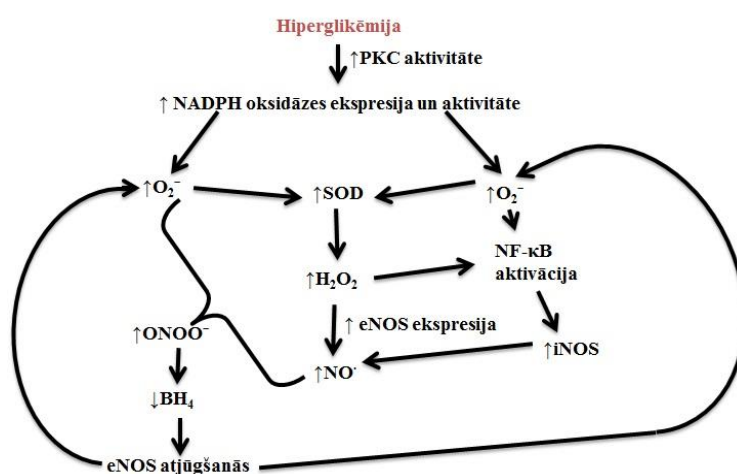
pastiprināts heksozamīna mehānisms. Trešais ir proteīnkināžu C izoformu aktivācija un ceturtais - pastiprināta AGE (dziļās glikēšanas galaprodukti) veidošanās (Brownlee, 2001; Yan, 2014).



1.8. att. **Hiperglikēmijas efekti šūnā.** Hiperglikēmija palielina NADH un mitohondriālo ROS veidošanos, kas samazina GAPDH aktivitāti. Šī inhibīcija aktivē glikozes metabolisma blakusceļus, kā rezultātā papildus veidojas ROS, kas ir iesaistīti glikotoksicitātē un atbildīgi par diabēta un tā komplikāciju attīstību (adaptēts no Yan, 2014).

Paaugstinātu ROS veidošanos endotēlija un miocītu šūnās hiperglikēmijas apstākļos nodrošina arī NADPH oksidāžu aktivitātes pieaugums un eNOS atjūgšanās. Hiperglikēmijas apstākļos NADPH oksidāzes caur PKC aktivāciju, ražo paaugstinātu O<sub>2</sub><sup>-</sup> daudzumu, ko SOD reducē par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tas paaugstina eNOS ekspresiju. NADPH oksidāzes ražotais O<sub>2</sub><sup>-</sup> un eNOS pastiprināti ražotais NO<sup>•</sup>, izveido ONOO<sup>-</sup>. Tas oksidē BH<sub>4</sub>, kas savukārt nepieciešams eNOS dimerizācijai, par BH<sub>2</sub>, kā rezultātā eNOS monomērs ražo O<sub>2</sub><sup>-</sup> slāpekļa oksīda vietā (sk. 1.9. att.) (Wenzel et al., 2008). Peroksinitrīts endoteliocītos aktivē PKC, tādā veidā stimulējot augstākminēto procesu (Pacher et al., 2007). Interesanti, bet ir arī dati, ka ilgstošas hiperglikēmijas apstākļos (9-12 nedēļas) eNOS proteīna ekspresija samazinās STZ inducētajam 1TCD žurku sirds audos, aortā un apzarņa artērijās, bet pēc 1 nedēļas ilgas hiperglikēmijas eNOS proteīna koncentrācij sirdī tikai nedaudz pārsniedz veselo žurku eNOS līmeni. Savukārt iNOS proteīna ekspresijas līmenis sirds audos, aortā un apzarņa artērijās 3., 9. un 12. hiperglikēmijas nedēļās pieauga 2,5 reizes par kontroles dzīvnieku iNOS

proteīna līmeni, kā arī pieauga nitrotirozīna līmenis audos, kas liecina par peroksinitrīta klātbūtni (Nagareddy et al., 2005). iNOS līmenis oksidatīvā stresa apstākļos tiek stimulēts caur NF- $\kappa$ B aktivāciju, ko veic ROS un RNOS (sk. 1.9. att.) (Gloire et al., 2006). Tādējādi, veidojoties endoteliocītos pārmērīgā daudzumā superoksīda radikālim un tam reaģējot ar eNOS un iNOS ražoto slāpekļa oksīdu, rodas toksiska molekula peroksinitrīts, kura pati un tās metabolīti bojā šūnas lielās molekulas, tai skaitā pastiprināti rada DNS molekulas vienpavediena pārrāvumus (El-Remessy et al., 2003; Szabo et al., 2007; Munzel et al., 2008), kā rezultātā tiek aktivēta DNS reparācijā iesaistītā molekula PARP. PARP pēc saistīšanās pie DNS bojājuma, katalizē NAD<sup>+</sup> šķelšanos par nikotīnamīdu un ADP-ribozi, kas polimerizējas un veido garus sazarojumus. Šī procesa rezultātā tiek izsmeltas NAD<sup>+</sup> rezerves, samazinās glikolīzes, Krebsa cikla, mitohondriju elektronu transporta efektivitāte, līdz ar to notiek ATP molekulas noplicināšanās, kas rezultējas šūnas disfunkcijā un nekrozē (Virag and Szabo, 2002; Pacher et al., 2007). Tādā veidā izsaucot endoteliālo disfunkciju un sekojoši diabētisko vaskulāro disfunkciju (Du et al., 2003).



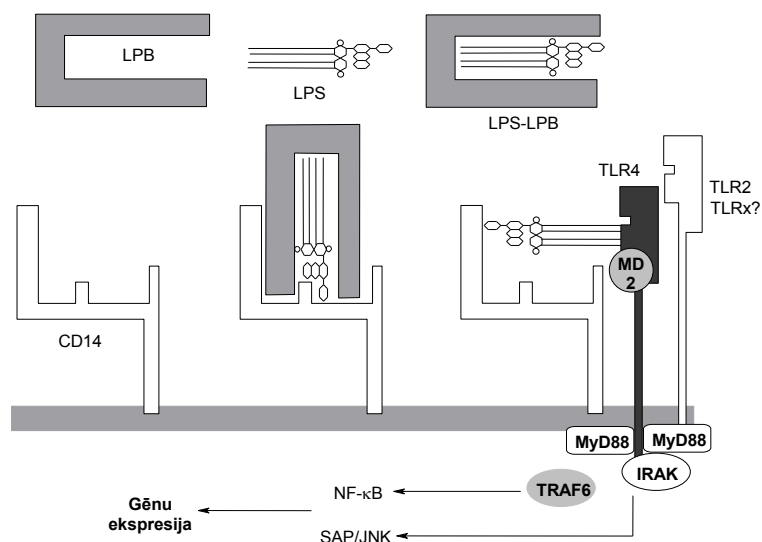
1.9. att. Hiperglikēmijas inducētās eNOS atjūgšanās mehānisms

### 1.3.2. Lipopolisaharīda inducētā sepse

Endotoksīnu inducētais sepse modelis ir viens no visizplatītākajiem tā vienkāršības un precizitātes dēļ. Lipopolisaharīds (LPS) ir stabila, relatīvi tīra molekula, ko var uzglabāt liofilizētā formā (Garrido et al., 2004). LPS var tik ievadīts vienreizējās injekcijās intraperitoneāli vai intravenozi, vai infūzijās. Visbiežāk,

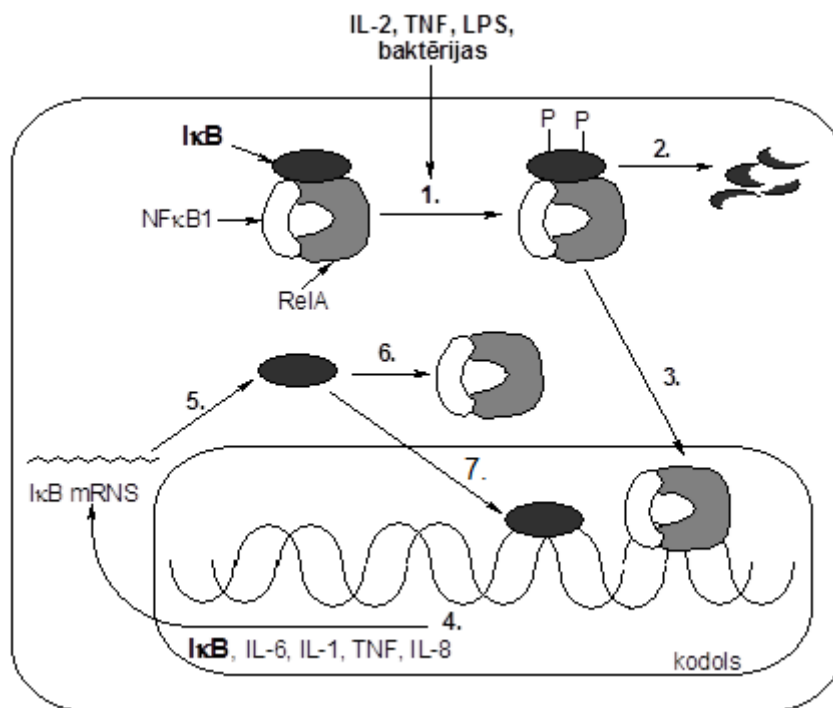
veidojot sepses modeli, tiek ievadīta augsta LPS deva, kursa ilgums un ievadīšanas vieta ir atkarīga no pētījuma mērķa (Parker and Watkins, 2001). Grauzēji, kaķi un suņi uzrāda relatīvu endotoksīna rezistenci, bet cilvēki, truši, aitas un pērtiķi – palielinātu uzņēmību (Garrido et al., 2004). Tātad pelēm letālā deva (LD50) ir 1000 līdz 10000 lielāka nekā cilvēkiem, un, lai inducētu smagu sepses stāvokli pelēm ir jāievada 1-25 mg/kg, bet cilvēkiem – 2-4 ng/kg. Pelēm akūta septiska šoka simptomātika ir pazemināts asinsspiediens, pienskābes acidoze, sirdsdarbības traucējumi, paaugstināti TNF $\alpha$ , IL-6, (HMGB)-1 līmeņi asinīs. Šie simptomi ir līdzīgi tiem, ko uzrāda cilvēka organisms sepses gadījumā (Fink, 2014).

Lipopolisaharīds tiek izdalīts no gram-negatīvām baktērijām. Tas ir glikokonjugāts, kas sastāv no O-antigēna, kodola-polisaharīda un kovalenti piesaistītā lipīda A, kas ir atbildīga par LPS bioloģiskajiem efektiem un tā lipofilitāte izraisa LPS molekulu agregāciju (Hodgson, 2006). LPS agregātus LBP (LPS-saistošais proteīns) disociē monomēros un veido LPS/LBP kompleksus, kas ir daudz aktīvāk inducē atbildes reakcijas. LPS/LBP kompleksi saistās ar mCD14 uz monocītu membrānas. Šis process aktivē monocītus vai stimulē tos izdalīt sCD14 ķermeņa šķidrumos. LPS/LBP kompleksi saistās ar mCD14, sCD14 un zīdītāja augsta blīvuma lipoproteīdiem (ABL). Saistīšanas ar ABL neitralizē LPS aktivitāti. sCD14/LPS komplekss savukārt var saistīties pie šūnām, kuras neekspresē CD14 receptoru, piemēram, pie endotēlija šūnām, tādā veidā stimulējot tās producēt citokīnus. Tomēr lielākā daļa endoteliocītu tiek stimulētās netieši ar citokīnu starpniecību, ko producē CD14 stimulētie monocīti. LPS uz monocītu šūnu virsmas saista arī CD11/CD18 receptori, CD18 saista LPS tikai tā augstās devās. Atkarībā no šūnu tipa dažādi membrānas proteīni: 18, 25, 38, 40 un 80 kDa, ir iesaistīti LPS saistīšanā. LPS/LBP/CD14 mijiedarbība ar MD-2 un TLR4 transmembrānas proteīniem palaiž signālu kaskādā šūnā, kur iesaistītas adaptermolekula MyD88 un ar interleikīna-1 receptoru asociētā kināze (IRAK). Tās aktivē TNF receptora asociēto faktoru 6 (TRAF6), kas stimulē NF- $\kappa$ B un JNK/SAP (c-Jun N-terminālās kināzes/stresa aktivētas proteīnkināzes) aktivitāti. Šīs abas sistēmas ir iesaistītas vairāku iekaisuma reakcijas proteīnu ekspresijas palielināšanā (Heumann and Roger, 2002) (sk. 1.10. att.). iNOS gēna mRNS parādās divas stundas pēc makrofāgu stimulācijas ar interferonu gamma un LPS, bet iNOS proteīns – četras stundas pēc indukcijas. iNOS proteīna klātbūtne audos ir iekaisuma biomarķieris (Xie et al., 1992).



1.10. att. **Lipopolisaharīda inducētais signālpārnese ceļš** (adaptēts no Heumann and Roger, 2002).

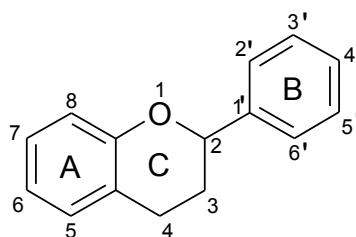
NF- $\kappa$ B ir viens no galvenajiem, visvairāk pētītākajiem iNOS gēna un proteīna ekspresiju stimulējošiem faktoriem. Tātad NF- $\kappa$ B ir inducējama transkripcijas faktors, kas var sastāvēt no dažādām subvienībām. Lielākā daļā šūnu tas sastāv no p65 un p50. Kā jau ir minēts augstāk, NF- $\kappa$ B tiek aktivēts ar LPS, IL-1, TNF- $\alpha$  un citām vielām. Vienreiz aktivēts NF- $\kappa$ B aktivē vairākus gēnus un sekojoši proteīnus, kas ir atbildīgi par agrīno imūno atbildi uz akūtu iekaisumu, tai skaitā ir iNOS, ciklooksigenāze-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  un citus. I $\kappa$ B saimes endoplazmatiskie inhibitori saista NF- $\kappa$ B un notur to citoplazmā, neļaujot migrēt uz kodolu. Pie NF- $\kappa$ B inhibitoru saimes pieder I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$  un citi. Visvairāk pētīts ir I $\kappa$ B $\alpha$ . Tas ir piesaistīts pie NF- $\kappa$ B p65 subvienības. Brīdī, kad notiek NF- $\kappa$ B stimulācija, I $\kappa$ B kināze (IKK) fosforilē I $\kappa$ B. I $\kappa$ B tiek selektīvi degradēts. Atbrīvotais NF- $\kappa$ B migrē uz šūnas kodolu, kur saistās pie, piemēram, iNOS promotera kappaB reģiona un inducē iNOS gēna transkripciju. Tas, cik ilgstoša būs NF- $\kappa$ B atbildes reakcija uz stimulāciju, ir atkarīgs no I $\kappa$ B saimes pārstāvja tipa. Piemēram, I $\kappa$ B $\alpha$  reaģē uz stimulāciju 10 minūšu laikā, bet tā resintēze ar NF- $\kappa$ B molekulu notiek jau pēc stundas. No jauna sintezētā I $\kappa$ B $\alpha$  molekula piesaistās pie NF- $\kappa$ B un apstādina tā inducēto gēnu transkripcijas stimulāciju. Savukārt I $\kappa$ B $\beta$  degradācija notiek vairākas stundas, kas realizējas NF- $\kappa$ B ilgstošā aktivācijā vairāk kā divdesmit stundas (sk. 1.11. att.). Tādējādi dažādu audu un šūnu atbildes reakcija uz iekaisuma faktoriem, var atšķirties gan pēc intensitātes, gan pēc ilguma (Jobin and Sartor, 2000).



1.11. att. **NF-κB aktivitātes regulēšana.** 1. NF-κB atrodas inaktivētā stāvoklī citoplazmā kompleksā ar inhibējošo proteīnu – IκB, noteikta stimulācija izraisa selektīvu IκB fosforilāciju; 2. IκB tiek ubikvitinēts un degradēts proteosomās; 3. atbrīvotais NF-κB migrē uz šūnas kodolu un 4. inducē vairāku NF-κB atkarīgo gēnu transkripciju; 5. no jauna sintezētais IκB; 6. saista NF-κB citoplazmā un 7. kodolā inaktivējot to (adaptēts no Jobin and Sartor, 2000).

### 1.4. Flavonoīdi

Polifenolu savienojumi ir vieni no visvairāk izplatītajām savienojumu grupām augu valstī. Ir zināmas vismaz 8000 polifenolu struktūras, kurām ir aromātiskais gredzens riņķis ar hidroksilaizvietotājgrupu (Croft, 1998). Polifenoli tiek iedalīti piecpadsmit klasēs (Xiao and Kai, 2012). Lielākā polifenolu klase ir flavonoīdi, kuri sastāv no diviem aromātiskiem gredzeniem, kas savienoti ar trim oglekļa atomiem (sk. 1.12. att.) (Ross and Kasum, 2002; Manach et al., 2004).



### 1.12. att. **Flavonoīdu pamatstruktūra** (adaptēts no Croft, 1998).

Flavonoīdi ietver sevī vairākas augu metabolītu grupas, halkonus, auronus, flavononus, izoflavonīdus, flavonus, flavonolus, katehīnus jeb flavolonus, antocianīnus, leikoantocianidīnus. Flavonoīdi ir sastopami augļos, dārzeņos, tējā, kakao, vīnā u.c. (Croft, 1998; Manach et al., 2004).

Dabā flavonoīdi eksistē glikozilētā veidā: glikozīdi, galaktozīti, rutinozīdi utt. (Kachlicki et al., 2008; Veitch and Grayer, 2011). Daudzi pētnieki uzskata, ka deglikozilēšana notiek zīdītāju tievajās zarnās un tikai kā aglikoni (flavonoīdi bez cukura atlikuma), mazas hidrofobas molekulas tie var difundēt caur zarnu sienīņu uz asinsriti, pateicoties pasīvajai difūzijai (Chen et al., 2011). Flavonoīdu glikozilētās formas to nespēj hidrofilitātes un lielās molekulārās masas dēļ (Zhang et al., 2005; Dai et al., 2008). Viens no hidrolāžu avotiem ir zarnu mikroflora (Bokkenheuser et al., 1987; Hur et al., 2000). Pēc hidrolīzes un migrēšanas enterocītos, notiek flavonoīdu molekulas konjugēšana (Sesink et al., 2001; Felgines et al., 2005). Asinsritē flavonoīdi saistās pie asins proteīniem, lielākoties, pie albumīna, un to afinitāte savukārt ir atkarīga no flavonoīda struktūras (Manach et al., 2004). Citohroma P450 enzīmi aknu mikrosomās metabolizē flavonoīdus pirms to ekskrecijas. Zīdītāju organismos flavonoīdi tiek atrasti urīnā un žultī kā glikuronīdi, sulfāti vai metilētajā formā (Heim et al., 2002).

Flavonoīdu antioksidatīvās un radikāļus neitralizējošās īpašības tiek skaidrotas ar to strukturālām īpatnībām. Hidroksilgrupu klātbūtne uz B gredzena (sk. 1.12. att.) demonstrē nozīmīgu lomu elektronu rezonansē, kā arī mijiedarbībā ar oksidētājiem. Orto-hidroksifenil grupa uz B gredzena ir nozīmīga strukturāla prasība, lai molekula varētu veikt antiradikāļu funkciju – elektrona nodošanu oksidējošam aģentam. B gredzena torsijas leņķis pret pārējo molekulas daļu korelē ar vielas radikāļus neitralizējošo aktivitāti. C3-OH aizvietošana (metilēšana vai glikozilēšana) var izmainīt gredzenu B un A (kā arī C) savstarpēju novietošanu. A gredzenam nav lielas lomas antiradikāļu aktivitātē. Tāpēc hidroksilgrupu klātbūtne uz B un C gredzeniem ir būtiska antioksidatīvo un antiradikāļu funkciju veikšanai (Yi et al., 2012).

## 1.4.1. Flavonu grupas dabas vielas

### 1.4.1.1. Luteolīns

Luteolīns ir viens no visbiežāk sastopamajiem flavonoīdiem pārtikas produktos. Tas pieder pie flavonu grupas. Līdz šim tam ir zināma pretvēža (Seelinger et al., 2008b), estrogēnā (Zand et al., 2000), antiestrogēnā (Han et al., 2002), pretiekaisuma, antialerģiska, anti- un prooksidatīvā aktivitāte (Seelinger et al., 2008a). Pievēršot lielāku uzmanību pēdējām divām, jānorāda, ka luteolīns uzrāda divas klasiskas antioksidantu strukturālas īpašības: pirmā ir 3'-4'-orto-dihidroksil grupa (B gredzens), otrā – 2.-3. dubultsaite konjugācijā ar karbonilgrupu oglekļa 4. pozīcijā (sk. piel. Nr. 9.9.). Pirmā ir kā ūdeņraža elektronu donors, lai neitralizētu brīvos radikāļus, bet, otrā izpaužas spējā saistīt vara un dzelzs jonus (Mira et al., 2002). Luteolīns uzrāda spēju neitralizēt ROS, RNOS (Cai et al., 1997; Odontuya et al., 2005) un novērš Fentona reakciju (Cheng and Breen, 2000; Mira et al., 2002). Luteolīnam piemīt spēja inhibēt prooksidatīvos enzīmus, piemēram, luteolīns samazina  $O_2^-$  veidošanos, nomācot ksantīnoksidāzes aktivitāti (Nagao et al., 1999). Spēj inducēt antioksidatīvo enzīmu: glutathion-S-transferāzes, glutathionreduktāzes, superoksīda dismutāzes un katalāzes aktivitāti (Ross and Kasum, 2002; Manju and Nalini, 2005; Leung et al., 2006). Luteolīns nomāc enzīmu: lipooksigenāzes, ciklooksigenāzes aktivitāti (Robak et al., 1988), kas katalizē šūnas komponentu oksidēšanos.

Luteolīnam ir novērotas arī prooksidanta aktivitāte vēža šūnās (Matsuo et al., 2005; Ju et al., 2007). Luteolīna anti- un prooksidatīvais mehānisms līdz galam nav izprasts, bet pastāv uzskats, ka tas ir atkarīgs no brīvo radikāļu (Cao et al., 1997) un no vara, dzelzs, un kadmija jonu koncentrācijas šūnā. Brīdī, kad dzelzs jonu koncentrācija šūnā ir zem 50  $\mu$ M, luteolīns uzvedas kā antioksidants, bet pieaugot dzelzs jonu koncentrācijai virs 100  $\mu$ M, tiek inducēts prooksidatīvais efekts (Sugihara et al., 1999). Luteolīna klātbūtnē ir novērota mangānsuperoksīda dismutāzes (MnSOD), kas konvertē  $O_2^-$  par  $H_2O_2$ , aktivitātes nomākšana. Tas liek domāt par citu luteolīna inducēto prooksidatīvo mehānismu (Ju et al., 2007). Antioksidatīvā luteolīna aktivitāte ir cieši saistīta ar DNS oksidatīvo bojājumu novēršanu, DNS molekulas pasargāšanu, bet tā prooksidatīvā aktivitāte ar DNS molekulas bojājumu izsaukšanas procesu. Luteolīns var darboties kā ķīmioprotektīvs aģents, pasargājot šūnu no dažāda

veida oksidatīvā stresa, bet no otras puses, luteolīns var kā prooksidants izsaukt vēža šūnu apoptozi (Shen et al., 2004; Matsuo et al., 2005). Starp pārējām luteolīna īpašībām gribētos pieminēt tā spēju nomākt DNS topoizomerāzes I un II, enzīmu aktivitāti, kas ir atbildīgi par DNS bojājumu, reparāciju, un spēju interkalēt DNS molekulu, izsaucot DNS dubultpārrāvumus (Chowdhury et al., 2002).

#### 1.4.1.2. Baikaleīns

Ir dati, ka baikaleīnam piemīt pretvēža (Moon et al., 2006; Kim et al., 2014), pretiekaisuma (Gautam and Jachak, 2009), anti- un prooksidatīvas īpašības (Firuzi et al., 2011). Šī viela tiek plaši izmantota ķīniešu tradicionālajā medicīnā un ir atrodama lielā daudzumā *Scutellariae baicalensis* Georgi saknēs (*Radix Scutellariae*) (Li-Weber, 2009). Strukturāli baikaleīnam nav orto-dihidroksil grupas (B gredzens), kas tiek uzskatīta par būtisku antioksidatīvo funkciju veikšanai, toties 4. pozīcijā atrodas karbonilgrupa un C gredzens satur trīs hidroksilgrupas (sk. piel. Nr. 9.9.), kas pastiprina vielas antioksidatīvo un antiradikāļu aktivitāti.

Baikaleīns spēj saistīt superoksīda un hidroksilradikāli tieša veidā *in vitro* (Hamada et al., 1993; Gao et al., 1999). Pēc baikaleīna injekcijas (30 mg/kg) *Sprague-Dawley* žurkām samazinājās paaugstinātais tiobarbiturskābes reaktīvā substances (TBARS) līmenis, kas tika paaugstināts ar FeCl<sub>3</sub> injekciju, tai pašā laika neietekmējot SOD aktivitāti. Tika proponēts, ka baikaleīns neitralizē *in vivo* superoksīda, hidroksil- un citus radikāļus, tādējādi pasargājot šūnas no nāves (Hamada et al., 1993). Tas arī uzrāda lipīdu peroksidāciju samazinošu efektu *in vitro* žurku smadzeņu garozas šūnu mitohondrijos un paaugstina cilvēka neiroblastomas šūnu izdzīvošanas spējas pēc apstrādes ar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Gao et al., 1999).

Baikaleīns samazina lipopolisaharīda inducēto slāpekļa oksīda produkciju peļu makrofāgos (Wakabayashi, 1999) un pasargā mikroglijas šūnas iekaisuma modelī, samazinot šūnās citotoksisko slāpekļa oksīda sintēzi (Suk et al., 2003). Ir izpētīts, ka LPS stimulētajos peļu makrofāgos baikaleīns, inhibējot NF-κB vienību p50 un p65 aktivāciju, nomāc iNOS proteīna ekspresiju, tādā veidā uzrādot pretiekaisuma efektu (Kim et al., 2013a).

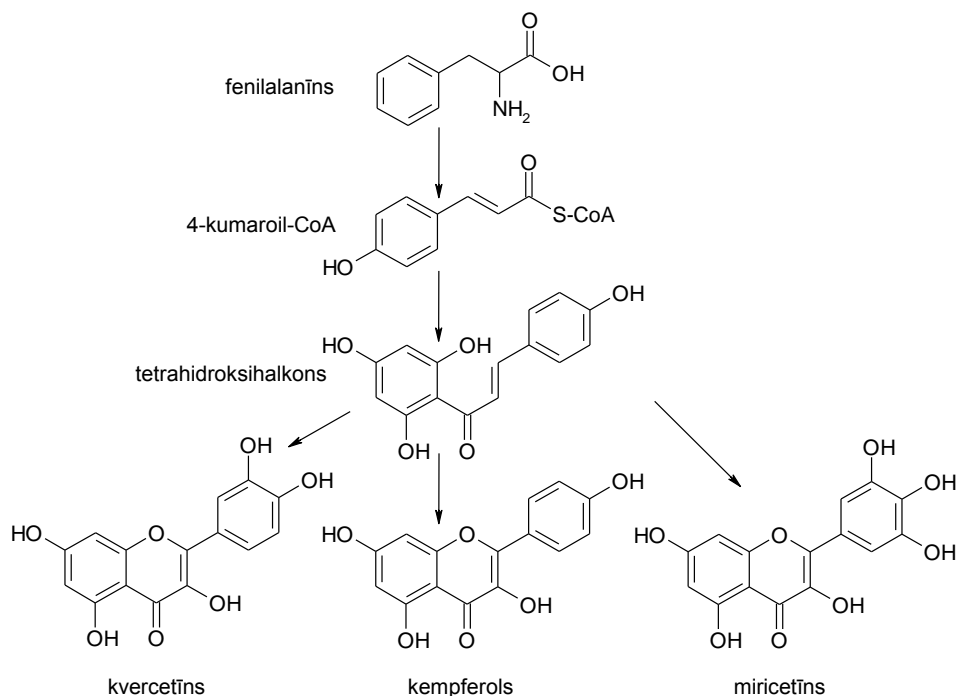
Savukārt baikaleīna pretvēža aktivitāte varētu būt saistīta ar tā prooksidatīvajām īpašībām. Cilvēka leukēmijas šūnās tas zemās koncentrācijās (5-20



$\mu\text{M}$ ) stimulēja brīvo radikāļu veidošanos un inducēja apoptotisku procesu, savukārt paaugstina vielas koncentrāciju, šādu efektu nenovēroja (Makino et al., 2006), ko apstiprina arī citu pētnieku dati darbā ar osteokarcinomas šūnām (Ye et al., 2015).

### 1.4.2. Flavonolu grupas dabas vielas

Kemferols, miricetīns un kvercetīns pieder pie flavonolu grupas. Tie ir polifenolu savienojumi ar diviem hidroksilētiem fenola gredzeniem: A un B, kurus savieno trīs oglekļa atomu ķēde, kas ir daļa no heterocikliskā gredzena- C (sk. 1.13. att.). Augos šīs vielas pastāv glikozīdu, galaktozīdu, rutinozīdu un glikuronīdu formā. Cukura atlikums atrodas flavonoīda struktūras 3 pozīcijā (Flamini et al., 2013).



1.13. att. Flavonolu grupas vielu biosintēze augos (adaptēts no Flamini, 2013).

#### 1.4.2.1. Kemferols

Kemferols pieder pie flavonolu grupas. Tas satur karbonilgrupu 4. oglekļa pozīcijā, vienu hidroksilgrupu 4' pozīcijā uz B gredzena un vairākām hidroksilgrupām uz A un C gredzeniem (sk. 1.13. att.) (Flamini et al., 2013). Kemferolam piemīt pretiekaisuma, antibakteriālas, pretvēža, kardioprotektīvas, neiroprotektīvas, anti-diabētiskas, antiosteoporotiskas, estrogēniskas/antiestrogēniskas,

anksiolītiskas, pretalerģiskas, analgētiskas un antioksidatīvas īpašības (Calderon-Montano et al., 2011). Cilvēka embrionālās nieru šūnās kemferols būtiski samazina stimulēto ROS produkciju (Lee et al., 2009). Kemferols izraisa hēma oksigenāzes gēna, kas paaugstina šūnas antioksidatīvo kapacitāti, ekspresijas pieaugumu (Hong et al., 2009). Savukārt glioblastomas šūnās kemferols paaugstina oksidatīvā stresa līmeni, kas izraisa apoptozi, uzrādot pretvēža aktivitāti (Sharma et al., 2007). Peļu monocītu-makrofāgu šūnās kemferols bloķē IL-1 $\beta$  un TNF- $\alpha$  ekspresiju (Kowalski et al., 2005). Līdz ar to tiek nomākta NF- $\kappa$ B migrācija uz šūnas kodolu un netiek aktivēti no NF- $\kappa$ B atkarīgie gēni (Hamalainen et al., 2007). Pateicoties savām strukturālajām īpatnībām, kemferols ir labs peroksinitrīta saistītājs (Heijnen et al., 2001a). 2014. gadā Subash C. Gupta un līdzautori publicēja apskata rakstu, kur apkopoja dažādu flavonoīdu ietekmi uz TNF- $\alpha$  un citiem iekaisuma marķieriem. *In vitro* pētījumos kemferols uzrāda TNF- $\alpha$ , slāpekļa oksīda, IL-6, iNOS un COX inhibīciju LPS stimulētos peļu makrofāgos; nomāc TNF- $\alpha$  produkciju un NF- $\kappa$ B aktivāciju LPS stimulētos cilvēka endoteliocītos; samazina LPS stimulēto TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO un ROS produkciju un fagocitozi mikroglijas šūnās. Kemferols izraisa TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  un IL-6 pārprodukcijas samazināšanos pelēs LPS iekaisuma modeļa apstākļos (Gupta et al., 2014).

#### 1.4.2.2. Kvercetīns

Kvercetīns (sk. 1.13. att.) ir galvenais flavonoīds šādās vīnogu šķirnēs: *Chardonnay*, *Riesling*, *Sauvignon Blanc*, *Pinot Noir*, *Nebbiolo*, *Sangiovese*, *Teroldego* (Mattivi et al., 2006). Diēta, kas ir bagāta ar dabas vielām, tai skaitā flavonoīdiem, samazina ar oksidatīvo stresu saistīto slimību: cukura diabēta, koronārās sirds slimības, insulta incidences risku (Zhu and Silverman, 2008). Kvercetīns ir flavonols ar 3'-4'-orto-dihidroksil grupu uz B gredzena-, kā arī tam ir hidroksilgrupas uz A un C gredzeniem, kas pēc literatūrās datiem pastiprina vielas antiradikālas un antioksidatīvās īpašības (sk. 1.13. att.) (Wang et al., 2006; Flamini et al., 2013). Tomēr aktivitātes un struktūras saistības līdz šim vēl nav līdz galam noskaidrotas. Kvercetīns pieder arī pie to flavonoīdu grupas, kuru struktūrā ietilpst 3'-4'-orto-dihidroksil grupa B gredzenā, kas ir spējīga neitralizēt peroksinitrīta molekulu, arī

hidroksilgrupa 3. pozīcijā ir svarīga, taču farmakofora aktivitāte ir saistīta ar aizvietotājiem piektajā un septītajā pozīcijā (Heijnen et al., 2001a).

Kvercētīns arī regulē NF-κB ekspresiju šūnu līnijām specifiski (Raines et al., 2007; Thomas et al., 2008) un ir topoizomerāžu I un II inhibitors, kas izsauc DNS pārrāvumu skaita pieaugumu (Lundberg and Weitzberg, 2010).

#### 1.4.2.3. Miricetīns

Miricetīns (sk. 1.13. att.) ir flavonols ar trim hidroksilgrupām 3', 4', 5'. pozīcijās uz B gredzena, divām 5. un 7. pozīcijās uz A gredzena un vienu 3. pozīcijā uz C gredzena (Flamini et al., 2013). Struktūras – aktivitātes pētījumi parādīja, ka A, C un B gredzenu (3'-4'-orto-dihidroksilgrupa) polihidroksilācija, 2.-3. dubultsaite un karbonilgrupa 4. pozīcijā ir būtiska miricetīna antioksidatīvo efektu realizācijai (Furuno et al., 2002; Yi et al., 2012), kā arī tā atbilst peroksinitrīta neitralizācijas nosacījumiem (Heijnen et al., 2001a). To apstiprina *in vitro* pētījumi, kur miricetīns efektīvi neitralizē  $O_2^-$  (Robak and Gryglewski, 1988), samazina  $O_2^-$  un ROS veidošanos cilvēka endoteliālajās šūnās un nomāc NF-κB migrāciju uz kodolu (Yi et al., 2012). Miricetīns ietekmē arī iekaisuma procesus, inhibējot TNF-α un IL-1β sekrēciju LPS inducētos makrofāgos (Gupta et al., 2014) un samazinot IKK kināžu aktivitāti TNF-α stimulētās cilvēka endotēlija šūnās, tādējādi inhibējot NF-κB transducijas ceļu (Tsai et al., 1999). Miricetīns piemīt ne tikai ROS neitralizējošas, bet tas arī paaugstina SOD, CAT un GPx aktivitāti un uzrāda DNS molekulu pasargājošas īpašības pēc fibroblastu apstrādes ar  $H_2O_2$  (Wang et al., 2010). Tomēr citu autoru darbā miricetīns, salīdzinot ar citiem flavonoliem, neuzrādīja  $O_2^-$  neitralizējošas īpašības un ļoti vāji neitralizēja hidroksilradikāli pēc makrofāgu stimulācijas ar LPS (Wang et al., 2006). Miricetīnam piemīt arī prooksidatīva aktivitāte - Fentona reakcijas apstākļos *in vitro* pastiprina  $OH^\cdot$  radikāļu veidošanos (Hanasaki et al., 1994) un uzrāda DNS bojājumus stimulējošu efektu žurku leukocītos bleomicīna klātbūtnē (Laughton et al., 1991).

## 1.5. Karotinoīdu grupas dabas vielas

### 1.5.1. Likopēns

Likopēns (sk. piel. Nr. 9.9.) ir karotinoīds, kuru lielā daudzumā atrod tomātos (Basu and Imrhan, 2007). Likopēnam piemīt pretvēža (Bilecova-Rabajdova et al., 2013), kardioprotektīvas (Friedman, 2013), antioksidatīvas (Basu and Imrhan, 2007) īpašības, tas pasargā no osteoporozes, hipertensijas, vīriešu neauglības, neurodeģeneratīvām slimībām u.c. saslimšanām (Rao et al., 2006), tai skaitā ir ziņojumi, ka likopēns pasargā no diabētiskajām komplikācijām (Li et al., 2014). Tā kā karotinoīdi tiek uzņemti ar pārtiku, tad, lai organisms varētu tos efektīvi absorbēt, barība ir mehāniski jāapstrādā (jāpagatavo), lai sadragātu pārtikas produktu ekstracellulāro matriksu un atvieglotu karotinoīdu uzsūkšanos tievajās zarnās, kur tie tiek emulgēti micellās. Absorbēcija enterocītos notiek ar SR-B1 (B klases tipa saistītājreceptoru 1. proteīna transportieris) transportiera palīdzību, kas atrodas tievajās zarnās, kā arī aknās, virsniņu dziedzeros, olnīcās, placentā, nierēs, prostatā un smadzenēs. Tādējādi tiek uzskatīts, ka SR-B1 ir atbildīgs par karotinoīdu transportu no lipoproteīdiem uz audiem un no audiem uz lipoproteīdiem. Karotinoīdi tievajās zarnās tiek absorbēti arī pasīvās difūzijas ceļā, kur tiek šķelti par A vitamīnu un pārējiem metabolītiem vai arī tiek iepakoti hilomikronos un sekretēti limfātiskajā sistēmā, lai transportētu uz aknām. Aknas uzkrāj vai arī sekretē karotinoīdus sevišķi zema blīvuma lipoproteīdu, zema blīvuma lipoproteīdu, augsta blīvuma lipoproteīdu veidā un transportē tos uz perifērajiem audiem (Wang, 2012).

Likopēns ir stiprs antioksidants – 10 reizes stiprāks par  $\alpha$ -tokoferolu (Di Mascio et al., 1989). Tas ķīmiski mijiedarbojas ar ROS, oksidējas un tādējādi pasargā šūnas no ROS inducētās šūnu nāves (Palozza et al., 2010a). Likopēns ietekmē antioksidantu atbildes elementus (ARE), ROS producējošos enzīmus, guanozīn-5'-trifosfātāzes, mitogēnu aktivētās proteīnkināzes (MAPK), NF- $\kappa$ B, aktivēšanas proteīnu-1, reducēšanas- oksidēšanas jutīgos un daudzus citus proteīnus (Palozza et al., 2012). Likopēns samazina iNOS proteīnu un mRNS līmeni kā arī NO<sup>•</sup> produkciju LPS stimulētos peļu makrofāgos (Rafi et al., 2007). Ir arī dati, ka likopēns žurkām samazina iNOS aktivitāti streptozotocīna inducētā cukura diabēta gadījumā (Zhu et al., 2011). Likopēns 30 mg/kg koncentrācijā samazina DNS pārrāvumu līmeni cilvēku

limfocītos (Devaraj et al. 2007). Pēc likopēna uzņemšanas 15 mg/kg vienu nedēļu ilgā kursā veselo brīvprātīgo limfocīti uzrādīja lielāku izturību pret H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ietekmi *ex vivo* (Torbergsen et al. 2000). Likopēna koncentrācijas pieaugums veselo vīriešu serumā samazina limfocītu DNS „komētas astes” garumu (DNS vienpavediena bojājumus) (Kim et al., 2010). 2007. gadā Basu un Imrhan apkopoja 72 pētījumus cilvēkiem, kur likopēns uzrādīja DNS pasargājošas, lipīdu peroksidāciju samazinošas un pretvēža īpašības (Basu and Imrhan, 2007).

## 1.6. Alkoloīdu grupas dabas vielas

### 1.6.1. Indol-3-karbinols

Indol-3-karbinols (sk. piel. Nr. 9.9.) ir glikobrassicīnu sadalīšanās produkts krustziežu dzimtas dārzeņos. Indol-3-karbinols uzrāda pretvēža (Manson et al., 2000; Sarkar and Li, 2004), pretiekaisuma (Jiang et al., 2013) un antioksidatīvas (Ratnam et al., 2006) īpašības. Indol-3-karbinols ietekmē NF-κB, JAK/STAT un citus signālpārneses ceļus dažādos līmeņos, kas ir apkopots 2005. gada *Margaret M. Manson* apskata rakstā (Manson, 2005). 3,3'-diindolilmetāns (DIM), kas ir galvenais indol-3-karbinola metabolīts, samazina iNOS ekspresiju pelēm pēc 12-O-tetradecanoilforbol-3-acetāta izsauktā ādas iekaisuma, kā arī samazina COX-2 un IL-6 ekspresiju, tādējādi samazinot iekaisuma izpausmes (Kim et al., 2010). DIM LPS stimulētos peļu makrofāgos samazina iNOS proteīna sintēzi, tā koncentrācijas izmaiņas korelē ar iNOS gēna ekspresiju un slāpekļa oksīda koncentrāciju. Ir arī dati, ka pats indols-3-karbinols samazina NO<sup>-</sup>, iNOS gēna un iNOS proteīna līmeni LPS un interferona-gamma (IFN-γ) stimulētos peļu makrofāgos (Chen et al., 2003). DIM inhibē LPS inducēto NF-κB un AP-1 signālu kaskādes aktivāciju, DIM nomāc arī TNF-α, IL-6 un IL-1β gēnu ekspresiju pēc LPS stimulācijas, kā arī samazina IL-6 un IL-1β proteīnu ekspresiju peļu makrofāgos (Cho et al., 2008).

## 1.7. Polifenolu grupas dabas vielas

### 1.7.1. Kafijskābes esteris

Kafijskābes esteris (sk. piel. Nr. 9.9.) ir viena no propolisa aktīvajām komponentēm, kurai piemīt kardioprotektīvas, neiroprotektīvas, hepatoprotektīvas un pretiekaisuma īpašības, kam pamatā ir tā antioksidatīvā daba (Tolba et al., 2013). 2013. gada apskata rakstā Tolba ar līdzautoriem apraksta kafijskābes estera ietekmi uz dažādiem iekaisuma procesā iesaistītiem enzīmiem, mediatoriem, signālmolekulām un transkripcijas faktoriem. Tas samazina COX-2 ekspresiju un aktivitāti, nomāc COX-1 aktivitāti, pastiprina IL-10 ekspresiju, samazina IL-8, IL-9, IL-1 $\beta$  ekspresiju, inhibē IL-2 ekspresiju, kā arī samazina histamīna izdalīšanos, samazina NF- $\kappa$ B aktivitāti, I $\kappa$ K, I $\kappa$ B un JNK1 fosforilāciju, nomāc iNOS ekspresiju un enzīma aktivitāti kā arī inhibē slāpekļa oksīda produkciju iekaisuma laikā (Tolba et al., 2013).

### 1.7.2. Ellagskābe

Ellagskābe (sk. piel. Nr. 9.9.) uzrāda pretvēža (Zhang et al., 2014), pretvīrusu, antioksidatīvās, pretiekaisuma īpašības, kā arī hepatoprotektīvu aktivitāti (Girish and Pradhan, 2008). Āzijas valstīs augus, kas satur šo vielu, izmanto kā antioksidatīvu, pretdiarejas, antimikrobiālu, imunomodulējošu var arī imūnmodulējošu līdzekli (Larrosa et al., 2010). Ellagskābe ir gallusskābes atvasinājums, ko iegūst, hidrolizējot ellagtanīnus, kas atrodas kokainos divdīgļlapjos: muskata vīnogu šķirnēs, ogās, riekstos, granatābolos u.c. (Zhang et al., 2014). Ellagskābe ir stiprs antioksidants, kas samazina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruktīvo efektu, neitralizē superoksīda un hidroksīda radikāļus (Girish and Pradhan, 2008). Ellagskābei ir spēja neitralizēt arī RNOS: NO<sub>2</sub> radikāli, peroksinitrītu (Zhang et al., 2014). Aktivē antioksidatīvos enzīmus: superoksīda dismutāzi, katalāzi, glutationperoksidāzi kāmju plaušu fibroblastos (Zhang et al., 2014). Ellagskābe stimulē eNOS ekspresiju (de Nigris et al., 2005; Larrosa et al., 2010). Tā arī samazina TNF- $\alpha$ , IL-6, COX-2, NF- $\kappa$ B un iNOS līmeni žurkās ar resnās zarnas audzēju (Gupta et al., 2014).

### 1.7.3. Resveratrols

Resveratrols (sk. piel. Nr. 9.9.) ir stilbēns, polifenolu savienojums (Buchanan B., 2002). Gupta un tā līdzautoru apskata rakstā tika apkopotas resveratrola aktivitātes, kas ir saistītas ar iekaisuma procesiem. *In vitro* samazina TNF- $\alpha$  inducēto apoptozes līmeni asinsvadu fibroblastos, kā arī samazina TNF- $\alpha$  ekspresiju leukocītos. *In vivo* resveratrols nomāc TNF- $\alpha$ , IL-6 izdalīšanos un iNOS ekspresiju žurku smadzenēs; samazina svara zudumus un proteīnu degradāciju skeleta muskulatūrā pelēs ar adenokarcinomu 16 un uzrāda nozīmīgu NF- $\kappa$ B DNS saistīšanās aktivitātes samazinājumu, kā arī nozīmīgi samazina STZ- inducētās neiro-pātiskās sāpes un TNF- $\alpha$  līmeni diabētiskās pelēs. Cilvēkos resveratrols samazina TNF- $\alpha$  un IL-6 līmeni; IL-1 $\beta$  un TNF- $\alpha$  ekspresiju 2. tipa cukura diabēta un hipertensijas pacientiem, samazina c-reaktīvā proteīna līmeni (Gupta et al., 2014). Tomēr resveratrols uzrāda arī prooksidatīvās īpašības, kas ir atbildīgas par antiproliferatīviem, citotoksiskiem un pat proapoptotiskiem efektiem. Resveratrols vara klātbūtnē izsauc DNS bojājumus (de la Lastra and Villegas, 2007).

### 1.8. Dabas vielu saistība ar DNS un to toksicitāte

Kanazawa K. un līdzautori 2006. gadā, izpētot vairākus flavonoīdus, konstatēja, ka kvercētīns un luteolīns tiek detektēti kodolā pie DNS molekulas, kā arī nomāc DNS oksidāciju. Kemferols arī tika atrasts šūnas kodolā, bet DNS oksidatīvo bojājumu samazinošo efektu tas neuzrādīja (Kanazawa et al., 2006). Kvercētīns, luteolīns un kemferols interkalē ar DNS, RNS molekulām, kas var izraisīt divējādu efektu, pirmkārt, DNS aizsargājošu aktivitāti (Kanakis et al., 2006), otrkārt, citotoksicitāti un DNS bojājumus pastiprinošu efektu (Rusak et al., 2010). Citotoksiskais efekts ir atkarīgs no devas un inkubācijas laika, augstāka flavonoīda deva inducē šūnā toksiskus efektus (Nemeikaite-Ceniene et al., 2005). Ir vielas, kas var mijiedarboties ar DNS molekulu, tādā veidā ietekmējot procesus šūnā, to struktūru un funkciju. Ja strukturālas izmaiņas nav novēršamas, tas noved pie apoptozes un šūnas nāves (Ragazzon et al., 2009). Mijiedarbība var būt dažāda, tai skaitā viela var interkalēt starp blakus esošām bāzēm, ievietoties lielajā vai mazajā DNS rievā, kā arī mijiedarboties elektrostatiski. Interkalācija starp bāzēm un saistīšanās DNS rievās ir

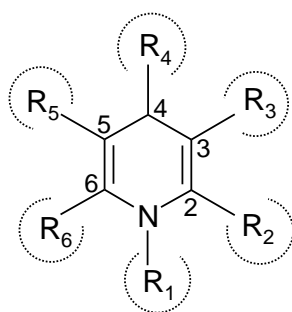
visvairāk izplatīts DNS un nelielu vielu (ligandu) mijiedarbības veids (Hegde et al., 2012a). Flavonīdi, pateicoties savai gandrīz plakanajai molekulas hromoforai daļai, uzrāda DNS interkalējošas īpašības (Ragazzon et al., 2009). Daudziem flavonoīdiem ir spēja mijiedarboties ar DNS un fluoriscēt noteiktā gaismā (Hegde et al., 2012a). Pētījumi ir parādījuši, ka luteolīns, kvercētīns un baikaleīns inkorporējas starp bāzu pāriem, kas izpaužas kā hidrofoba mijiedarbība un ūdeņraža saišu veidošanās. Šāda mijiedarbība traucē DNS replikācijas procesā (Janjua et al., 2009; Ragazzon et al., 2009; Zhang et al., 2012). Baikaleīns uzrāda tieksmi saistīties ar trīspavedienu un četrpavedienu DNS spirālem, kas raksturīgas telomērā, kā arī uzrāda specifisku saistīšanos ar ATT motīvu, apstādinot šūnas ciklu G<sub>1</sub>-fāzē. Kvercētīns arī labi interkalē ar tri- un četrpavedienu DNS struktūru, kā arī apstādina šūnas ciklu G<sub>2</sub>-fāzē (Ragazzon et al., 2009). Kemferols arī interkalē DNS molekulu, bet vājāk nekā kvercētīns (Kanakis et al., 2005), resveratols uzrāda vājāku spēju interkalēt DNS molekulu nekā kemferols (Zhang et al., 2011).

Toksisko efektu izraisa flavonoīdu spēja autooksidēties, procesu katalizē metālu joni, kā rezultātā veidojas O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Peroksidāzes katalizē flavonoīdu kā polifenolu savienojumu oksidāciju, kas arī stimulē prooksidatīva efekta attīstību (Zhang et al., 2012). Polifenolu viena elektrona oksidācija var izraisīt NADPH un citu šūnas reduktantu kooksidāciju ar sekojošu ROS veidošanos. Pēc zīdītāju šūnu apstrādes ar flavonoīdiem paaugstinās ROS līmenis, ko izraisa mitohondriju poru caurlaidības palielināšanās, notiek citohroma c atbrīvošanās, kaspāžu aktivācija, apoptoze, lipīdu peroksidācija un nekrotiska šūnu nāve (Nemeikaite-Ceniene et al., 2005).

### **1.9. 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumi**

1,4- dihidropiridīna (1,4-DHP) kodolu sintezēja pirms 130 gadiem (sk. 1.14. att.) (Hantzsch, 1881), pirms 60 gadiem tika atklāta šo savienojumu bioloģiskā aktivitāte (Philipps, October 3, 1944). Divdesmit gadus vēlāk Bosserts un Vaters Bayer AG izveidoja 1,4- dihidropiridīna atvasinājumu, kas izcēlās ar izcilām koronāro asinsvadu vazodilatējošām īpašībām (Bossert and Vater, 1989). Vēlāk tas Vācijā kļuva pazīstams kā Adalats (Bossert and Vater, 1971).





1.14. att. **1,4-dihidropiridīnu kodols** (adaptēts no Ioan et al., 2011).

2011. gadā Ioan ar līdzautoriem apkopoja 1,4-DHP zināmās īpašības apskatrakstā, kur tika iztīrāta 1,4-DHP kalciju kanālu modulējošā aktivitāte, kā arī apskatīti citi efekti (Ioan et al., 2011). Pamatojoties uz šo publikāciju, var secināt, ka mainot 1,4-DHP atvasinājuma struktūru, var panākt izteiktu selektivitāti un afinitāti nepieciešamajiem receptoriem. 1,4-DHP uzrāda daudz terapeitisku efektu, regulējot kalcija jonu ieplūšanu uzbudināmās šūnās. Nervu šūnās  $\text{Ca}^{2+}$  izsauc neirotransmiteru izdalīšanos. Sirds un skeleta muskulatūrā tie regulē uzbudināmību un transformē darbības potenciālu par kontrakciju.  $\text{Ca}^{2+}$  joni ir iesaistīti hormonu sekrēcijā, gēnu ekspresijā, šūnas tilpuma un nāves regulācijā. Tie ir svarīgi farmakoloģiski mērķi dažādu patoloģisku stāvokļu ārstēšanai, selektīvi modulējot  $\text{Ca}_v1-3$  kanālu aktivitāti (Ioan et al., 2011).

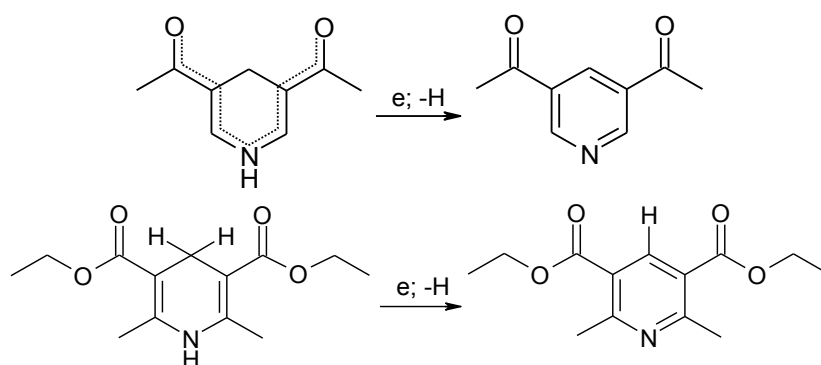
Ir izveidoti 1,4-DHP, kas uzrāda selektivitāti pret N- tipa kalcija kanāliem ( $\text{Ca}_v2,2$ ). Tie varētu atbrīvot no hroniskām sāpēm. Ir dati par 1,4-DHP, kas bloķē T-tipa kalcija kanālus ( $\text{Ca}_v3$ ), neironos, elektrokardiostimulatoru šūnās, paralēli L-tipa kalciju kanālu bloķēšanai, uzrādot labvēlīgu efektu sirds mazspējas gadījumā, kā arī uzlabo nieru darbību un aldosterona sekrēciju. Daži 1,4-DHP uzrāda neiroprotektīvu efektu (riluzols, lifarizīns), bloķējot  $\text{Na}^+$  kanālus (Ioan et al., 2011). Ir atrasti 1,4-DHP, kas aktīvā cistiskās fibrozes transmembrānās vadīšanas regulātorproteīnu, tādā veidā stimulējot cistiskās fibrozes gadījumā samazināto  $\text{Cl}^-$  jonu pasīvo transportu (Pedemonte et al., 2005). 1,4-DHP atvasinājumam, (*S*) un (*R*) nīguldipīnam, ir augsta afinitāte pret  $\alpha_1$ -adrenoreceptoriem, uzrādot antagonista īpašības. Tas stimulē meklēt jaunus 1,4-DHP derivātus prostatas hiperplāzijas ārstēšanai (Heinrich et al., 2003). Tiek meklētas 1,4-DHP struktūras, kas būtu selektīvi adrenoreceptoru antagonisti – noderīgi astmas, akūtas nieru mazspējas, akūtā respiratorā distresa sindroma un glaukomas ārstēšanā (Ioan et al., 2011). 1990 gados tika sintezēti 1,4-DHP

savienojumi, kas uzrādīja tikpat spēcīgu H<sub>2</sub>-histamīna receptu antagonista aktivitāti kā cimetidīns. Neuropeptīds Y tiek sintezēts hipotalāma neironos, un tam varētu būt viena galvenajām lomām pārtikas uzņemšanas kontrolē. 1,4-DHP atvasinājums BMY-20429 uzrādīja Y<sub>1</sub> receptora antagonista īpašības. Daži 1,4-DHP kalcija kanālu antagonisti uzrāda serotonīna (5-HT) metabolismu modulējošās īpašības smadzenēs (Ioan et al., 2011). Paralēli augstākminētajām īpašībām 1,4-DHP atvasinājumu pārstāvji uzrāda antioksidatīvas (Fernandes et al., 2003; Letelier et al., 2007), antimutagēnas (Goncharova and Kuzhir, 1989; Kuzhir and Goncharova, 1997), DNS molekulu reparējošas (Ryabokon et al., 2005; Ryabokon et al., 2008), prettuberkulozes (Desai et al., 2001), antiapoptotiskas (Yagami et al., 2004), augšanu stimulējošas īpašības, kā arī pretiekaisuma, pretišēmijas, antidiabētisku un radioprotektīvu efektu (Duburs G, 2008) u.c.

Daļa 1,4-DHP tiek metabolizēti aknās un zarnās caur citohroma P450 sistēmu. Citohroms 3A4 katalizē lielākās daļas kalcija kanālu blokatoru dehidrogenēšanu (Guengerich et al., 1991). Citi autori ir publicējuši datus, ka 1,4-DHP ir citohromu 3A4 (Michalets, 1998) un 2C9, 2D6, 1A1, 1A2 substrāts (Kudo et al., 1999). Dažiem 1,4-DHP ir novērota spēja inhibēt citohroma P450 sistēmas enzīmus, kā rezultātā kopā ar 1,4-DHP ievadītas zāles asins plazmā var sasniegt toksisku līmeni. Piemēram, pierādīts, ka nifedipīns un nikardipīns inhibē citohromu CYP2C9 cilvēka aknu mikrosomās (Di Marco et al., 2005). Amlodipīns ir stiprs 2B6 inhibitors (Walsky et al., 2005), felodipīns ir spēcīgs 2C8 inhibitors (Walsky et al., 2006).

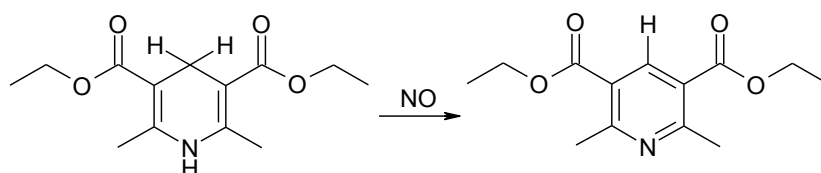
Šajā darba tiek izvērtētas Latvijas Organiskās sintēzes institūtā sintezēto 1,4-DHP atvasinājumu antioksidatīvās un DNS reparāciju stimulējošās īpašības.

1,4-DHP atvasinājumu oksidācija ir sarežģīts process, kura mehānisms ķīmiķu vidū joprojām tiek diskutēts. 1,4-DHP gredzenā ir spēcīga dubultsaišu konjugācija ar esteru alkilgrupām, kas atrodas 3. un 5. pozīcijā. Oksidējoties 1,4-DHP atdod elektronu un/vai H<sup>+</sup> (hidrīdjonu), pārkārtojot visu 1,4-DHP sistēmu, un izveido piridīna atvasinājumu (sk. 1.15. att.). Biežāk H<sup>+</sup> tiek atdots no 4. pozīcijas, tādējādi var uzskatīt, ka 1,4-DHP ir C-H antioksidants. Tomēr 1. pozīcija arī piedalās reducēšanās reakcijā, tādējādi 1,4-DHP piemīt arī amino-antioksidanta īpašības (Augustyniak et al., 2010).



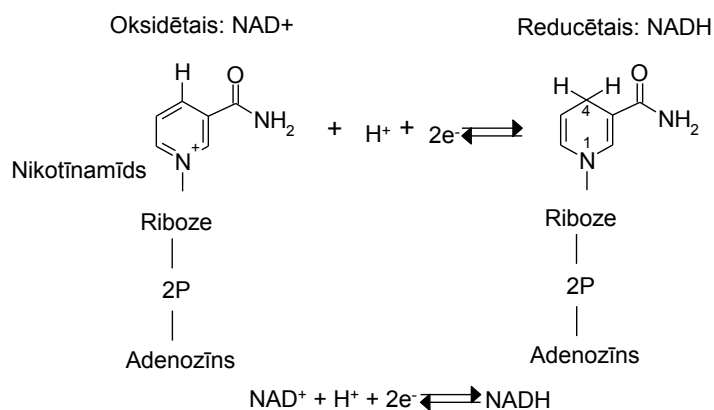
1.15. att. **1,4-dihydropiridīna atvasinājumu oksidēšanās reakcija** (adaptēts no Augustyniak et al. 2010).

1,4-DHP tiek oksidēts arī reakcijās ar slāpekļa oksīdu (sk. 1.16. att.), kur zaudē divus ūdeņraža atomus no 1. un 4. pozīcijas, reakcijas beigās izveidojot aromātisku gredzenu (Zhu et al., 2000).



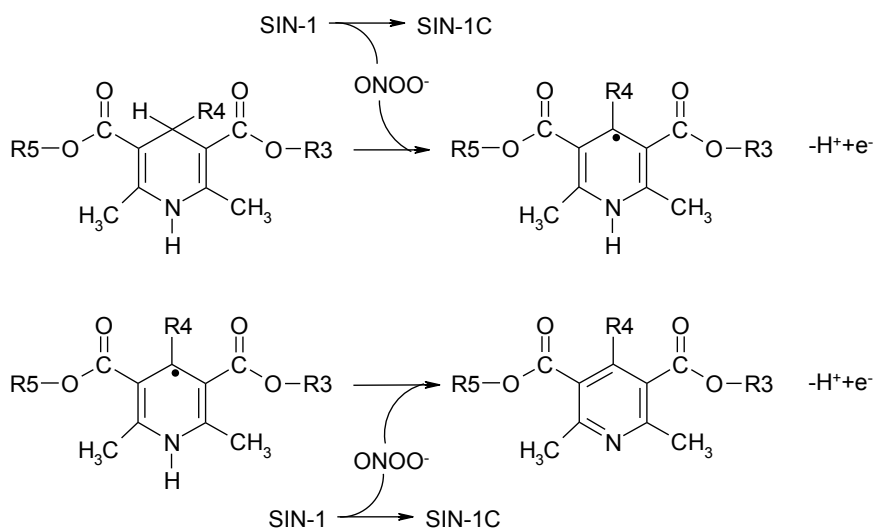
1.16. att. **1,4-DHP reakcija ar slāpekļa oksīda molekulu** (adaptēts no Zhu et al. 2000).

1,4-DHP oksidējas pēc līdzīga principa kā nikotīnamīdadenīdinukleotīds (NADH), kurš veic ūdeņraža atoma un elektrona (hidrīdiona) pārnesi bioloģiskajās sistēmās (Matern et al., 2007) (sk. 1.17. att.). NADH molekulā aktīvā grupa ir nikotīnamīds, kas oksidējoties/reducējoties H atomu un elektronu attiecīgi atdod/pievieno pie nikotīnamīda 4. C atoma. Līdzīgi kā 1,4-DHP arī nikotīnamīda reducētā forma satur 1,4-DHP gredzenu, bet oksidētā – piridīna gredzenu (Berg et al., 2012). Līdzīgu ainu var novērot arī flavīnu koenzīmiem FAD un FMN. (Berg et al., 2012).



1.17. att. A. NADH oksidēšanās - reducēšanās reakcija (adaptēts no Berg et al., 2012).

Ir pētījumi, kur parādīts, ka peroksinitrīts gan tiešā veidā, gan tā metabolīti var reaģēt ar reducēto NADH formu (Kirsch and de Groot, 1999), tamdēļ pēc līdzības tika veikts eksperiments ar 1,4-DHP, kur atklājās, ka 1,4-DHP arī spēj atdot šajā reakcijās elektronu, tādā veidā inaktivējot peroksinitrīta molekulu. Lopez-Alarcon ar līdzautoriem proponēja sekojošu reakciju (sk. 1.18. att.) (Lopez-Alarcon et al., 2004).



1.18. att. 1,4-DHP reakcija ar peroksinitrīta molekulu (adaptēts no Lopez-Alarcon et al., 2004).

1,4-DHP, kuriem nav aizvietots 4. oglekļa atoms, uzrāda ūdeņraža donoru īpašības, aizvietotājs šajā pozīcijā būtiski šīs īpašības samazina (Velena et al., 1999). Izņēmums ir tikai karboksilanjons, kas ir stiprāks elektronu donors kā metilgrupa,

tādā veidā pastiprinot reducējošās īpašības. Šāds savienojums reaģē ar slāpekļa, skābekļa radikāliem un peroksinitrītu (Tirzite et al., 1999; Borovic et al., 2006). Tomēr neskatoties uz visu augstākminēto, daudziem Ca<sup>2+</sup> kanālu antagonistiem piemīt arī antioksidatīvās īpašības. Piemēram, felodipīns, kuram 4. pozīcija ir arilgrupa, uzrāda spēcīgas antiradikālas īpašības *in vitro* (Oriz et al., 2003). Interesanti arī atzīmēt, ka felodipīns uzrāda asinsvadus pasargājošas īpašības, nomācot brīvo radikāļu veidošanos cilvēka gludās muskulatūras šūnās iekaisuma modelī un diabēta apstākļos (Hishikawa and Luscher, 1998). 1,4-DHP molekulā 3. un 5. pozīcijās parasti ir esteru grupas. Tās mijiedarbojas ar gredzena dubultsaitēm un, paplašinot konjugāciju, stabilizē savienojumu, savukārt elektrondonorgrupas – destabilizē (Kuthan and Kurfurst, 1982). Karboksilanjons 3. un 5. pozīcijās arī pastiprina savienojuma reducējošo aktivitāti (Tirzite et al., 1999). 2. un 6. pozīcijas parasti ir aizvietotas ar metilgrupu un ir dati, ka aizvietotājgrupa šajā vietā samazina spēju deaktivēt singletskābekli (Tirzite et al., 1981; Rojstaczer and Triggle, 1996). 1,4-DHP lipofilitāti nodrošina heterocikliskais kodols. Lipofili aizvietotāji palielina vielas lipofilitāti, bet hidrofilī – samazina (Tirzite et al., 1998).

Pirmo reizi antioksidatīvo, antiradikālu aktivitāti demonstrēja diludīns. Tas stabilizēja β-karotīna molekulu šķīdumos (Giller SA, 1970) un augu eļļās, kā arī augu eļļu saturošos produktos, pasargājot dubultsaites no oksidēšanās (Abdalla AE, 1999). Mūsdienās to lieto kā stabilizatoru augu eļļās, kas pasargā no dubultsaišu oksidēšanās (Tirzitis G, 2001). Tirzītis G. un Duburs G. 1972. gadā dokumentēja 1,4-DHP spēju neitralizēt brīvos radikāļus (Tirzite and Dubur, 1972). Ir atklāts, ka diludīna antioksidatīvā aktivitāte izpaužas ar tā lipofīlo dabu un spēju inkorporēties liposomās (Tirzitis G, 2001). 1,4-DHP atvasinājumiem piemīt singletskābekļa deaktivatora īpašības un tas pasargā molekulas no oksidatīvajiem līdzīgi kā α-tokoferols un β-karotīns (Tirzite et al., 1981). Daļai 1,4-DHP atvasinājumu piemīt Fe<sup>3+</sup> reducētāju aktivitāte, izveidojot Fe<sup>2+</sup>, kas piedalās Fentona reakcijā (Tirzite et al., 1999). Interesanti, ka izvērtējot tauropirona antioksidatīvās īpašības, ROS veidošanās tā klātbūtnē pat paaugstinājās, neskatoties uz to, ka šis 1,4-DHP atvasinājums satur taurīnu – ROS saistītāju (Klimaviciusa et al., 2007). 1,4-DHP ir spēja pasargāt hepatocītus no vara jonu izsauktās lipīdu peroksidācijas (Borovic et al., 2006). Mitochondriji ir potenciāls mērķis membrānaktīvo aģentu farmakoloģiskajai un toksiskajai ietekmei. OSI-1146 uzrādīja antioksidatīvu un antiradikālu aktivitāti *in*

*vitro*, pasargājot mitohondrijus no lipīdu peroksidācijas, ko inducēja ADP/Fe<sup>2+</sup> (Fernandes et al., 2009).

1,4-DHP atvasinājumiem ir pretiekaisuma īpašības. Cerebrokrasts spēj samazināt iekaisumu žurku ķepas tūskas modelī un inhibēt neirotoksisku interleikīnu IL-1β un IL-6 cilvēka monocītu šūnu līnijā (Klegeris et al., 2002). 1,4-DHP piemīt arī slāpekļa oksīda sintāžu modulējošas īpašības dažādos patoloģiskos stāvokļos. Atorvastatīns un amlodipīns atjauno eNOS aktivitāti, tādā veidā samazinot superoksīdradikāļa produkciju un normalizējot NO<sup>•</sup> produkciju insulīnrezistentu žurku aortas endotēlijā (Okamura et al., 2014), kā arī amlodipīns samazina NO<sup>•</sup> un ONOO<sup>-</sup> koncentrāciju hipertensīvo žurku aortas endotēlijā (Mason et al., 2014). Nifedipīns 1 nM koncentrācijā samazina ROS līmeni cilvēka umbilikālajās šūnās (HUVEC) paaugstinātas glikozes vidē, kā arī paaugstina eNOS fosforilācijas (aktivācijas) līmeni (Hayashi et al., 2014). Cits kalcija kanālu antagonists benidipīns (0,3-10 μM) arī uzrāda HUVEC šūnās eNOS ekspresiju un aktivitāti paaugstinošu efektu rezultātā stimulējot NO<sup>•</sup> izdalīšanos no endoteliālajām šūnām (Matsubara et al., 2006). Amlodipīns samazina arī iNOS ekspresiju, NF-κB un MAPK fosforilāciju, tādā veidā samazinot iekaisuma un oksidatīvo stresus cilvēka endoteliālajās šūnās glikozilēto lipoproteīdu klātbūtnē (Toma et al., 2011). Savukārt nifedipīns uzrāda iNOS gēna ekspresijas līmeņa paaugstinošas īpašības žurku aortas gludās muskulatūras šūnās pēc stimulācijas ar IL-1β/TNF-α (Cattaruzza et al., 2000).

Ir publicēti dati par 1,4-DHP atvasinājuma AV-153-Na spēju stimulēt ar ūdeņraža peroksīdu izsauktu DNS ķēdes pārrāvumu reparāciju (Ryabokon et al., 2008). Ar AV-153-Na apstrādātās limfomas šūnas uzrādīja īslaicīgu poli(ADP-ribozes) koncentrācijas paaugstināšanos, kā arī ātrāku un efektīvāku DNS pārrāvumu reparāciju. AV-153-Na piemīt antimutagēnas īpašības (Ryabokon et al., 2008), samazina DNS bojājumu un mutāciju biežumu (Ryabokon et al., 2009; Wojewodzka et al., 2009). Nesen tika publicēti dati par iespējamo AV-153-Na saistīšanos ar DNS bojājuma vietu, tādējādi aktivējot DNS reparācijas procesus un veicinot aizsardzību pret genotoksiskiem aģentiem (Buraka et al., 2014). Cits LOSI sintezētais 1,4-DHP, glutapirons uzrāda antiklastogēnisku aktivitāti pieaugušās pelēm (Goncharova et al., 2001) un antimutagēnu aktivitāti žurkās ilgstošas γ-radiācijas klātbūtnē (Vartanyan, 2004). Apkopojot visu augstāk minēto, 1,4-dihidropiridīni ir daudzpusīgas molekulas,

kuru farmakoloģiskās īpašības varētu būt noderīgas daudzu patoloģisku stāvokļu korekcijā.

## **2. MATERIĀLI UN METODES**

### **2.1. Klīniskais pētījums, analizējamās grupas raksturojums**

Analizējamās grupas dalībnieki bija pacienti ar jau diagnosticētu 1. tipa cukura diabētu (ne vairāk kā 35 gadi anamnēzē), kas saņēma insulīna terapiju un kuriem tukšā dūšā C-peptīda līmenis bija zem 0,3 nmol/l. Kontroles grupas atlases kritēriji bija: indivīdi bez glikozes tolerances traucējumiem vai cukura diabēta, nieru hroniskās slimības, pašiem un pirmās pakāpes radniekiem, kā arī bez akūta miokarda infarkta, insulta, perifēro asinsvadu slimības ar perifērām revaskularizācijas procedūrām un koronāro asinsvadu revaskularizācijas procedūrām dzīves anamnēzē. Abām grupām uz paraugu ņemšanas brīdi izslēgšanas kritērijs bija klīniskas akūta iekaisuma pazīmes, hroniska nieru slimība, izņemot diabētiskā nefropātija 1TCD pacientu grupai, onkoloģiskas un reimatoloģiskas saslimšanas.

Pētījums tika veikts Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā „LatDiane: diabētiskās nefropātijas pētījums” projekta ietvaros. Paraugu analīze notika Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Medicīniskās bioķīmijas katedrā. Visi dalībnieki parakstīja informatīvu piekrišanu. Pētījums tika saskaņots ar Centrālās medicīnas ētikas komiteju. Atzinums Nr. 01-29.1/3 par projektu „LatDiane: Latvijas diabētiskās nefropātijas pētījums”, 10.07.2013 (pielikums Nr. 9.7.).

Kontroles grupa tika izvēlēta pēc dzimuma un vecuma atbilstoša analizējamajai grupai. Diabēta stāžs, vecums, dzimums un komplikāciju klātbūtne dotajā eksperimentā netika ņemti vērā.

### **2.2. Eksperimentālie dzīvnieki**

Darbā tika izmantoti pieaugušie balto žurku tēviņi (līnija Wistar, svars 200-250 g), kas tika piegādāti no Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas, Rīga, Latvija. Visi darbi ar dzīvniekiem tika veikti saskaņā ar Eiropas Savienības direktīvas 2010/63/EU vadlīnijām un MK 2001. gada 23. oktobra noteikumiem Nr. 450 „Eksperimentos un zinātniskos nolūkos izmantojamo dzīvnieku turēšanas, izmantošanas, tirdzniecības un nogalināšanas kārtība”, Pārtikas un



veterinārā dienesta Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomē (Rīga, Latvija) (pielikums Nr. 9.5).

Eksperimenti tika veikti Organiskās sintēzes institūta Bioķīmijas grupas telpās, 2007.-2010. gadam Lielvārdes iela 68, korpuss 4, 2010.-2013. gadam – Kronvalda bulvārī 4 (LU Bioloģijas fakultāte). Adaptācijas periods pēc dzīvnieku piegādes bija septiņas dienas. Eksperimenta laikā dzīvnieki tika turēti konkrētai laboratorijas dzīvnieku sugai paredzētos sprostos (gaisa temperatūra  $22\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , diennakts cikls – 12 stundas). Pirms eksperimenta un eksperimentu laikā dzīvnieki tika baroti ar sugai paredzēto laboratorijas pārtiku (Tukuma straume, Latvija) *ad libitum*, kā arī dzīvnieki tika nodrošināti ar dzeramo ūdeni bez ierobežojuma.

Dzīvniekiem tika ierosināti divu veidu oksidatīvo stresu izsaucošie modeļi: sepse (Garrido et al., 2004; Fink, 2014) un 1. tipa cukura diabēts (Rakieten et al., 1963).

### **2.2.1. Akūta iekaisuma modeļa ierosināšana, eksperimenta dizains un vielu ievadīšana**

Iekaisuma reakcija tika izsaukta injicējot LPS i/p 10mg/kg. *E. Coli* (serotips 055:B5) 0,9% nātrija hlorīda šķīdumā. Pēc 4 stundām dzīvnieki tika dekapitēti ar četrnažu giljotīnu vieglā ētera narkozē.

Lai izpētītu iespējamās nitrozatīvā stresa korekcijas iespējās sepSES modelī, dzīvniekiem vienlaicīgi ar LPS injekciju *per os* ievadīja dabas vielas (50 mg/kg), izmantojot mākslīgās barošanas adatu. Devas daudzums tika rēķināts individuāli katram dzīvniekam, ņemot vērā tā svaru. Eksperimentos izmantotās dabas vielas tika atšķaidītas 0,6% Tween 80, tad 0,9% nātrija hlorīdā ar dažiem pilieniem etanola. Pētāmās dabas vielas bija resveratrols, kafijskābes esteris, ellagskābe, baikaleīns, kvercetin, kempferols, miricetin, luteolīns, likopēns, indol-3-karbinols, indol-3-karbinols kombinācijā ar kvercetiņu dažādās koncentrācijās un luteolīna (30 mg/kg) kombinācija ar baikaleīnu (30 mg/kg). Tīrās kontroles un LPS kontroles grupām *per os* ievadīja 0,9% nātrija hlorīda šķīdumu ar 0,6% Tween 80 un etanola kombināciju.

Slāpekļa oksīda līmeņa noteikšanai audos 30 minūtes pirms dekapitācijas, dzīvniekiem i/p ievadīja slāpekļa oksīda saistītāju– dietiltiokarbamāta nātrija sāli (DETC) (400 mg/kg, injekcijas 1-1,5 ml) un svaigi pagatavotā nātrija citrāta (200

mg/kg) un dzelzs sulfāta šķīdumu (40 mg/kg) subkutāni, kopējais injekcijas tilpums 1-1,5 ml. DETC un dzelzs jons saista slāpekļa oksīdu, veidojot stabilus paramagnētiskus kompleksus:  $\text{Fe}(\text{DETC})_2\text{-NO}$ , ko var reģistrēt ar EPR spektroskopiju. Četras stundas pēc LPS un analizējamo vielu ievades dzīvnieki tika dekapitēti. Audi gēnu ekspresijas analīzei nekavējoties tika sasaldēti šķidrā slāpekļī. Audi un orgāni imūnhistoķīmiskajam pētījumam ievietoti 10% neitrāli buferētā formalīna šķīdumā.

### **2.2.2. 1. tipa cukura diabēta modeļa ierosināšana, eksperimenta dizains un vielu ievadīšana**

I tipa cukura diabēts tika izsaukts, vienreizēji ievadot streptozotocīnu (50 mg/kg) astes vēnā svaigi atšķaidītu 10 mM citrāta buferī (pH 4,5), injekcijas apjoms 0,2-0,25 ml (Rakieten N, et al., 1963). Pirms streptozotocīna injekcijas dzīvnieki 12 stundas nesaņēma barību, bet tika nodrošināta brīva piekļuve ūdenim. Kontroles dzīvnieki saņēma 0,2 ml 10 mM citrāta bufera astes vēnā. Cukura diabēts tika konstatēts, 48 stundas pēc injekcijas izmērot glikozes līmeni perifērajās asinīs, kas tika ņemtas no astes vēnas. Žurkas ar glikozes līmeni  $>13,89$  mmol/l iekļāva pētījumā. Cukura diabēts netika koriģēts ar insulīna injekcijām. Pēc modeļa izraisīšana dzīvnieki līdz sātam saņēma barību un dzeramo ūdeni. Eksperimenta beigās dzīvniekus dekapitēja ar četrnažu giljotīnu. Pēc dzīvnieku dekapitācija tika ņemti orgānu un asins paraugi.

Kad hiperglikēmiskais stāvoklis dzīvniekiem bija noteikts, pirms analizējamo vielu ievades dzīvniekus sadalīja pa grupām, žurku vidējais svars un glikozes līmeņa rādītāji starp grupām statistiski ticami neatšķiras.

Lai izvērtētu oksidatīvā un nitrozatīvā stresa izraisīto DNS pārrāvumu iespējamās prevencijas un/vai korekcijas iespējas, ķīmiski izraisītā 1TCD korekcijai tika ievadīti dažādi 1,4-dihidropiridīni (metkarbatons, etkarbatons, glutapirons, J-9-125 AV-153-Na), dabas viela – miricetīns, kā arī AV-153-Na un miricetīna kombinācija. 1,4-DHP tika atšķaidīti 0,9% NaCl, bet miricetīns – 0,6% Tween 80 un tad – ar dažiem pilieniem 0,9% NaCl. Devītajā dienā pēc streptozotocīna injekcijas pētāmās vielas tika ievadītas *per os* 0,5 mg/kg vai 0,05 mg/kg devās trīs dienas pēc kārtas. AV-153-Na tika ievadīts tikai koncentrācijā 0,5 mg/kg, miricetīns devā 50 mg/kg, kombinācijā vielas saglabāja savas koncentrācijas. Tīrās kontroles un

streptozotocīna kontroles dzīvnieki saņēma ūdeni *per os* ar mākslīgās barošanas adatu.

Audi gēnu ekspresijas analīzei nekavējoties tika sasaldēti šķidrā slāpekļī. Audi un orgāni imūnhistoķīmiskajam pētījumam ievietoti 10% neitrāli buferētā formalīna šķīdumā.

### 2.3. Materiāli

Analizējamās vielas – 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumus nodrošināja Latvijas Organiskās sintēzes institūts. Dabas vielas: miricetīnu, likopēnu, indol-3-karbinolu, kemferolu, kvercetīnu, luteolīnu, baikaleīnu, resveratrolu, ellagskābi, kafijskābes esteri piegādāja *Dayang Chemical Co., LTD, Hangzhou, Ķīna*.

Reaģenti: lipopolisaharīds, zemas kušanas agaroze, III tipa agaroze, agaroze, hloroforms, izopropanols, ūdeņraža pārskābe, nātrijs hlorīds, nātrijs dodecilsulfāts, etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrijs sāls, ēteris, kālija acetāts, Tris-HCl, Triton X-100, dimetilsulfoksīds, etīdija bromīds, 10% neitrāli buferēts formalīna šķīdums, Tween 80, fosfāta buferis (PBS), nātrijs dodecilsulfāts, 5,5-dimetil-1, pirrolīna N-oksīds, dietilditiokarbamāta nātrijs sāls, dzelzs sulfāts, nātrijs citrāts, citronskābe, TRI reaģents ir piegādāti no *Sigma-Aldrich*, Vācija. Fizioloģiskais šķīdums (0,9% nātrijs hlorīds) tika iepirkti no SIA Tamro, Latvija. Nātrijs hidroksīds, 96% etanols tika iepirkti no SIA ENOLA, Latvija. Šķidrās slāpekļi audu sasaldēšanai tika piegādāts no SIA AGA, Latvija. *6x Loading Dye solution* DNS paraugu iekrāsošanai, DEPC-apstrādātais ūdens, reversās transkripcijas komplekts (*RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit*), RNāze I (10 U/μl), plazmīda pTZ57R tika piegādāt no *Thermo scientific*, ASV. DNA-free reaģentu komplektu RNS paraugu attīrīšanai iegādājās no Ambion, ASV. Kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas reaģentu maisījums (*SYBR® Green PCR Master Mix*) tika iepirkts no *Applied Biosystems*, ASV. Praimeri tika pasūtīti no *Metabion international AG*, Vācija. Reaktīvu komplektu nitrātu/nitrītu noteikšanai ķermeņa šķīdumos (*Cayman's Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit*) piegādāja no *Cayman Chemical Company, Ann Arbor*, ASV. Visus reaktīvus un materiālus imūnhistoķīmijas darbiem iegādājās SIA Diamedika, Latvija, antivielas proteīnu noteikšanai – *Abcam* (Lielbritānija). Plastikāta kapilāri ar heparīnu (*Microvette CB 300*) venozo asiņu ņemšanai no astes vēnas, 15 ml un 30 ml sterilas

plastmasas mēģenes, 1,5 ml plastmasas mēģenes, automātisko pipešu uzgaļi (1-1000 µl) tika iepirkti no Sarstedt, Vācija. Priekšmetstikliņi un segstikliņi slaidu pagatavošanai tika piegādāti no Biosigma, Itālija. Citoloģijas trauks, keramiskās piestas – no SIA Arbor, Latvija. Vakuuma stobriņus ar heparīnu, insulīna šļirces, vakuuma stobriņus bez antikoagulantiem, sterilos urīna savākšanas traukus piegādāja BD, ASV. Amicon Ultra membrānu filtrus asins seruma attīrīšanai no proteīniem iegādājās *Millipore Ireland Ltd*, Īrija.

Darba veikšanai izmantojām sekojošas iekārtas: transiluminātors *BioSpectrumAC Imaging System* (UVP, Kanāda), centrifūga *Sigma 3-16K* (*Sigma Laborzentrifugen GmbH*, *Ostrode am Harz*, Vācija), fluorescentais mikroskops *Leica DM4000 B* (*Leica Microsystems*, Vācija), spektrofotometrs (*Perkin-Elmer, LABMDA 25 UV/VIS spectrometer*, ASV), plašu lasītājs (*Infinite M200PRO, TECAN*, Šveice). Kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas veicām ar *StepOne™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, ASV). Brīvo radikāļu līmeņi tika noteikti ar EPR spektrometru *Radiopan SE/X2544* (Polija) un kvarca djuāru *Bruker ER 167 FDS-Q* (Vācija). Dzīvnieki tika dekapitēti ar četрнаžu giljotīnu (Japāna). Glikozi noteicām ar glikometru *MediSense OptiumXceed* (*Abbott Diagnostics Ltd, Maidenhead*, Apvienotā Karaliste) un attiecīgās testa strēmeles. Vienas šūnas elektroforēzi un DNS integritātes pētījumus veicām, izmantojot sauso termobloku (*Bio TDB – 100*, SIA BIOSAN, Latvija), līdzstrāvas devējs (*PowerPac Basic, Bio-Rad*), elektroforēzes aparāts vienas šūnas elektroforēzei (*COMET-20, SCIE-PLAS*), horizontālās elektroforēzes kamera (*MSCHOISE, Cleaver Scientific Ltd.*). Digitālo mikroskopu *Motic* un programmu *Motic Image* (*Motic Deutschland GmbH, Wetzlar*, Vācija) izmantoja imūnhistoķīmijas preparātu analīzei.

## 2.4. Metodes

### 2.4.1. Vienas šūnas elektroforēze sārmainos apstākļos

DNS vienpavediena pārrāvumus šūnas kodolu saturošās šūnās perifērās venozās asinīs noteica, izmantojot vienas šūnas elektroforēzes metodi (Tice et al., 2000). Asinis dzīvniekiem ņēma no astes vēnas plastikāta kapilārā ar heparīnu. 10 µl svaigu heparinizētu asiņu sajauca ar 120 µl siltas (37°C) 1% zemas kušanas agarozes.

100 µl maisījuma tika uznesti uz priekšmetstikliņiem, kas iepriekš bija noklāti ar 0,5% III tipa agarozī. Tad paraugus pārklāja ar segstikliņiem (24 x 40 mm). Priekšmetstiklus novietoja uz ledus līdz agaroze polimerizējas. Pēc polimerizācijas tika noņemti segstikliņi un slaidi iegremdēti ledus aukstā lizēšanas buferī, kas saturēja 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris-HCl pH 7,5 1% Triton X-100, 5% DMSO uz 1 stundu pie 4°C. Pēc lizēšanas slaidus žāvēja vertikālā stāvoklī 1min istabas temperatūrā. Tad tos izkārtēja horizontālās elektroforēzes kamerā, veidojot divas pilnas rindas bez atstarpēm, un tie tika pārklāti ar svaigu ledus aukstu buferi (0,3 M NaOH, 0,001 M EDTA, pH ≤ 13). DNS attīšanu veica 20 min uz ledus pilnīgā tumsā, 4°C. Elektroforēze tika veikta tajā pašā buferī uz ledus, tumsā, 20 min, 300 mA. Pēc elektroforēzes slaidus žāvēja vertikālā stāvoklī 1 min. Paraugi tika neutralizēti, divas reizes vertikāli iegremdējot uz 5 min ledusaukstā Tris-HCl buferī (0,4 M, pH 7,5, 4°C). Pēc kā tos žāvēja 1 min vertikāli un fiksācijai iegremdēja ledusaukstā etanolā 96% uz 10 min pie -20°C. Tad žāvēja horizontāli. Lai izvērtētu DNS bojājuma pakāpi, slaidi tika nokrāsoti ar 1-2 pilieniem etīdija bromīda (1 µM) un pārklāti ar segstikliņu tieši pirms analīzes. Analīzi veica pie 400x palielinājuma ar fluoriscentā mikroskopa *Leica DM4000 B* palīdzību, kas ir aprīkots ar 515-560 nm filtru un 590 nm robežfiltru. Šūnas tika dalītas piecās grupās (A0-A4): no 0 grupas (veselas šūnas, bez redzamas astes) līdz 4 grupai (gandrīz viss DNS ir astē, nenozīmīgu galvu) (Collins, 2004; Azqueta and Collins, 2013). Galveno DNS bojājumu vērtību (D) kalkulēja:  $D = A1 + 2 \times A2 + 3 \times A3 + 4 \times A4$ , mērvienība AU (*arbitrary units*) – nosacītās vienības. Tādējādi DNS bojājumu līmenis varēja būt no 0-400.

#### 2.4.2. RNS izolēšana, attīršana, cDNS sintēze

Audi gēnu ekspresijas analīzei pēc dzīvnieku dekapitācijas nekavējoties tika sasaldēti šķidrā slāpekļā. Sasaldētie audi tika saberzti keramikas piestā šķidrā slāpekļa klātbūtnē, nosvērti 0,5g un ienesti mēģenē ar TRI reaģentu, kura tilpums tika aprēķināts: 1ml uz 0,1g audu. Homogenātu intensīvi samaisīja, inkubēja 5 min un centrifugēja pie 4500 apgriezieni/ minūtē 30 min 4°C. Supernatantu pārvietoja tīrā mēģenē. Paraugu nostādināja 5 min istabas temperatūrā, pievienoja 0,2 ml hloroforma uz 1 ml TRI reaģenta. Cieši tika aizvākoja, 15 s intensīvi kratīja un atstāja uz 15 min istabas temperatūrā, kam sekoja centrifugēšana 4500 apgriezieni/ minūtē 30 min 4°C.

Šķīdumam bija izveidojušies trīs slāņi: sarkanais jeb organiskais (proteīni), vidusslānis (DNS) un augšējais – ūdeņainais, bezkrāsainais (RNS). Pēc augšējā slāņa pārvietošanas tīrā mēģenē tika pievienota ar 1/10 izopropanola tilpuma, tika turēts 5 min istabas temperatūrā un centrifugēts 4500 apgriezieni/ minūtē 30 min 4°C. Supernatantu pārnesa tīrā mēģenē un nogulsēja RNS, pievienojot atlikušo izopropanola tilpumu (kopējais izopropanola tilpums: 0,5 ml izopropanola attiecīgi uz 1 ml TRI reaģenta, kas ir izmantots parauga pagatavošanā). Maisījumu inkubēja istabas temperatūrā 10 min, centrifugēja 4500 apgriezieni/ minūtē 30 min 4°C. Supernatantu nolēja, un RNS nogulsnes atmazgāja, pievienojot 1 ml (minimums) 75% etanola attiecīgi uz 1 ml TRI reaģenta, kas ir izmantots parauga pagatavošanā. Mēģenes sakratīja un centrifugēja 4500 apgriezieni/ minūtē 15 min 4°C. RNS nogulsnes žāvēja gaisa plūsmā un tad izšķīdināja 100 µl DEPC-apstrādātā ūdenī. RNS integritāte tika novērtēta ar agarozes gēla elektroforēzi. DNS kontaminācija tika novērsta ar DNA-free reaģentu komplektu, sekojot ražotāja norādījumiem. RNS koncentrāciju un tīrības pakāpi mērīja ar spektrofotometru. Paraugi ar absorbcijas attiecību spektros A260/A280 1,9-2,1, tika atlasīti turpmākajiem pētījumiem. 2 µg RNS tika ņemti reversai transkripcijai, izmantojot randomizētu heksamēru praimeru, lai iegūtu cDNS, izmantojot ražotāja protokolu.

### 2.4.3. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija

iNOS, eNOS gēnu ekspresija tika noteikta ar *Applied Biosystems SYBR® Green PCR Master Mix*, pamatojoties uz ražotāja protokolu, kas tika veikts uz *StepOne™ Real-Time PCR System*. Reakcija tika atkārtota 41 ciklu: viens cikls 95°C 10,00 min un 40 cikli 95°C 0,15 min, 60°C 1,00 min. Lai noteiktu produktu specifitāti, tika izmantota disociācijas līkne (viens cikls pie 95°C 0,15 min, 60°C pie 1,00 min un 95°C 0,15 min). Praimeru tika veidoti, izmantojot Primer3 un NCBI/BLAST programmas. Lai izvēlētos stabilākos references gēnus, tika izmantota *GeNorm* programma (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Rezultātu analīzei tika izmantota relatīvās kvantificēšanas metode ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Dati ir uzrādīti relatīvās vienībās (RV). Praimeru sekvences iNOS gēnam ir sekojošas: tiešais praimeris 5'-GCTACACTTCCAACGCAACA-3', atgriezeniskais praimeris 5'-CATGGTGAACACGTTCTTGG-3', sagaidāmais produkta izmērs 116 bp, eNOS

gēnam: tiešais praimeris bija 5'-GAACCTGAGGGTGCCCAG-3', atgriezeniskais praimeris, 5'-TCCGATTCAACAGTGTCTCCT-3', sagaidāmais produkta izmērs 110 bp. Kā references gēni tika izmantoti: ciklofilīns A, kura tiešais praimeris 5'-AGCACTGGGGAGAAAGGATT-3', atgriezeniskais praimeris 5'-AGATGCCAGGACCTGTATGC-3', sagaidāmais produkta garums 175 bp, RNS-polimerāze 2, kuras tiešais praimeris 5'-GCCAGAGTCTCCCATGTGTT-3', atgriezeniskais praimeris 5'-GTCGGTGGGACTCTGTTTGT-3', sagaidāmais produkta izmērs 135 bp, porfobilinogēna deamināze, kuras tiešais praimeris 5'-ATCTTGCACCCAGAGGAATG-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-CATGCAACACACCCACTAGG-3', sagaidāmais produkta izmērs 106 bp, glicerāldehīda-3-fosfāta dehidrogenāze (GAPDH), kuras tiešais praimeris ir 5'-GAAGGGCTCATGACCACAGT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3', sagaidāmais produkta izmērs 117 bp, beta-aktīns, kura tiešais praimeris ir 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3', sagaidāmais produkta izmērs 115 bp.

#### 2.4.4. Slāpekļa oksīda koncentrācijas noteikšana audos un asinīs

NO<sup>•</sup> saturs tika noteikts pēc prof. Vaņina izstrādātās elektronparamagnētiskās rezonanses metodes (Mikoyan et al., 1997; Vanin, 1998; Baumanē et al., 2002). Dzīvniekiem pirms dekapitācijas ievadīja NO<sup>•</sup> saistītāju DETC (dietilditiokarbamāts) nātrija sāli (400 mg/kg i.p.) un Fe<sup>2+</sup> (40 mg/kg FeSO<sub>4</sub> + 200 mg/kg Na citrāts; s.c.). Tie audos veido Fe-DETC kompleksus, kas saista un stabilizē NO<sup>•</sup>. Pēc šo kompleksu EPR spektra intensitātes noteica NO<sup>•</sup> daudzumu. 30 min pēc NO<sup>•</sup> saistītāju ievadīšanas dzīvniekus giljotinēja. Izvēlētos pētāmos orgānus, izpreparēja, asinis heparinizēja. Insulīna šļirces blīvi piepildīja ar audiem, sasaldēja šķidrā slāpekļī, tad atkausējot parauga ārējo slāni, izstūma ārā, iegūstot 2 cm garus cilindriskus paraugus ar diametru 4mm. EPR spektri tika reģistrēti 77K temperatūrā, izmantojot EPR spektrometru Radiopan SE/X2544 (Polija) un kvarca djuāru Bruker ER 167 FDS-Q (Vācija). EPR spektru pieraksta parametri: 25 mW mikroviļņu jauda, 100 kHz modulācijas frekvence, 5 G modulācijas amplitūda, pastiprinājums RG=0,5x10<sup>4</sup>, laika konstante 1 s. Relatīvais NO<sup>•</sup> daudzums, kas 30 min laikā veidojas un saistās dzīvnieku audos,

noteica pēc NO-Fe-DETC signāla trešās komponentes ( $g=2,031$ ) augstuma. NO koncentrācija (ng/g audu) tika aprēķināta uz kalibrācijas līkņu pamata, kā aprakstīts iepriekš (Vanin, 1998; Petukhov et al., 2008).

#### 2.4.5. Imūnhistoķīmija

Proteīna ekspresijas līmeņi tika noteikti ar imūnhistoķīmijas metodi (Di Stefano et al., 2002). iNOS proteīna līmeņi tika noteikti aknās, smadzeņu garozā, nierēs, sirdī, nervos, acīs, savukārt eNOS – nierēs, sirdī, nervos, acīs. Histoloģiskā materiāla pagatavošanai audi tika fiksēti vismaz 48 stundas 10% buferētā formalīnā, pēc tam atūdeņoti un ieguldīti parafīnā. No blokiem tika pagatavoti 4  $\mu$ m biezi griezumumi un iekrāsoti imūnhistoķīmiski. Pirms iekrāsošanas veica deparafinizāciju, secīgi ievietojot tos attiecīgos šķīdumos: ksilolā I (10 min), ksilolā II (5 min), 96% spirtā I (3 min), 96% spirtā (3 min), 70 % spirtā (3 min), 70 % (3 min). Antigēna demaskēšanai tika izmantota sakarsēšanas metode mikroviļņu krāsnī 300 W – preparāti tika ievietoti nātrija citrāta buferī pH=6,0 un 20 min inkubēti. Endogēnās peroksidāzes aktivitāte tika nomākta ar 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 min, pēc kā veicām preparātu skalošanu ar Tris bufera sāls šķīdumu. Sekojoši notika paraugu inkubācija ar primāro antivielu. Nespecifiskās primārās antivielas tika bloķētas ar bezseruma proteīna bloķētāju 10 minūtes. Sekundārās monoklonālās iNOS un eNOS antivielas tika atšķaidītas ražotāja ieteiktajā koncentrācijā, un paraugi tika inkubēti vienu stundu 1h kamerā ar regulējumu gaisa mitrumu istabas temperatūrā. Antivielas saistīšanos audos demonstrēja, inkubējot preparātus 30 minūtes istabas temperatūrā ar polimēru EnVision. Vizualizācijas reakciju veica ar 3,3-diaminobenzidīnu, kas iezīmēja antigēna-antivielas saistīšanos brūnā krāsā. Preparāti tika analizēti, šūnu skaitu nosakot uz laukuma vienību (1/mm<sup>2</sup>) 400x palielinājumā.

#### 2.4.6. Nitrātu/nitrītu koncentrācijas noteikšana dzīvnieku asins serumā un urīnā

Dzīvnieku asinis NO<sup>2-</sup>/NO<sup>3-</sup> koncentrācijas noteikšanai tika savāktas stobriņos bez antikoagulanta, tādējādi tās sarecēja 30 min laikā istabas temperatūrā, kam sekoja paraugu centrifugācija pie 3000 apgriezieni/ minūtē. Supernatants tika pārņemts trīs jaunos stobriņos pa 200  $\mu$ l un sasaldēts pie -80°C. Seruma paraugus deproteinizēja,



izmantojot *Amicon Ultra* membrānu filtrus, pēc ražotāja protokola. Urīns tika savākts sterilos 1,5 ml stobriņos un sasaldēts pie  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nitrātu/nitritu koncentrācijas noteikšanai asins serumā un urīna izmantoja *Cayman's Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit* reaktīvu komplektu, sekojot ražotāja protokolam, un plašu lasītājs (*Infinite M200PRO*, *TECAN*, Šveice) (Sun et al., 2003).

#### **2.4.7. Glikozes līmeņa pārbaude dzīvnieku asinīs**

Pirms terapijas uzsākšanas dzīvniekiem tika izmērīts glikozes līmenis perifērajās asinīs, punktējot astes vēnu. Pabeidzot terapiju, glikozes līmenis perifērajās asinīs tika izmērīts vēlreiz. Dzīvnieki tika imobilizēti dzīvnieku sugai paredzētos sprostos. Analīzes veica, izmantojot *FreeStyle Optium* teststrēmeles glikozes noteikšanai.

#### **2.4.8. 1,4-DHP DNS vienpavedienu reparējošo īpašību analīze 1TCD pacientu asinīs *ex vivo***

1TCD pacienti tika izvēlēti saskaņā ar **2.1.** nodaļā uzskatītajiem kritērijiem, kā arī šiem pacientiem 1TCD stāžs bija ne mazāks par 10 gadiem un anamnēzē tika uzrādīta diabētiska nefropātijas un/vai retinopātijas. Dati tika salīdzināti ar kontroles grupas datiem, kas tika atlasīti saskaņā ar **2.1.** nodaļa minētajiem kritērijiem. 1TCD pacientu perifērās venozās asinis tika savāktās vakuuma stobriņos ar heparīnu. Alikvotētās. Tām tika pievienots AV-153-Na 1, 5, 10 nM koncentrācijā. Maisījums tika inkubēts trīs stundas 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ . Tam sekoja vienas šūnas elektroforēze sārmainos apstākļos, kas ir aprakstīta **2.4.1.** nodaļā. Darbs tika saskaņots ar PSKUS Attīstības biedrības Klīniskās izpētes Ētikas komiteju. Atzinums Nr. 190314-8L par pētījumu: „Jaunas starpnozaru grupas izveide efektīvu diabētiskās nefropātijas ārstēšanas līdzekļu meklējumiem”, 19.03.14 (pielikums Nr. 9.6.).

#### **2.4.9. EPR spektrometrijas metode *in vitro***

Tika izvērtēta 1,4-dihidropiridīnu spēja neitralizēt  $\text{OH}^{\cdot}$  radikāli, kas veidojas Fentona reakcijā:  $\text{Fe}^{2+}\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot} + \text{SO}_4^{2-}$ .  $\text{OH}^{\cdot}$  radikāļa

detektēšanai izmanto radikāļu ķērāju DMPO:  $\text{DMPO} + \text{OH}^\cdot \rightarrow \text{DMPO-OH}^\cdot$ . Sekojoši 1,4-DHP tika izanalizēti šajā sistēmā: PP-150-Na, PP-501, PP-607, J-3-186, J-4-92, J-3-191, J-7-53, J-6-93, J-8-120, J-6-138, karbatons, metkarbatons (1, 0,5, 0,1, 0,05 mM), etkarbatons, propkarbatons, glutapirons, AV-153-Na, AV-153-Li, AV-153-K, AV-154-Na (pielikums Nr. 9.8). Reakcijā piedalās četras komponentes: 1,4-DHP (1 mM) vai  $\text{H}_2\text{O}$ , DMPO, (80 mM),  $\text{FeSO}_4$  (250  $\mu\text{M}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (250  $\mu\text{M}$ ). Pēc komponentu apvienošanas, kur kopējais reakcijas tilpums 100  $\mu\text{l}$ , maisījumu rūpīgi samaisīja un iepildīja kapilāros EPR mērījumiem istabas temperatūrā. EPR spektru reģistrēšanas parametri bija sekojoši: modulācijas frekvence 100 kHz, mikroviļņu frekvence 9,5 GHz, mikroviļņu jauda 15 mW, modulācijas amplitūda 1,0 G, laika konstante 160 s, spektra pieraksta laiks 200 s, pastiprinājums  $1 \times 10^5$ . (Chen et al., 2012). Mērījumi tika veikti 3 min un 5 min pēc komponentu apvienošanas brīža. Savienojumiem, kuri uzrādīja radikāļus neitralizējošo aktivitāti, tika veikts mērījums zemākās 1,4-DHP koncentrācijās (500  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ). Mērījumiem tika izmantots EPR spektrometrs Radiopan SE/X2544 (Polija) un kvarca djuārs Bruker ER 167 FDS-Q (Vācija).

#### **2.4.10. Plazmīdas DNS izdalīšana no *Escherichia coli***

*In vitro* DNS pārrāvumu pētījumiem tika izmantota plazmīdas pTZ57R DNS molekula. Plazmīda tika kultivēta *Escherichia coli* DH5alfa celmā un izdalīta, izmantojot konvencionālo sārmainās ekstrakcijas protokolu (Birnoim and Doly, 1979). 15 ml baktēriju kultūras augšanas vidē centrifugēja 10 min pie 4500 apgriezieni/ minūtē, supernatantu nolēja, nogulsnes pipetējot atšķaidīja ar 2 ml I buferšķīduma (50 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100  $\mu\text{g}$  RNāze), tad pievienoja 2ml II buferšķīduma (200 mM NaOH, 1% SDS), apmaisīja, apvēršot mēģeni. Sekojoši pievienoja III buferšķīdumu (3,0 M kālija acetāts, pH 5,5), samaisīja apvēršot, veidojās baltas nogulsnes. Stobriņus centrifugēja 30 min pie 4500 apgriezieni/ minūtē, pārnesa supernatantu tīrā stobriņā. Supernatantam pievienoja 9 ml ledusauksta 96% etanola, labi samaisīja ar vairākkārtēju apgāšanu, centrifugēja 40 minūtes pie 4500 apgriezieni/ minūtē. Supernatantu nolēja, nogulsnēm pievienoja 1 ml ledusauksta 75% etanola. Centrifugēja vienu stundu pie 4500 apgriezieni/ minūtē,

supernatantu nolēja, nogulsnes tika žāvētas 10-30 minūtes. Nogulsnes atšķaidīja TE buferšķīdumā (10mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA). Glabāja pie -20°C.

#### 2.4.11. DNS bojājumu analīze Fentona reakcijas apstākļos 1,4-DHP klātbūtnē

DNS aizsargājošās un antiradikālās spējas Fentona reakcijas apstākļos tika pētītas šādiem 1,4-dihidropiridīniem: AV-153-Na, AV-153-Li, AV-153-K, J-7-53, J-4-96, cerebrokrastam, etaftoronam, fenoforonam, tauropironam, AV-154-Na, metkarbatonam, karbatonam, J-3-131-Na, J-8-120, PP-544-NH<sub>4</sub>, J-3-186, B-5-Na, alapironam, glutapironam (pielikums Nr. 9.8.). Ūdenī nešķīstošie 1,4-DHP (cerebrokrasts, fenoftorons, etaftorons) tika šķīdināti DMSO līdz 0,1 M koncentrācijai un sekojoši – fosfātu buferī, līdz nepieciešamai koncentrācijai, ūdenī šķīstošie 1,4-DHP tika šķīdināti ddH<sub>2</sub>O līdz 0,1 M koncentrācijai un tālāk fosfātu buferī (PBS).

DNS pārrāvumi tika izraisīti ar Fentona reakcijas palīdzību. Fentona reakcija tika izsaukta, apvienojot vienā mēģenē (10 µl) sekojošas vielas: plazmīdas DNS (0,2 µg), 0,003% ūdeņraža pārskābe, 0,01 mM dzelzs sulfāts fosfāta buferī (PBS), analizējamā viela 5, 10, 25, 50, 100 µM koncentrācijā. Vielu maisījums tika inkubēts pie 37°C 30 min sausā termoblokā. Reakcija tika inhibēta, sajaucot vielu maisījumu ar 6x Loading Dye solution, kam sekoja horizontālā elektroforēze 0,8% agarozes gēlā (40 mM Tris, 20 mM nātrija acetāts, 2 mM EDTA) neitrālos apstākļos (pH 8), kur elektroforēzes buferis saturēja tādas pašas vielas un koncentrācijas kā gēla buferis. Spriegums 30V. Pēc elektroforēzes gels tika krāsots ar etīdija bromīdu (0,5 µg/ml) 30 min un atmazgāts ar destilētu ūdeni 30 min. Pēc inkubācijas paraugi tika karsēti 5min pie 95°C un atdzesēti uz ledus. Paraugi tika sajaukti ar 6x Loading Dye solution pirms ievades 0,8% agarozes gēlā, kas saturēja 2 mM EDTA/30 mM NaCl, horizontālās elektroforēzes kamera saturēja 2 mM EDTA/30 mM NaOH šķīdumu. Elektroforēze tika veikta pie 30 V, kam sekoja krāsošana ar etīdija bromīdu (0,5 µg/ml) 30 min un atkrāsošana ar destilētu ūdeni 30 min. Gēli tika fotografēti ar videodokumentēšanas sistēmas BioSpectrumAC Imaging System palīdzību. Joslas uz gēla tika analizētas ar programmu GelAnalyzer2010a.

#### 2.4.12. Datu statistiskā apstrāde

Iegūtajiem rezultātiem tika aprēķināta vidējā aritmētiskā vērtība un vidējā aritmētiskā standartklūda (S.E.M.). Grupām, kurās tika apkopoti kontroles paraugu dati jeb bez papildus modifikācijām, tika veikta Kolmogorova – Smirnova tests, lai pārlicinātos par grupas normālsadalījumu. Tas ir nepieciešams, jo kontroles grupas reprezentē populāciju. Ja iegūtais rezultāts ( $p < 0,05$ ) liecināja par novirzi no normālsadalījumu, no turpmākā aprēķina tika izslēgti galējie rezultāti. Pēc izslēgšanas tika atkārtots tests, lai pārlicinātos par sasniegto.

Pēc tam kontroles grupas tika izmantota grupu salīdzināšanai, kas tika veikta ar vienfaktoru dispersijas analīzi (AVONA) ar sekojošu pēctestu (*Newman-Keuls* tests), nepāra un pāra t-tests, kas ir uzrādīts pie attiecīgo rezultātu apkopojumu tabulām un grafikiem. Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja p vērtība bija mazāka par 0,05.

Datu apkopošanai un statistiskai analīzei tika izmantota *Microsoft Excel* (*Microsoft*, ASV), *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software Inc.*, ASV) programmas.

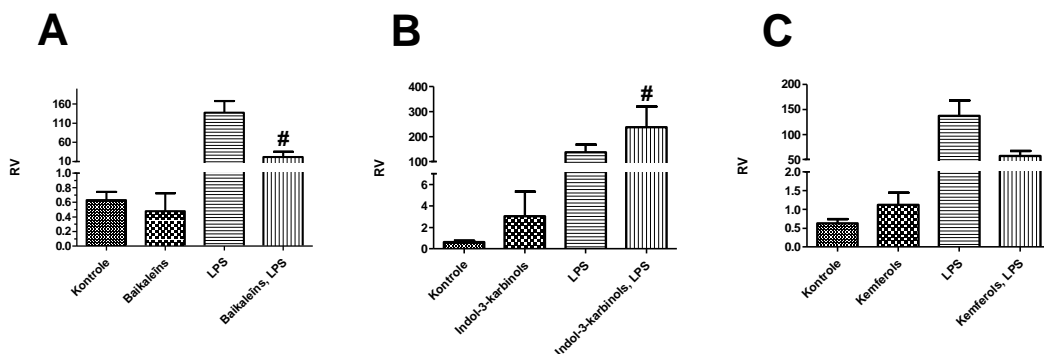
### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. Dabas vielu efekts uz slāpekļa oksīda sintēzi LPS inducētā akūtā iekaisuma apstākļos dažādos orgānos žurkās

##### 3.1.1. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku aknās lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē

Aknās iNOS gēna ekspresiju veselajos dzīvniekos ( $0,63 \pm 0,11$  RV,  $n=21$ ) salīdzinot ar šī gēna ekspresiju LPS iekaisuma modelī ( $137,50 \pm 30,34$  RV,  $n=15$ ), konstatējām statistiski ticamu atšķirību, kur  $p < 0,0001$ , analizējot ar nepāra t-testu.

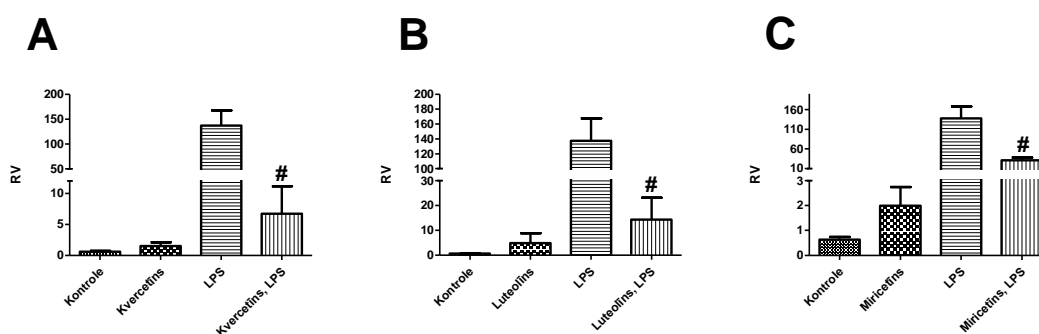
Veselo dzīvnieku aknās baikaleīna klātbūtne neuzrāda būtiskas iNOS gēna ekspresijas izmaiņas ( $0,48 \pm 0,25$  RV,  $n=3$ ), bet LPS iekaisuma modelī samazina to līdz  $21,75 \pm 13,54$  RV,  $n=3$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;38)=11,45$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.1. att). Savukārt indol-3-karbinols parādu pretēju efektu, uzrāda tendenci paaugstināt iNOS mRNS daudzumu veselajos dzīvniekos līdz  $3,06 \pm 2,30$  RV,  $n=3$  un paaugstina iekaisuma modelī iNOS gēna ekspresijas līmeni līdz  $238,2 \pm 82,05$  RV,  $n=3$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;38)=14,48$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.1. att.). Kemferols aknās kontroles grupā paaugstina iNOS mRNS ekspresiju līdz  $1,12 \pm 0,33$  RV,  $n=3$ , bet iekaisuma modelī uzrāda līdzīgas tendences kā baikaleīns un samazina iNOS gēna ekspresiju līdz  $57,29 \pm 9,87$  RV,  $n=3$  tomēr nesasniedzot statistiskas ticamības sliekšni ( $F(3;38)=11,29$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.1. att).



3.1. att. iNOS gēna ekspresija kontroles un LPS inducētā akūtā iekaisuma grupās A. baikaleīna (50 mg/kg), B. indol-3-karbinola (50 mg/kg), C. kemferola (50

**mg/kg) klātbūtnē žurku aknās.** Grupās ir no 5 līdz 16 dzīvniekiem Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pēctestu.

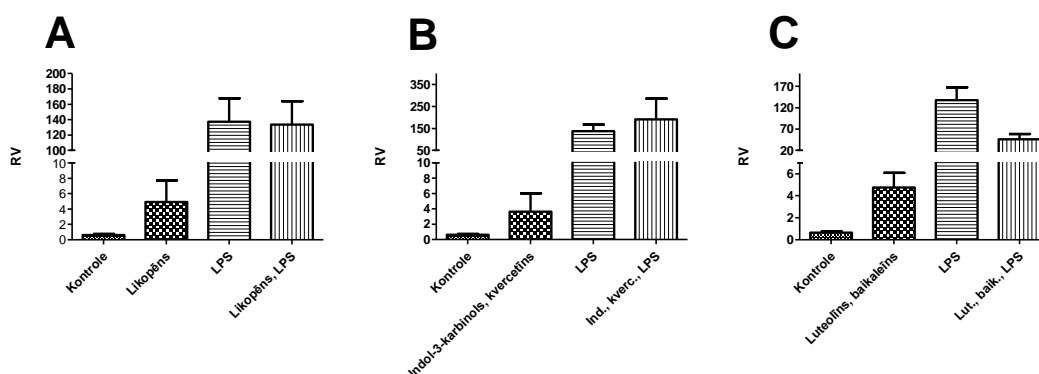
Kvercetinā uzrāda tendenci paaugstināt iNOS gēna ekspresiju  $1,52 \pm 0,53$  RV,  $n=3$ , savukārt iekaisuma modelī šīs vielas klātbūtnē iNOS gēna ekspresija, salīdzinot ar LPS kontroles grupu, samazinās 20,5 reizes līdz  $6,70 \pm 4,46$  RV,  $n=3$ ,  $p < 0,01$  ( $F(3;38)=11,70$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.2. att.). Ievadot luteolīnu, konstatēja, ka tas uzrāda tendenci veselīgiem dzīvniekiem paaugstināt iNOS gēna līmeni līdz  $4,91 \pm 2,81$  RV,  $n=3$ , un samazina iNOS gēnu līdz  $14,36 \pm 8,79$  RV,  $n=3$  ( $F(3;38)=11,50$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.2. att.). Miricetīna klātbūtnē veselos dzīvniekos iNOS ekspresija paaugstinājās līdz  $1,99 \pm 0,75$  RV,  $n=3$ , tomēr nesasniedzot statistisku ticamību, LPS iekaisuma modelī tas samazina līdz  $31,00 \pm 6,90$  RV,  $n=3$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;38)=11,38$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.2. att.).



**3.2. att. iNOS gēna ekspresija kontroles grupā un LPS inducētā akūtā iekaisuma grupās A. kvercetīna (50 mg/kg), B. luteolīna (50 mg/kg), C. miricetīna (50 mg/kg) klātbūtnē žurku aknās.** Grupās ir no 5 līdz 16 dzīvniekiem Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pēctestu.

Sekojošās apskatītās dabas vielas un to kombinācijās neuzrādīja statistiski ticamu aktivitāti mūsu interesējošā iekaisuma modelī un kontroles grupās. Likopēns veselajos paaugstina iNOS gēna ekspresiju līdz  $4,9 \pm 2,81$  RV,  $n=3$ , bet LPS iekaisuma grupā iNOS ekspresija palika gandrīz LPS modeļa skaitļos-  $133,80 \pm 30,70$  RV,  $n=3$  ( $F(3;38)=12,08$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.3. att.). Indol- 3- karbinola un kvercetīna

kombinācija veselajos dzīvniekos paaugstina iNOS gēna ekspresiju līdz  $3,6 \pm 2,41$  RV,  $n=3$  un iekaisuma gadījumā paaugstina līdz  $191,00 \pm 95,41$  RV,  $n=3$  ( $F(3;38)=11,48$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.3. att.). Savukārt luteolīna un baikaleīna kombinācija paaugstina iNOS gēna ekspresiju kontroles dzīvniekos līdz  $4,75 \pm 1,32$  RV,  $n=3$ , bet iekaisuma modelī samazina līdz  $46,10 \pm 12,30$  RV,  $n=3$ , salīdzinot ar LPS iekaisuma kontroles grupu ( $F(3;38)=11,21$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.3. att.).



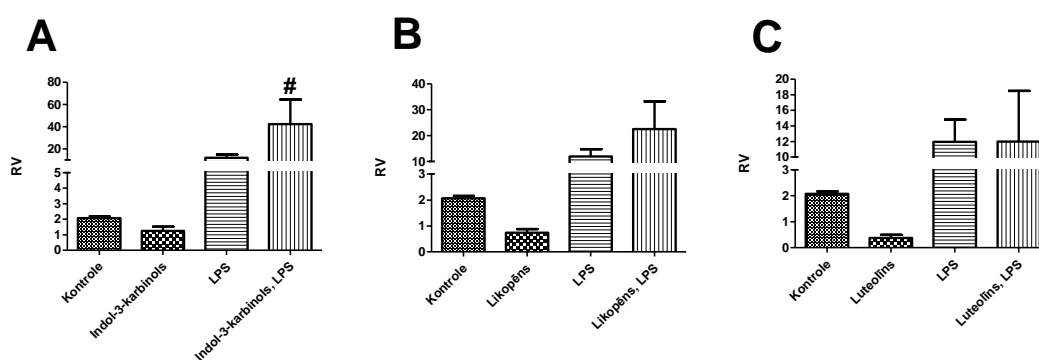
**3.3. att. iNOS gēna ekspresija kontroles grupā un LPS inducētā akūtā iekaisuma grupās A. likopēna (50 mg/kg), B. indol-3-karbinola (50 mg/kg), kvercetīna (50 mg/kg), C. luteolīna (50 mg/kg), baikaleīna (50 mg/kg) klātbūtnē aknās.** Grupās ir no 5 līdz 16 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p<0,05$  pret kontroles grupu, # $p<0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pēctestu.

### **3.1.2. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku smadzeņu garozā lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē**

Smadzeņu garozā veselo dzīvnieku kontroles grupā iNOS gēna ekspresija sastādīja  $2,10 \pm 0,10$  RV,  $n=10$ , bet LPS inducētā iekaisuma modelī-  $11,98 \pm 2,83$  RV,  $n=16$ , analizējot datus ar nepāra t-testu tika atrasta statistiski ticama starpība starp grupām, kur  $p=0,04$ .

Smadzeņu garozā indol-3-karbinols intaktiem dzīvniekiem samazina iNOS gēna ekspresiju līdz  $1,26 \pm 0,26$  RV,  $n=15$ , iekaisuma modelī indol-3-karbinols iNOS gēna ekspresiju statistiski ticami paaugstina līdz  $42,38 \pm 22,21$  RV,  $n=6$ ,  $p<0,01$

( $F(3;43)=6,961$ ,  $p=0,0006$ ) (sk. 3.4. att.). Neskatoties uz to, ka likopēns kontroles grupā samazina iNOS gēna koncentrāciju 2,8 reizes un sasniedz  $0,739\pm 0,137$  RV,  $n=5$ , un iekaisuma modelī likopēna klātbūtnē iNOS gēna ekspresija pieaug līdz  $22,53\pm 10,74$  RV,  $n=4$ , analizējot datus ar vienvirziena ANOVA, netika sasniegts statistiskās ticamības sliekšnis ( $F(3;31)=5,30$ ,  $p=0,0046$ ) (sk. 3.4. att.). Luteolīns uzrādīja līdzīgas tendences, intaktiem dzīvniekiem tas samazināja iNOS gēna ekspresiju 5,5 reizes līdz  $0,37\pm 0,12$  RV,  $n=5$ , savukārt iekaisuma modelī iNOS gēna līmenis palika gandrīz nemainīgs,  $12,01\pm 6,515$  RV,  $n=5$  ( $F(3;32)=3,74$ ,  $p=0,0207$ ) (sk. 3.4. att.).



**3.4. att. iNOS gēna ekspresija kontroles grupā un LPS inducētā akūtā iekaisuma grupās A. indol-3-karbinola (50 mg/kg), B. likopēna (50 mg/kg), C luteolīna (50 mg/kg) klātbūtnē žurku smadzeņu garozā.** Grupās ir no 5 līdz 16 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p<0,05$  pret kontroles grupu, # $p<0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pēttestu.

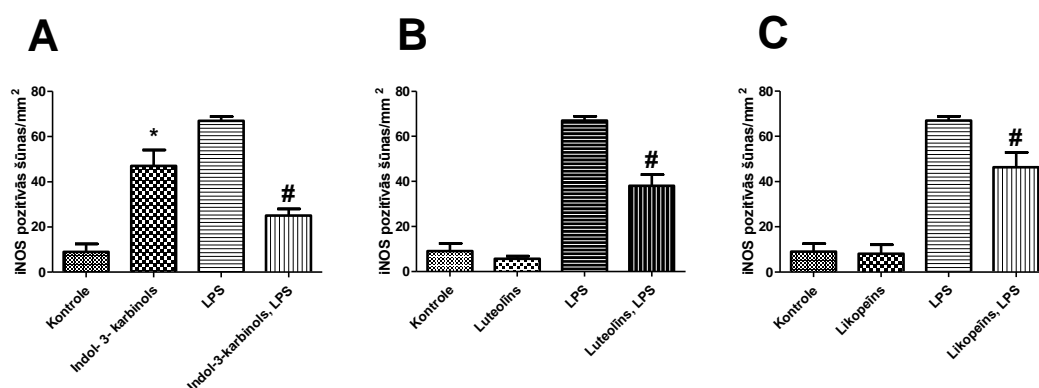
### 3.1.3. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dzīvnieku aknās lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē

Inducējamā slāpekļa oksīda sintāze ir proteīns, kas sintezē slāpekļa oksīdu. Sekojoši tā ekspresijas izmaiņas var ietekmēt arī slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas. Tamdēļ bija nozīmīgi apskatīties tā koncentrācijas svārstības dažādu dabas vielu ietekmē LPS inducētā iekaisuma modelī, īpaši aknās, kas ir viens no galvenais orgāniem, kas piedalās organisma aizsardzības procesos.



iNOS proteīna ekspresija veselo dzīvnieku aknas sastāda  $9,00 \pm 3,51$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3, bet LPS inducētā iekaisuma modeļa grupā-  $67,00 \pm 1,92$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=4. Izanalizējot datus ar nepāra t-testu, tika iegūta statistiski ticama starpība starp grupām, kur  $p < 0,0001$ .

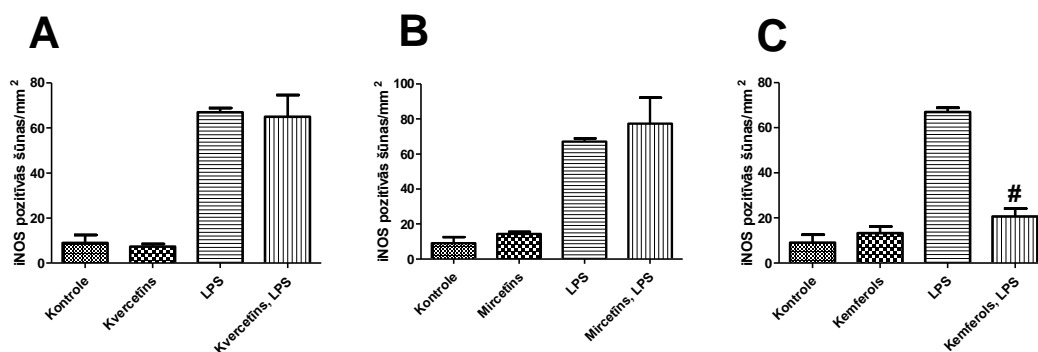
Indol- 3- kabinols statistiski ticami ( $F(3;7)=63,29$ ,  $p < 0,0001$ ) paaugstina iNOS proteīna ekspresiju aknu audos veseliem dzīvniekiem līdz  $47,00 \pm 7,00$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=2,  $p < 0,001$ . Inducētā iekaisuma modelī indol- 3- karbinols samazina iNOS proteīna ekspresiju līdz  $25,00 \pm 3,00$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=2 (sk. 3.5. att.). Veselajos dzīvniekos luteolīns uzrāda tendenci samazināt iNOS proteīna ekspresiju līdz  $5,67 \pm 1,20$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3, iNOS ekspresija samazinās arī inducētā iekaisuma modeļa apstākļos līdz  $38,00 \pm 5,03$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3,  $p < 0,001$  ( $F(3;9)=93,31$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.5. att.). Veselajos dzīvniekos likopēns neuzrādīja iNOS proteīnu ekspresiju ietekmējošu aktivitāti-  $8,00 \pm 4,04$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3, salīdzinot ar kontroles grupu, bet iekaisuma gadījumā likopēns samazināja iNOS proteīna ekspresiju līdz  $46,33 \pm 6,64$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3  $p < 0,01$  ( $F(3;9)=54,27$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.5. att.).



**3.5.att. iNOS proteīna ekspresija kontroles grupā un LPS inducētā akūtā iekaisuma grupās pēc p/o A. indol-3-karbinola (50 mg/kg), B. luteolīna (50 mg/kg), C. likopēna (50 mg/kg) ievades žurku aknās.** Grupās ir no 2 līdz 4 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, pēc vienvirziena ANOVA, Newman-Keuls pēctesta.

Kvercetīna ietekmē veselajos dzīvniekos iNOS proteīna ekspresija būtiski nemainījās,  $7,33 \pm 1,20$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3, līdzīga aina ir iekaisuma modelī,  $65,00 \pm 9,54$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3 ( $F(3;9)=48,48$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.6. att.). Mircetīns aknu audos

neuzrādīja vērā ņemamu un statistiski ticamu ietekmi uz iNOS proteīna ekspresiju gan veselajos dzīvniekos,  $14,33 \pm 1,20$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3, gan iekaisuma modelī,  $77,33 \pm 14,85$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3 ( $F(3;9)=24,35$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.6. att.). Savukārt, kemferols samazināja iNOS proteīna ekspresiju LPS modelī līdz  $20,67 \pm 3,53$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3, salīdzinot ar LPS iekaisuma modeļa grupu, bet neietekmēja intaktajos dzīvniekos,  $13,33 \pm 2,91$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3 ( $F(3;9)=97,27$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.6. att.).



**3.6.att. iNOS proteīna ekspresija kontroles grupā un LPS inducētā akūtā iekaisuma grupās pēc p/o A. kvercētīna (50 mg/kg), B. miracetīna (50 mg/kg), C. kemferola (50 mg/kg) ievades aknās.** Grupās ir no 3 līdz 4 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, pēc vienvirziena ANOVA, *Newman–Keuls* pēctesta.

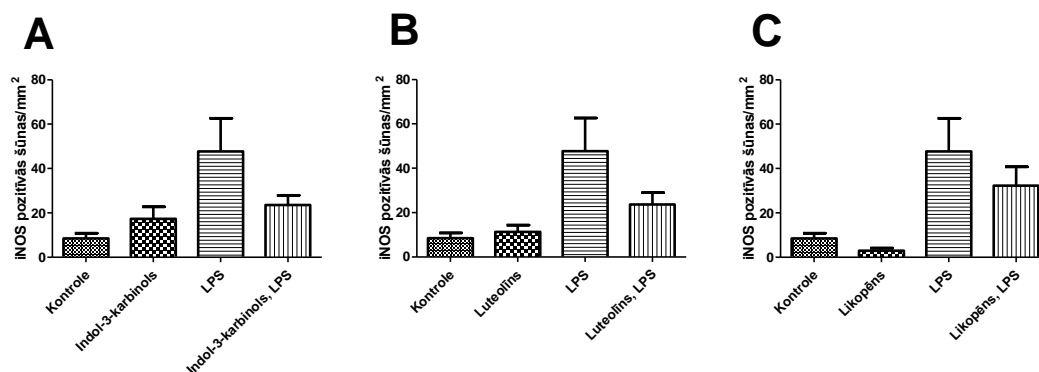
### 3.1.4. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dzīvnieku smadzeņu garozā lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē

iNOS proteīna koncentrācijas izmaiņas tika skatītas arī smadzeņu garozā.

Salīdzinot iNOS proteīna ekspresiju smadzeņu garozā kontroles grupā ar LPS iekaisuma modeļa datiem, ar nepāra t- testu ieguvām statistiski ticamu starpību, kur  $p = 0,0275$ ,  $8,50 \pm 2,31$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=6, pret  $47,67 \pm 15,02$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=6, attiecīgi.

Izanalizējot iegūtos datus, diemžēl nācās secināt, kas statistisku ticamību neizdevās sasniegt nevienā no grupām un ir novērojamas tikai tendences. Indol-3-karbinols smadzeņu garozā paaugstināja iNOS ekspresiju līdz  $17,40 \pm 5,37$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, salīdzinot to pret kontroles grupu, bet LPS modelī samazināja to gandrīz uz pusi,

23,60±4,44 šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5 (F(3;18)=3,813, p=0,0282) (sk. 3.7. att.). Luteolīns paaugstināja iNOS proteīna līmeni līdz 11,33±3,05 šūnas/mm<sup>2</sup>, n=6, LPS modelī iNOS proteīna koncentrācija samazinājās līdz 23,67±5,38 šūnas/mm<sup>2</sup>, n=6 (F(3;20)=4,732, p=0,0118) (sk. 3.7. att.). Likopēns dzīvniekos bez iekaisuma iNOS līmeni samazināja uz pusi līdz 3,00±1,16 šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3, inducētā iekaisuma modelī likopēns iNOS proteīna ekspresiju paaugstināja līdz 32,33±8,41 šūnas/mm<sup>2</sup>, n=3 (F(3;14)=4,013, p<0,0297) (sk. 3.7. att.).

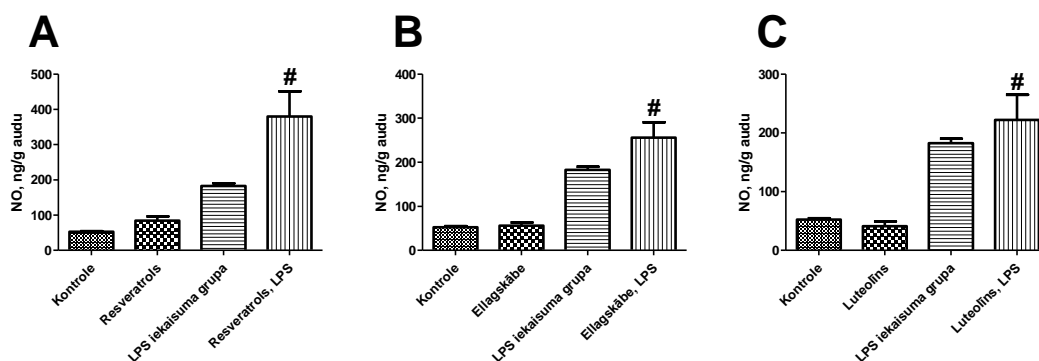


**3.7.att. iNOS proteīna ekspresija kontroles grupā un LPS inducētā akūtā iekaisuma grupās pēc p/o A. indol-3-karbinola (50 mg/kg), B. luteolīna (50 mg/kg) C. likopēna (50 mg/kg) ievades žurku smadzeņu garozā.** Grupās ir pa 3 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko ± S.E.M. \*p<0,05 pret kontroles grupu, #p<0,05 pret LPS grupu, pēc vienvirziena ANOVA, *Newman–Keuls* pētēta.

### 3.1.5. Slāpekļa oksīda koncentrācijas noteikšana ar EPR spektrometrijas metodi dažādos dzīvnieku audos lipopolisaharīda iekaisuma modelī dabas vielu klātbūtnē

Tika izvērtēta dažādu dabas vielu ietekme uz slāpekļa oksīda produkciju dažādos dzīvnieku audos. Slāpekļa oksīda koncentrācija audos tika mērīta sekojošu dabas vielu klātbūtnē: resveratrols, ellagskābe, kvercētīns, kemferols, luteolīns, indol-3-karbinols, likopēns, miricētīns, baikalēns, kafijskābes esteris un dažas dabas vielu kombinācijas. Rezultātu sadaļā tika apskatīti dati par vielām, kas sasniedza statistiskās ticamības sliekšni, analizējot tos ar vienvirziena ANOVA un sekojošu *Newman–Keuls* pētēstu. Dati ir apkopoti pielikumā Nr. 1.

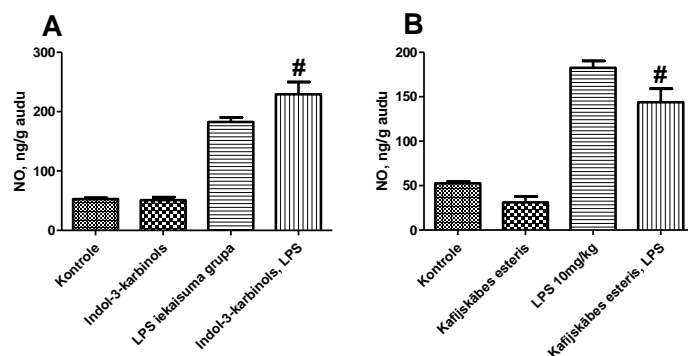
Izanalizējot ar nepāra t- testu slāpekļa oksīda koncentrāciju veselo dzīvnieku smadzeņu garozā ( $52,57 \pm 2,22$  ng/g audu,  $n=35$ ) attiecībā pret tās koncentrāciju LPS inducētā iekaisuma gadījumā ( $182,60 \pm 7,66$  ng/g audu,  $n=30$ ), ieguvām statistiski ticamu starpību starp grupām, kur  $p < 0,0001$ . Smadzeņu garozas audos resveratrols koncentrācijā 50/mg/kg kontroles grupā uzrādīja tendenci paaugstināt slāpekļa oksīda koncentrāciju līdz  $84,33 \pm 12,04$  ng/g audu,  $n=9$ , savukārt LPS iekaisuma modelī šī tendence sasniedza statistiskās ticamības robežu-  $379,60 \pm 71,76$  ng/g audu  $n=8$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;78)=59,04$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.8. att.). Ellagskābe veselajos dzīvniekos neuzrādīja NO koncentrāciju ietekmējošas īpašības ( $56,24 \pm 7,11$  ng/g audu,  $n=8$ ), salīdzinot ar kontroles grupu, bet iekaisuma modelī slāpekļa oksīda koncentrācija ellagskābes klātbūtnē paaugstinājās līdz  $255,70 \pm 35,27$  ng/g audu,  $n=10$ , kur  $p < 0,001$  ( $F(3;79)= 5,45$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.8. att.). Luteolins kontroles dzīvniekos minimāli ietekmēja slāpekļa oksīda koncentrāciju ( $41,41 \pm 7,83$  ng/g audu,  $n=14$ ), bet iekaisuma gadījumā luteolīns uzrādīja NO paaugstinošas spējas ( $222,10 \pm 42,95$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,05$ ) ( $F(3;84)=63,03$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.8. att.).



**3.8.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku smadzeņu garozā pēc A. resveratrola, B. ellagskābes un C. luteolīna p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī.** Dzīvnieki grupās variē no 34 līdz 8. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

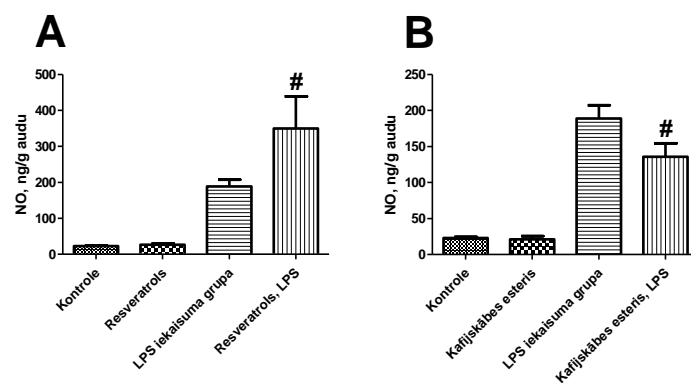
Līdzīgas tendences bija indol-3-karbinolam, kas veselajos dzīvniekos slāpekļa oksīda produkciju neietekmēja,  $51,00 \pm 4,81$  ng/g audu  $n=18$ , savukārt LPS grupā paaugstināja NO koncentrāciju līdz  $229,10 \pm 20,79$  ng/g audu  $n=12$ ,  $p < 0,001$

( $F(3;91)=126,20$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.9. att.). Kafijskābes esteris  $\text{NO}^{\cdot}$  koncentrāciju samazināja līdz  $143,70\pm 15,27$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p<0,01$  iekaisuma modeļa aknu audos, salīdzinot ar LPS iekaisuma modeļa grupu ( $F(3;72)=115,50$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.9. att.), bet veselajos dzīvniekos tika uzrādīta tikai tendence samazināt  $\text{NO}^{\cdot}$  koncentrāciju ( $31,28\pm 6,62$  ng/g audu,  $n=5$ ).



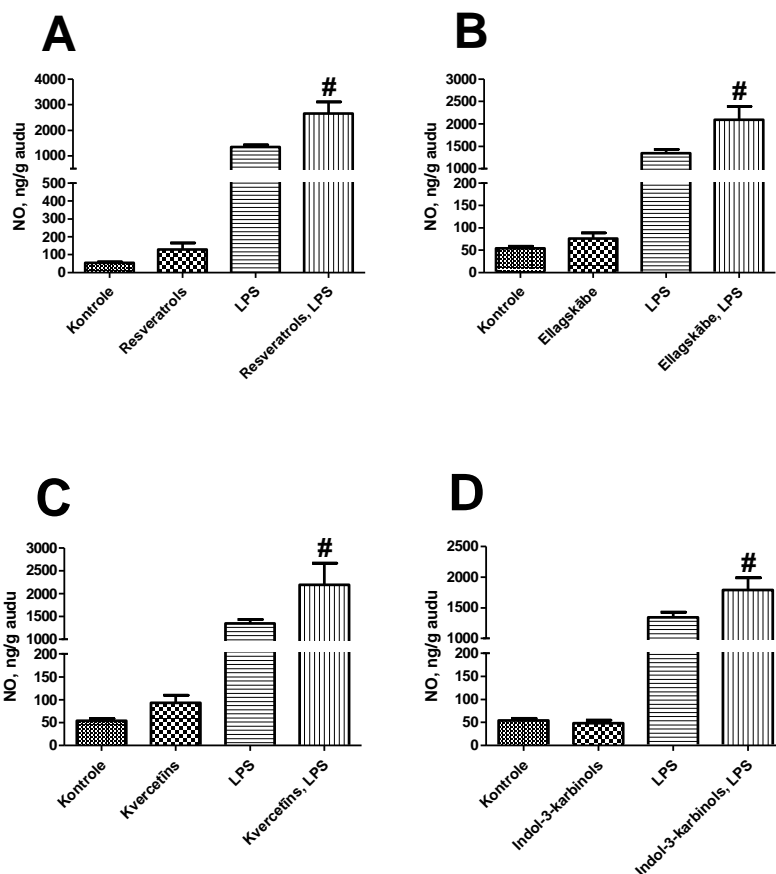
**3.9.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku smadzeņu garozas audos pēc A. indol- 3- karbinola, B. kafiskābes estera p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modeli.** Dzīvnieki grupās variē no 34 līdz 8. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p<0,05$  pret kontroles grupu, <sup>#</sup> $p<0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

Smadzenītes slāpekļa oksīda koncentrācija veselajos dzīvniekos bija  $23,31\pm 1,14$  ng/g audu,  $n=23$ , bet LPS izraisīts iekaisums paaugstināja  $\text{NO}^{\cdot}$  produkciju vairāk kā 8 reize līdz  $189,00\pm 18,37$  ng/g audu,  $n=21$ , sasniedzot statistiskās ticamības sliekšni, kur  $p<0,0001$ . Resveratrols veselajos dzīvniekos neizraisīja lielas slāpekļa oksīda svārstības ( $26,31\pm 1,14$  ng/g audu,  $n=8$ ), bet iekaisuma apstākļos paaugstināja slāpekļa oksīda produkciju gandrīz divas reizes līdz  $349,70\pm 89,59$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p<0,001$  ( $F(3;57)=22,52$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.10. att.). Kafijskābes esteris uzrādīja pretēju efektu iepriekšējam, LPS inducētā iekaisuma modeli tas samazināja  $\text{NO}^{\cdot}$  produkciju līdz  $135,70\pm 18,80$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p<0,05$  ( $F(3;52)=39,03$ ,  $p<0,0001$ ), savukārt veselajos dzīvniekos būtisku ietekmi uz  $\text{NO}^{\cdot}$  produkciju neuzrādīja ( $21,17\pm 4,54$  ng/g audu,  $n=6$ ) (sk. 3.10. att.).



**3.10.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku smadzenītēs pēc A. resveratrola, B. kafijskābes estera p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī.** Dzīvnieki grupās variē no 34 līdz 8. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, <sup>#</sup> $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

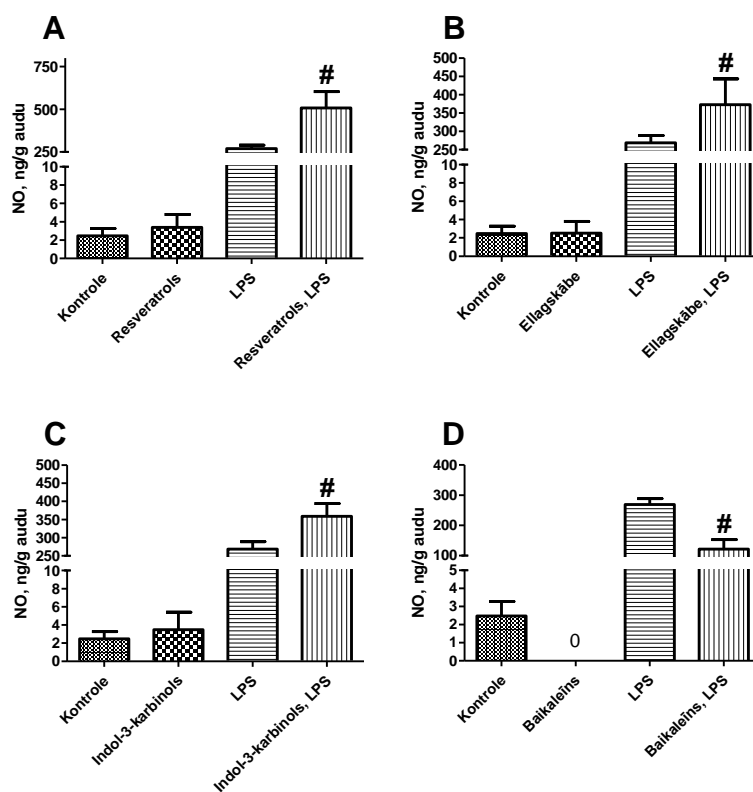
Aknās slāpekļa oksīda produkcija iekaisuma modeļa ietvaros ( $1346,00 \pm 83,20$  ng/g audu, ng/g audu,  $n=57$ ) pārsniedza NO koncentrāciju veselo dzīvnieku aknās ( $54,12 \pm 4,49$  ng/g audu,  $n=48$ ) gandrīz 25 reizes sasniedzot statistiskas ticamības sliekšni, kur  $p < 0,0001$ , analizējot ar nepāra t- testu. Veselajos dzīvniekos resveratrola ievade aknās neuzrādīja slāpekļa oksīda statistiski ticamas paaugstināšanas īpašības ( $128,60 \pm 36,93$  ng/g audu,  $n=9$ ), bet iekaisuma modelī resveratrols izsauca NO koncentrācijas paaugstināšanos līdz  $2662 \pm 446,50$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;119) = 85,31$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.11. att.). Ellagskābe kontroles grupā uzrādīja līdzīgas tendences kā resveratrols ( $76,35 \pm 12,48$  ng/g audu,  $n=8$ ) un iekaisuma grupā parādīja slāpekļa oksīda paaugstināšanas īpašības ( $2095,00 \pm 292,50$  ng/g audu,  $n=10$ ,  $p < 0,001$ ) ( $F(3;119) = 85,91$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.11. att.). Kvercetinā iekaisuma modelī paaugstināja NO produkciju 1,6 reizes ( $2193,00 \pm 471,60$  ng/g audu,  $n=14$ ,  $p < 0,001$ ), veselajos dzīvniekos pēc kvercetīna ievades parādījās tendence paaugstināties slāpekļa oksīda līmenim aknās ( $93,23 \pm 16,39$  ng/g audu,  $n=12$ ) ( $F(3;127) = 51,75$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.11. att.). Indol-3-karbinols savukārt kontroles grupās uzrādīja tendenci samazināt slāpekļa oksīda produkciju līdz  $48,21 \pm 6,35$  ng/g audu,  $n=18$ , bet iekaisuma apstākļos tomēr parādījās slāpekļa oksīdu paaugstināšanas īpašības -  $1793,00 \pm 194,60$  ng/g audu,  $n=12$ ,  $p < 0,01$  ( $F(3;131) = 105,20$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.11. att.).



**3.11.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku aknās pēc A. resveratrola, B. ellagskābes, C kvercetīna, D indol-3-karbnola p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 57 līdz 9. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko ± S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar Newman-Keuls pēctestu.**

Sirdī slāpekļa oksīda koncentrācija kontroles grupā ir ļoti zema, salīdzinot ar citiem audiem, tā sastāda  $2,48 \pm 0,80$  ng/g audu,  $n=56$ , bet LPS inducētā iekaisuma gadījumā tā pieaug 108 reizes līdz  $268,70 \pm 20,21$  ng/g audu,  $n=51$ , sasniedzot statistiskās ticamības sliekšni, kur  $p < 0,0001$ . Resveratrols veselajos dzīvniekos NO līmeni paaugstināja nenozīmīgi -  $3,40 \pm 1,40$  ng/g audu,  $n=9$ , bet iekaisuma apstākļos slāpekļa oksīda produkcija pieauga gandrīz divas reizes ( $507,30 \pm 96,17$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$ ), salīdzinot ar LPS modeļa grupu ( $F(3;121)=77,35$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.12. att.). Ellagskābe uzrādīja līdzīgu tendenci kontroles dzīvniekos ( $2,51 \pm 1,28$  ng/g audu,  $n=8$ ), bet LPS modeļa dzīvniekos slāpekļa oksīda koncentrācija paaugstinājās līdz

372,6±70,32 ng/g audu, n=10, p<0,01 (F(3;121)=70,31, p<0,0001) (sk. 3.12. att.). Indol-3-karbinols ar tendencēm neatšķīrās no iepriekš apskatītajām vielām, kontroles grupā NO<sup>·</sup> produkciju neietekmēja (3,48±1,93 ng/g audu, n=9), un iekaisuma modeļa grupa paaugstināja NO<sup>·</sup> koncentrāciju līdz 358,70±35,40 ng/g audu, n=12, p<0,01 (F(3;124)=90,37, p<0,0001) (sk. 3.12. att.). Interesanta viela ir baikaleīns, tās klātbūtnē slāpekļa oksīda signāls netika sirds muskulī detektēts (0,00±0,00 ng/g audu, n=6) un audos ar LPS inducētu iekaisumu samazināja to līdz 121,3±32,09 ng/g audu, n=3, p<0,05 (F(3;112)=70,63, p<0,0001) (sk. 3.12. att.).

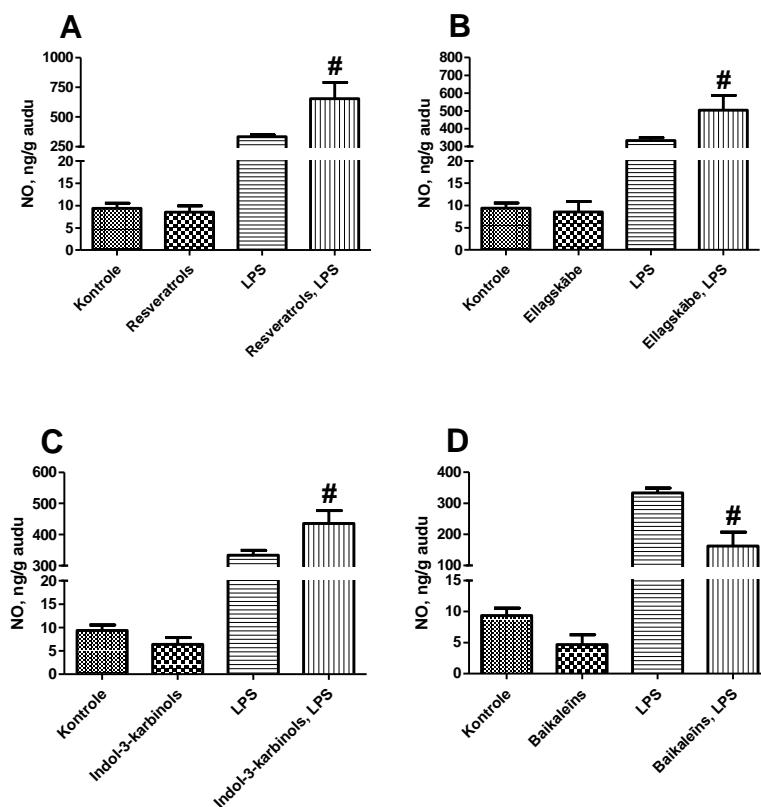


**3.12.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku sirdī pēc A. resveratrola, B. ellagskābes, C. indol-3-karbinola, D. baikaleīna p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 57 līdz 9. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko ± S.E.M. \*p<0,05 pret kontroles grupu, #p<0,05 pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar Newman-Keuls pēctestu.**

Nierēs slāpekļa oksīda koncentrācija kontroles grupās bija 9,37±1,18 ng/g audu, n=46, bet iekaisuma modelī 35,5 reizes augstāka - 333,50±16,10 ng/g audu,



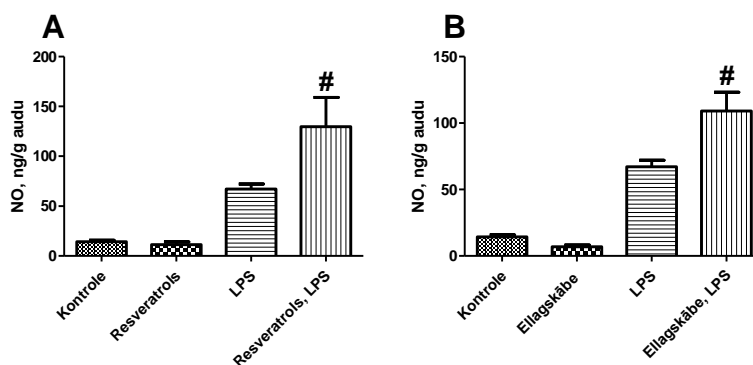
n=41, pielietojot statistiskai analīzei neparā t- testu, konstatējām statistisku atšķirību, kur  $p < 0,0001$ . Nierēs resveratrols kontroles dzīvniekos neuzrādīja NO produkciju ietekmējošu aktivitāti,  $8,51 \pm 1,46$  ng/g audu, n=9, bet iekaisuma modelī paaugstināja to līdz  $653,80 \pm 137,80$  ng/g audu, n=9,  $p < 0,001$  ( $F(3;101)=85,83$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.13. att.). Ellagskābe veselajos dzīvniekos slāpekļa oksīda produkciju neietekmēja ( $8,51 \pm 2,40$  ng/g audu, n=8), savukārt LPS izsuktā iekaisuma apstākļos paaugstināja NO koncentrāciju līdz  $505,00 \pm 81,74$  ng/g audu, n=10,  $p < 0,001$  ( $F(3;101)=117,60$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.13. att.). Indol-3- karbinols uzrādīja tendenci samazināt slāpekļa oksīda daudzumu kontroles dzīvniekos ( $6,40 \pm 1,42$  ng/g audu, n=9). Iekaisuma gadījumā tas izraisīja slāpekļa oksīda koncentrācijas pieaugumu līdz  $435,70 \pm 41,95$  ng/g audu, n=12,  $p < 0,001$  ( $F(3;104)=176,50$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.13. att.). Savukārt baikaleīns gan kontroles dzīvniekos ( $4,68 \pm 1,57$ , ng/g audu, n=6), gan iekaisuma modelī ( $162,30 \pm 44,91$  ng/g audu, n=3,  $p < 0,001$ ) parādīja spēju samazināt slāpekļa oksīda koncentrāciju nierēs audos ( $F(3;92)=177,90$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.13. att.).

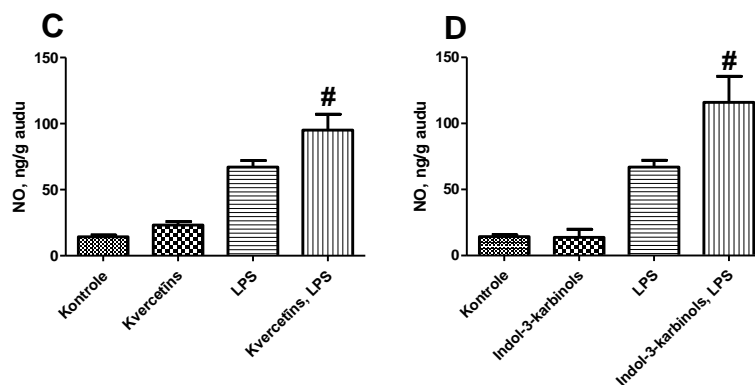


3.13.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku nierēs pēc A. resveratrola, B. ellagskābes, C. indol-3-karbnola, D. baikaleīna p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki

grupās variē no 46 līdz 3. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

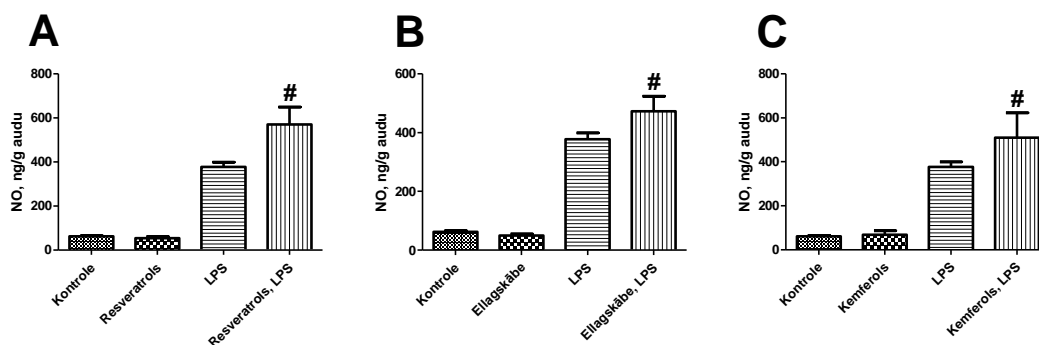
Sēkliniekos veselajās žurkās slāpekļa oksīda produkcija bija  $14,26 \pm 1,48$  ng/g audu,  $n=40$ , bet iekaisuma apstākļos tā auga līdz  $67,02 \pm 5,04$  ng/g audu,  $n=42$ . Analizējot šos datus ar nepāra t-testu, ieguvām statistiski ticamu starpību, kur  $p < 0,0001$ . Resveratrola klātbūtne NO koncentrāciju audos kontroles grupās neietekmēja ( $11,49 \pm 2,53$  ng/g audu,  $n=7$ ), bet iekaisuma gadījumā slāpekļa oksīda līmenis pieauga gandrīz divkārtīgi līdz  $129,70 \pm 29,24$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;94)=37,40$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.14. att.). Ellagskābe uzrādīja tendenci samazināt slāpekļa oksīda koncentrāciju kontroles grupā ( $6,83 \pm 1,41$  ng/g audu,  $n=7$ ), bet iekaisuma apstākļos paaugstināja to līdz  $109,10 \pm 14,10$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;94)=53,65$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.14. att.). Veselo dzīvnieku sēkliniekos kvercetinā nedaudz paaugstināja slāpekļa oksīda produkciju ( $23,13 \pm 2,63$  ng/g audu,  $n=4$ ), nesasniedzot statistiskās ticamības sliekšni, bet LPS modelī NO pieauga līdz  $95,00 \pm 12,08$  ng/g audu  $n=5$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;87)=41,86$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.14. att.). Indol-3-karbinols uzrādīja tādas pašas slāpekļa oksīda paaugstināšanas īpašības LPS iekaisuma gadījumā kā augstāk apskatītās vielas ( $116 \pm 19,55$  ng/g audu,  $n=11$ ,  $p < 0,001$ ). Kontroles grupā seklinieku audos indol-3-karbinola ietekmē NO koncentrācija nemainījās ( $13,71 \pm 6,26$  ng/g audu,  $n=8$ ) ( $F(3;97)=42,86$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.14. att.).





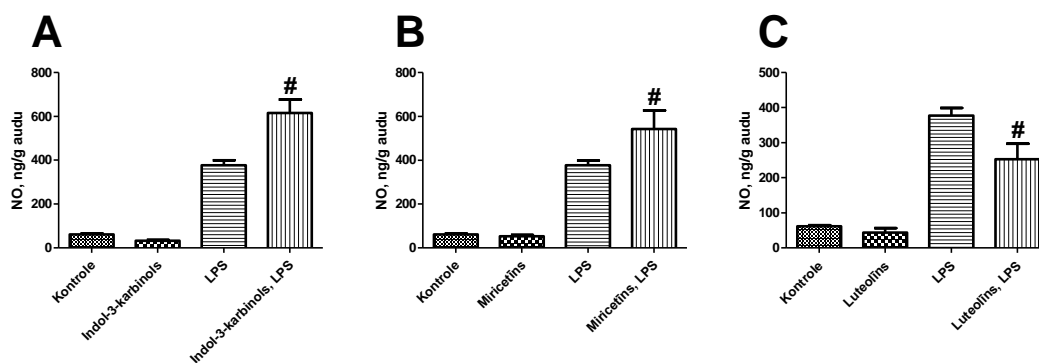
**3.14.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku sēkliniekos pēc A. resveratrola, B. ellagskābes, C. kvercētīna, D. indol-3-karbinola p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 42 līdz 4. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, <sup>#</sup> $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar Newman-Keuls pēctestu.**

Veselo žurku asinīs slāpekļa oksīda koncentrācija bija  $61,87 \pm 3,20$  ng/g audu,  $n=52$ , bet LPS inducētā iekaisuma apstākļos tā pieauga līdz  $377,00 \pm 21,74$  ng/g audu,  $n=54$ , salīdzinot datus ar nepāra t- testu, tika sasniegta statistiska ticamība, kur  $p < 0,0001$ . Resveratrols kontroles dzīvniekos NO koncentrācijas līmeni neietekmēja ( $53,48 \pm 7,62$  ng/g audu,  $n=9$ ), bet iekaisuma apstākļos paaugstināja to līdz  $569,60 \pm 79,33$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;120)=86,14$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.15. att.). Ellagskābe uzrādīja līdzīgas tendences kontroles grupā ( $49,73 \pm 5,68$  ng/g audu,  $n=8$ ) un LPS inducētā iekaisuma apstākļos ( $472,40 \pm 51,55$  ng/g audu,  $n=10$ ,  $p < 0,05$ ) ( $F(3;120)=86,11$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.15. att.). Kemferols iekaisuma modelī paaugstināja slāpekļa oksīda koncentrāciju asinīs līdz  $509,70 \pm 112,50$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ , bet kontroles grupās NO līmeni būtiski neietekmēja ( $68,02 \pm 19,19$  ng/g audu,  $n=5$ ) ( $F(3;113)=69,12$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.15. att.).



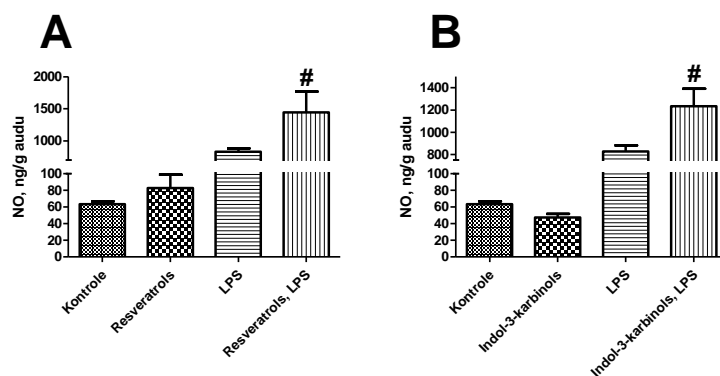
3.15.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku asinīs pēc A. resveratrola, B. ellagskābes, C. kemferola p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 54 līdz 5. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, <sup>#</sup> $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēttestu.

Indol-3-karbinols uzrāda tendenci samazināt NO<sup>•</sup> koncentrāciju asinīs kontroles dzīvniekiem ( $32,34 \pm 3,69$  ng/g audu,  $n=9$ ), bet paaugstina to līdz  $615,10 \pm 61,44$  ng/g audu,  $n=12$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;123)=103,40$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.16. att.). Miricetīns uzrāda NO<sup>•</sup> paaugstinošās īpašības NO<sup>•</sup> koncentrācija netiek ietekmēta. LPS iekaisuma modeļa grupā līdz  $542,80 \pm 84,40$  ng/g audu,  $n=10$ ,  $p < 0,01$ , bet kontroles grupā ( $F(3;116)=87,68$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.16. att.). Luteolīns, savukārt, samazināja NO<sup>•</sup> koncentrāciju LPS inducētā iekaisuma gadījumā līdz  $253,30 \pm 43,63$  ng/g audu,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ , bet kontroles dzīvniekos gandrīz neietekmēja slāpekļa oksīda produkciju ( $43,88 \pm 13,01$  ng/g audu,  $n=5$ ) ( $F(3;111)=73,52$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.16. att.).



**3.16.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku asinīs pēc A. indol-3-karbinola, B. miricetīna, C. luteolīna p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī.** Dzīvnieki grupās variē no 54 līdz 4. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

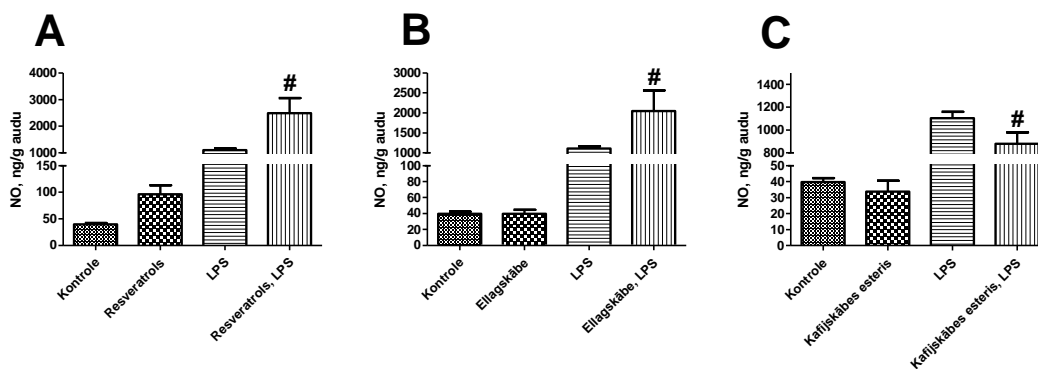
Plaušās slāpekļa oksīda produkcija sastādīja  $63,52 \pm 3,16$  ng/g audu,  $n=50$  veselajos dzīvniekos, bet iekaisuma gadījumā NO koncentrācija auga 13 reizes ( $829,60 \pm 53,52$  ng/g audu,  $n=56$ ) un, izvērtējot datus ar nepāra t-testu,  $p$  bija mazāks par 0,0001. Resveratrols plaušu audos iekaisuma apstākļos paaugstināja slāpekļa oksīda produkciju līdz  $1445,00 \pm 324,50$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$ , bet veselajos dzīvniekos tā produkciju gandrīz neietekmēja ( $82,73 \pm 15,85$  ng/g audu,  $n=9$ ) ( $F(3;120) = 61,26$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.17. att.). Indol-3-karbinols uzrādīja tendenci samazināt NO produkciju kontroles grupā ( $47,39 \pm 4,21$  ng/g audu,  $n=8$ ) un būtiski paaugstināja tā produkciju iekaisuma modelī ( $1234,00 \pm 157,30$  ng/g audu,  $n=12$ ,  $p < 0,001$ ) ( $F(3;122) = 79,52$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.17. att.).



**3.17.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku plaušās pēc A. resveratrola, B. indol-3-karbinola p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī.** Dzīvnieki grupās variē no 56 līdz 8. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

Liesā slāpekļa oksīda produkcija veseliem dzīvniekiem bija  $39,79 \pm 2,48$  ng/g audu,  $n=3$ , bet iekaisuma modelī -  $1104 \pm 56,81$  ng/g audu,  $n=29$ , izanalizējot datus ar

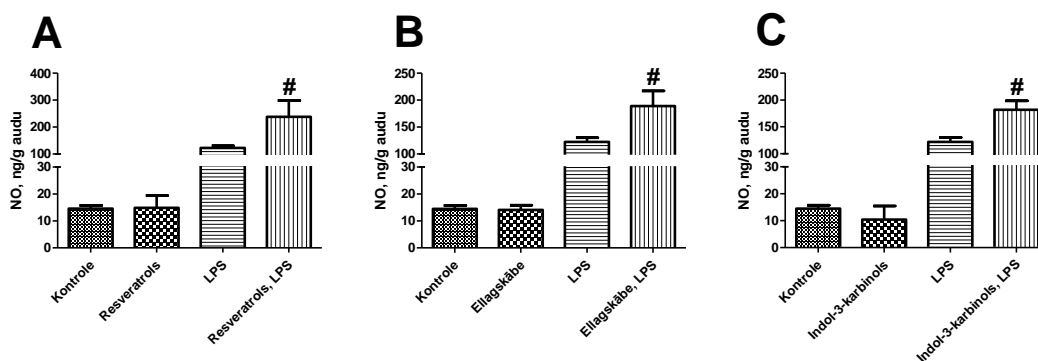
nepāra t- testu, ieguvām starpību, kur  $p < 0,0001$ . Resveratrols veselo dzīvnieku liesā paaugstināja slāpekļa oksīda produkciju, bet statistiskās ticamības robežu tā nesasniedza,  $96,35 \pm 16,76$  ng/g audu,  $n=6$ , savukārt iekaisuma modelī liesā NO koncentrācija resveratrola klātbūtnē pieauga līdz  $2488,00 \pm 575,90$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;73)=45,89$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.18. att.). Ellagskābe neuzrādīja NO paaugstinošas īpašības veselajos dzīvniekos ( $39,55 \pm 5,12$  ng/g audu,  $n=8$ ), bet iekaisuma gadījumā paaugstināja tā koncentrāciju liesas audos līdz  $2046,00 \pm 515,30$  ng/g audu,  $n=10$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;76)=38,85$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.18. att.). Savukārt kafijskābes esteri arī šajā orgānā uzrādīja slāpekļa oksīda pazeminošu darbību LPS iekaisuma modelī ( $880,20 \pm 98,09$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ), bet kontroles grupā tikai samazinošu tendenci ( $33,70 \pm 7,01$  ng/g audu,  $n=7$ ) ( $F(3;70)=157,4$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.18. att.).



**3.18.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku liesā pēc A. resveratrola, B. ellagskābes, C. kafijskābes estera p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī.** Dzīvnieki grupās variē no 33 līdz 6. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

Šķērsvītrotajā muskulatūrā kontroles dzīvnieku grupā slāpekļa oksīda produkcija bija  $14,52 \pm 1,22$  ng/g audu,  $n=39$  un iekaisuma modeļa grupā -  $122,30 \pm 8,16$  ng/g audu,  $n=43$ ,  $p < 0,0001$ , analizējot ar nepāra t- testu. Kontroles dzīvniekos resveratrols neuzrādīja NO paaugstinošās īpašības ( $14,89 \pm 4,54$  ng/g audu,  $n=8$ ), bet iekaisuma modelī arī šķērsvītrotajā muskulatūrā slāpekļa oksīda koncentrācija būtiski paaugstinājās līdz  $238,30 \pm 60,01$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p < 0,001$

( $F(3;95)=41,64$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.19. att.). Ellagskābes aktivitāte šķērsvītrotajā muskulatūrā kontroles grupā ( $14,11\pm 1,74$  ng/g audu,  $n=8$ ) un iekaisuma modeļa grupā ( $189,00\pm 28,05$  ng/g audu,  $n=9$ ,  $p<0,001$ ) ( $F(3;95)=68,02$ ,  $p<0,0001$ ) bija līdzīga resveratrola aktivitātei (sk. 3.19. att.). Indol-3-karbinols kontroles dzīvniekos uzrādīja tendenci samazināt NO līmeni ( $10,39\pm 5,06$  ng/g audu,  $n=9$ ), bet iekaisuma modelī paaugstināja par gandrīz 50% līdz  $181,90\pm 16,70$  ng/g audu,  $n=12$ ,  $p<0,001$  ( $F(3;99)=84,44$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.19. att.).



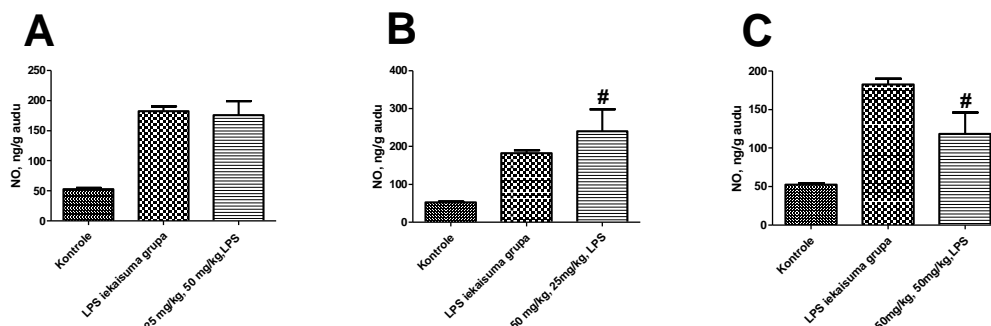
**3.19.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku šķērsvītrotajā muskulatūrā pēc A. resveratrola, B. ellagskābes, C. indol- 3- karbinola p/o ievades koncentrācijā 50 mg/kg veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 43 līdz 5. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p<0,05$  pret kontroles grupu, # $p<0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.**

Slāpekļa oksīda koncentrāciju svārstības LPS modelī tika analizētas vairāku dabas vielu kombināciju klātbūtnē.

Indol-3-karbinola un kvercetinā kombinācija tika modelēta dažādās vielu koncentrāciju attiecībās, indol-3-karbinols 25 mg/kg un kvercetīns 50 mg/kg, indol-3-karbinols 50 mg/kg un kvercetīns 25 mg/kg, indol-3-karbinols 50 mg/kg un kvercetīns 50 mg/kg.

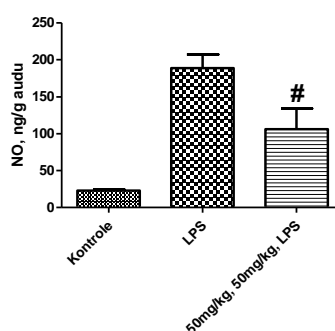
Smadzeņu garozas audos indol-3-karbinola 25 mg/kg un kvercetinā 50 mg/kg kombinācija LPS modeļa grupā neuzrādīja NO ietekmējošu efektu ( $175,80\pm 23,32$  ng/g audu,  $n=6$ ) ( $F(2;68)=137,20$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.20. att.). Koncentrācijā, kur bija 50mg/kg indol-3-karbinola un 25 mg/kg kvercetinā, slāpekļa oksīda līmenis LPS modelī pieauga līdz  $240\pm 57,88$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p<0,001$  ( $F(2;68)=78,30$ ,  $p<0,0001$ )

(sk. 3.20. att.). Savukārt vielu kombinācija, kur abas vielas saturēja 50 mg/kg, samazināja slāpekļa oksīda produkciju LPS iekaisuma grupā līdz  $118,50 \pm 27,61$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p<0,001$  ( $F(2;70)=96,16$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.20. att.).



**3.20.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku smadzeņu garozas audos pēc indol-3-karbinola un kvercetīna kombinācijas ievades A. 25 mg/kg+50 mg/kg, B. 50 mg/kg+25 mg/kg, C. 50 mg/kg+50 mg/kg devu, attiecīgi, p/o ievades veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 35 līdz 6. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. # $p<0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.**

Smadzenītēs tikai indol-3-karbinola un kvercetīna 50 mg/kg un 50 mg/kg, attiecīgi, kombinācija uzrādīja vērā ņemamu efektu un samazināja NO koncentrāciju LPS modelī līdz  $106,10 \pm 27,92$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p<0,01$  ( $F(2;49)=39,67$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.21. att.).

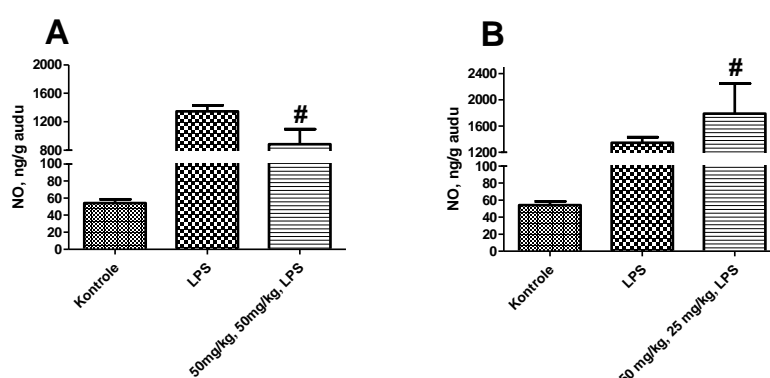


**3.21.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku smadzenītēs pēc indol-3-karbinola un kvercetīna kombinācijas ievades 50 mg/kg+50 mg/kg devas, attiecīgi, p/o ievades veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki**



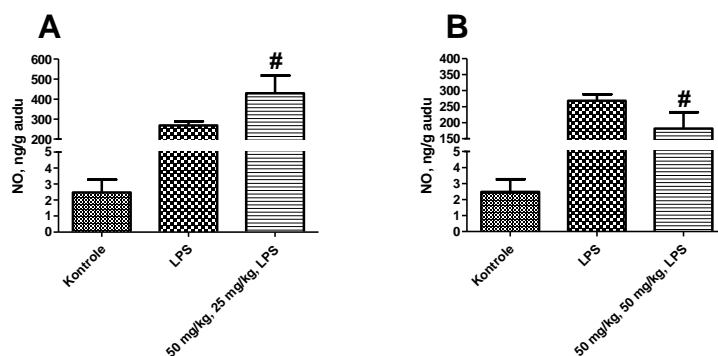
grupās variē no 23 līdz 6. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. <sup>#</sup> $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

Aknās indol-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 25 mg/kg uzrādīja slāpekļa oksīda līmeni paaugstinošas īpašības ( $1792,00 \pm 458,20$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ), salīdzinot ar LPS iekaisuma modeļa grupu ( $F(2;108)=94,20$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.22. att.). Savukārt kombinācija 50 mg/kg indol-3-karbinola un 50 mg/kg kvercetīna samazināja aknās slāpekļa oksīda līmeni līdz  $882,40 \pm 215,50$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p < 0,05$  ( $F(2;110)=97,01$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.22. att.).



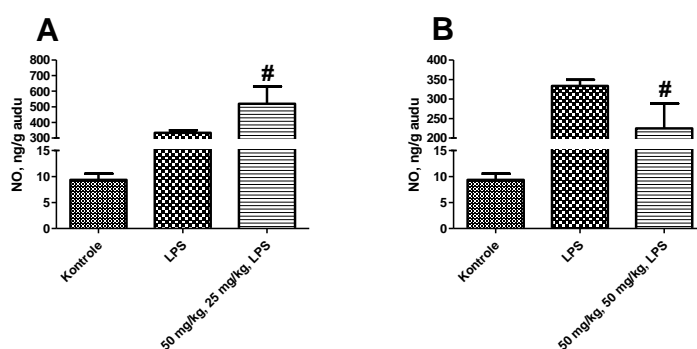
**3.22.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku aknās pēc indol-3-karbinola un kvercetīna kombinācijas ievades A. 50 mg/kg+25 mg/kg, B. 50 mg/kg+50 mg/kg devu, attiecīgi, p/o ievades veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 57 līdz 6. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. <sup>#</sup> $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.**

Sirdī var novērot līdzīgu ainu kā aknās, indol-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 25 mg/kg kombinācija paaugstina slāpekļa oksīda koncentrāciju sirdī par 60% līdz  $429,30 \pm 89,11$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p < 0,05$ , salīdzinot ar LPS grupu ( $F(2;110)=103,10$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.23. att.). Kombinācija, kura sastāvēja no indol-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 50 mg/kg, samazināja NO produkciju sirdī līdz  $181,10 \pm 51,96$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p < 0,05$  ( $F(2;112)=2;112$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.23. att.).



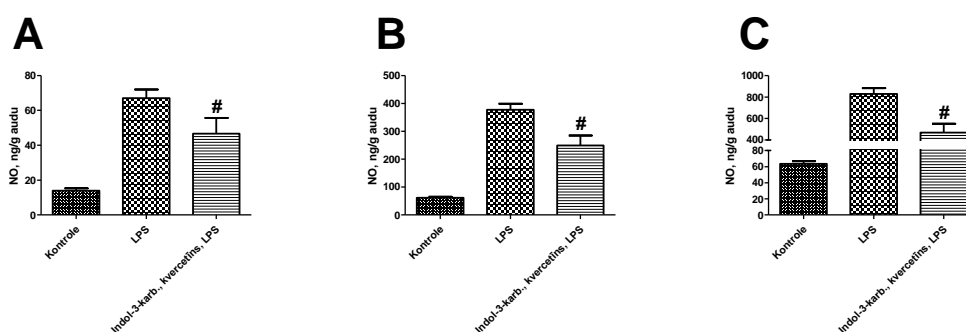
**3.23.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku sirdī pēc indol- 3-karbinola un kvercetīna ievades A. 50 mg/kg+25 mg/kg, B. 50 mg/kg+50 mg/kg devu, attiecīgi, p/o ievades koncentrācijā veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 56 līdz 6. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. <sup>#</sup> $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.**

Nierēs indol-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 25 mg/kg kombinācija izsauc NO koncentrācijas pieaugumu (519,50 $\pm$ 111,60 ng/g audu, n=6,  $p < 0,001$ ) ( $F(2;90)=168,10$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.24. att.), bet 50 mg/kg indol-3-karbinola un 50 mg/kg kvercetīna stimulē slāpekļa oksīda produkcijas samazināšanos (224,60 $\pm$ 63,35 ng/g audu, n=8,  $p < 0,01$ ) ( $F(2;92)=162,60$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.24. att.).



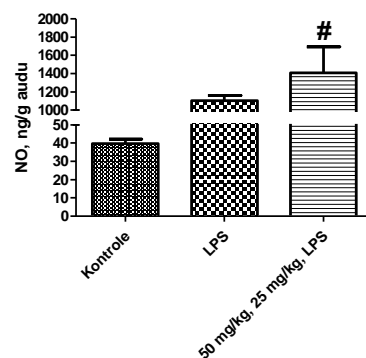
**3.24.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku nierēs pēc indol- 3-karbinola un kvercetīna kombinācijas ievades A. 50 mg/kg+25 mg/kg, B. 50 mg/kg+50 mg/kg devu, attiecīgi, p/o ievades veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 46 līdz 6. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. <sup>#</sup> $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.**

Slāpekļa oksīda koncentrācijas sēkliniekos statistiski ticami ietekmēja tikai indola-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 50 mg/kg kombinācija, samazinot NO līmeni līdz  $46,71 \pm 9,05$  ng/g audu,  $n=7$ ,  $p<0,05$  pret LPS modeļa grupu ( $F(2;87)=50,35$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.25. att.). Asinīs indol-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 50 mg/kg kombinācija samazina NO līmeni līdz  $249,30 \pm 36,54$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p<0,01$  ( $F(2;111)=100,80$ ,  $p<0,0001$ ) salīdzinot ar LPS iekaisuma grupu (sk. 3.25. att.). Plaušās indola-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 50 mg/kg kombinācija statistiski ticami samazināja slāpekļa oksīda produkciju līdz  $468,60 \pm 83,60$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p<0,01$  ( $F(2;111)=93,13$ ,  $p<0,0001$ ), salīdzinot ar LPS grupu (sk. 3.25. att.).



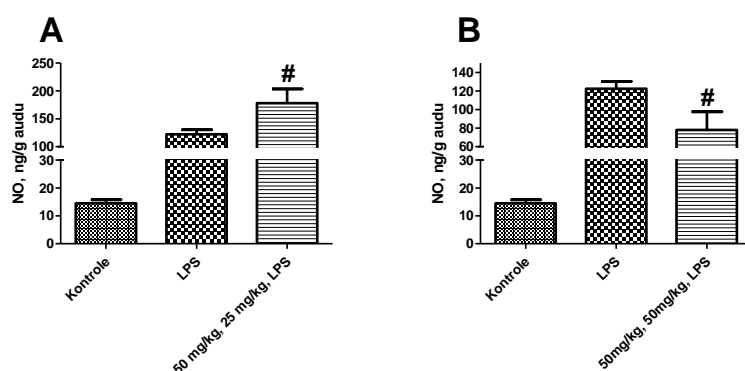
**3.25.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku A. sēkliniekos, B. asinīs un C. plaušās pēc indol-3-karbinola un kvercetīna kombinācijas ievades 50 mg/kg+50 mg/kg, p/o ievades koncentrācijā veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 56 līdz 7. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. <sup>#</sup> $p<0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.**

Liesā slāpekļa oksīda koncentrāciju ietekmē indol-3-karbinola 50 mg/kg un kvercetīna 25 mg/kg koncentrāciju kombinācija, tā paaugstina NO produkciju līdz  $1410,00 \pm 285,20$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p<0,05$  ( $F(2;65)=138,80$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.26. att.).



3.26.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku liesā pēc indol-3-karbinola un kvercetīna kombinācijas ievades 50 mg/kg+25 mg/kg, attiecīgi, p/o ievades koncentrācijā veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 33 līdz 6. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. # $p < 0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

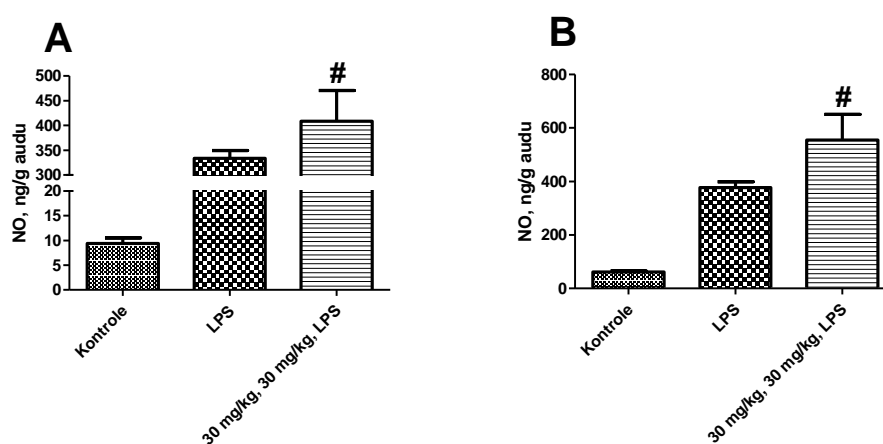
Šķērsvītrotajā muskulatūrā indol-3-karbinols koncentrācijā 50 mg/kg un kvercetīns koncentrācijā 25 mg/kg kopā stimulēja slāpekļa oksīda produkciju, kas pārsniedza NO koncentrāciju LPS modeļa grupā par 46%, sasniedzot  $178,00 \pm 25,64$  ng/g audu,  $n=6$ ,  $p < 0,01$  ( $F(2;85)=90,15$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.27. att.), bet kombinācijā, kur indol-3-karbinols ir 50 mg/kg un kvercetīns arī ir 50 mg/kg, tika panākta NO koncentrācijas samazināšanās līdz  $77,88 \pm 19,69$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p < 0,01$  ( $F(2;87)=71,81$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.27. att.).



3.27.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku šķērsvītrotajā muskulatūrā pēc indol-3-karbinola un kvercetīna kombinācijas ievades A. 50 mg/kg+25 mg/kg, B. 50 mg/kg+50 mg/kg devu, attiecīgi, p/o ievades veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī. Dzīvnieki grupās variē no 43 līdz 6. Rezultāti

ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M.  $^{\#}p<0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

Luteolīns 30 mg/kg un baikaleīns 30 mg/kg bija vēl viena vielu kombinācija tika testētā LPS iekaisuma modelī dažādos audos. Nierēs kombinācija uzrādīja statistiski ticamu slāpekļa oksīda koncentrācijas pieaugumu līdz  $408,60\pm 62,53$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p<0,05$  ( $F(2;92)=193,70$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.28. att.). Asinīs slāpekļa oksīda līmenis pēc kombinācijas ievades LPS modeļa grupā paaugstinājās līdz  $555,00\pm 95,82$  ng/g audu,  $n=8$ ,  $p<0,001$  ( $F(2;111)=101,30$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.28. att.).



**3.28.att. Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas žurku orgānos pēc luteolīna 30 mg/kg un baikaleīna 30 mg/kg kombinācijas ievades A. nierēs, B. asinīs p/o veselajos dzīvniekos un LPS iekaisuma modelī.** Dzīvnieki grupās no 8 līdz 54. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M.  $^{\#}p<0,05$  pret LPS iekaisuma grupu, pēc vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu.

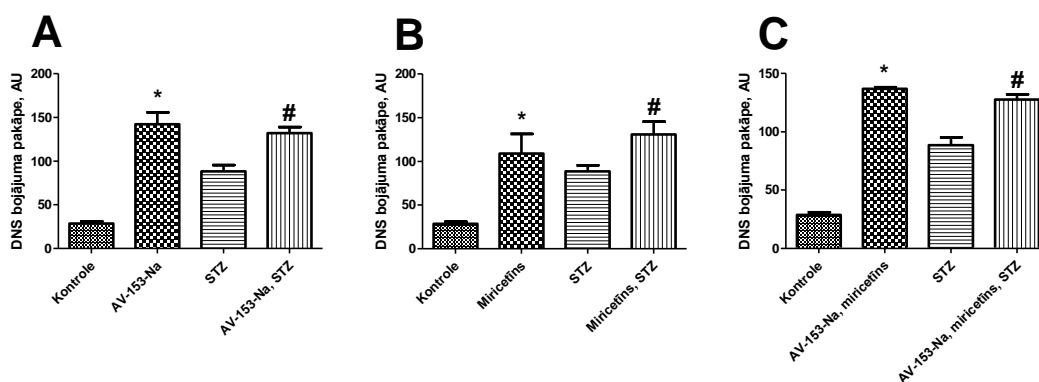
### **3.2. DNS vienpavediena pārrāvumu, oksidatīvā un nitrozatīvā stresa korekcija ar 1,4-DHP un flavonolu, miricetīnu STZ stimulētā 1TCD apstākļos**

#### **3.2.1. Vienpavediena DNS pārrāvumu analīze ar vienas šūnas elektroforēzes metodi žurku streptozotocīna 1. tipa cukura diabēta modelī dažādu 1,4-DHP klātbūtnē**

Izvērtējot DNS vienpavediena bojājumus veselajiem dzīvniekiem ( $28,82\pm 2,11$  AU,  $n=17$ ) un dzīvniekiem ar streptozotocīna ierosināto 1TCD ( $88,43\pm 6,93$  AU,

n=14) ar nepāra t-testu, konstatējām bojājumu līmeņa trīskārtēju palielinājumu ar statistiski ticamu starpību  $p < 0,0001$ .

AV-153-Na statistiski ticami paaugstināja DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni gan veselīem dzīvniekiem:  $142,00 \pm 13,70$  AU,  $n=4$ ,  $p < 0,001$  ( $F(3;39)=71,67$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.29. att.), gan STZ izraisītā cukura diabēta apstākļos:  $131,90 \pm 6,98$  AU,  $n=8$ ,  $p < 0,001$ . Miricetīns arī statistiski ticami paaugstina DNS pārrāvumu līmeni gan veselīem dzīvniekiem ( $109,10 \pm 22,35$  AU,  $n=5$ ,  $p < 0,001$ ), gan cukura diabēta apstākļos:  $130,90 \pm 14,52$  AU,  $n=6$ ,  $p < 0,01$  ( $F(3;38)=30,47$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.29. att.). Arī abu vielu kombinācija šo efektu atkārtō:  $136,80 \pm 1,45$  AU,  $n=4$ ,  $p < 0,001$  kontroles dzīvniekiem un  $127,60 \pm 4,46$  AU,  $n=8$ ,  $p < 0,001$  cukura diabēta modeļa dzīvniekiem ( $F(3;39)=89,17$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.29. att.).

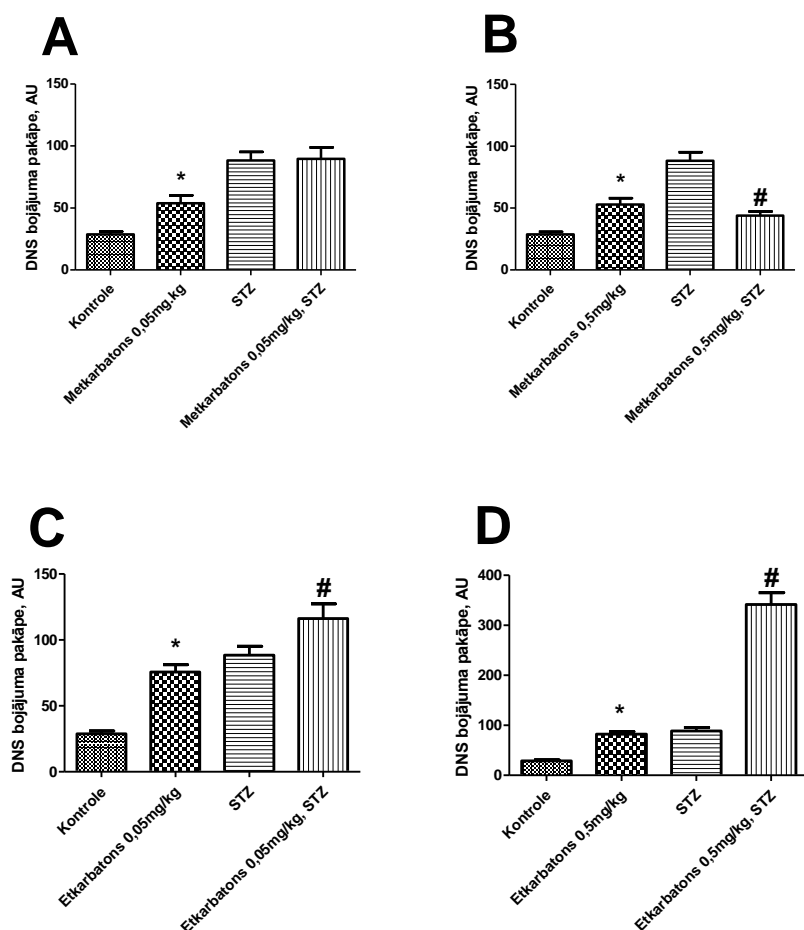


**3.29.att. DNS vienpavediena pārrāvumu analīze perifēro venozo asiņu šūnu kodolos pēc A. AV-153-Na (0,5 mg/kg), B. miricetīna (50 mg/kg), C AV-153-Na (0,5 mg/kg) un miricetīna (50 mg/kg) kombinācija p/o ievades.** Grupās ir no 4 līdz 17 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  statistiski ticami pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  statistiski ticami pret STZ grupu (vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu).

Metkarbatons (0,05 mg/kg) veselīem dzīvniekiem statistiski ticami paaugstināja DNS pārrāvumu līmeni:  $53,75 \pm 6,32$  AU  $n=4$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;39)=30,08$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.30. att.), bet cukura diabēta apstākļos to neietekmēja ( $89,63 \pm 9,11$  AU,  $n=8$ ) salīdzinot ar STZ grupu. Metkarbatons lielākā koncentrācijā (0,5 mg/kg) veselīem dzīvniekiem arī statistiski ticami paaugstināja DNS pārrāvumu līmeni ( $53,00 \pm 5,08$ , AU,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ ). Savukārt STZ modelī metkarbatons (0,5 mg/kg)

statistiski ticami samazināja DNS pārrāvumu līmeni, salīdzinot ar STZ kontroles grupu:  $43,88 \pm 3,39$ , AU,  $n=8$ ,  $p<0,001$  ( $F(3;39)=33,60$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.30. att.).

Etkarbatona (0,05 mg/kg) ievade statistiski ticami paaugstināja DNS pārrāvumu līmeni gan veseliem dzīvniekiem ( $75,67 \pm 5,55$  AU,  $n=3$ ,  $p<0,001$ ), gan STZ modelī:  $116,10 \pm 11,18$  AU,  $n=7$ ,  $p<0,01$  ( $F(3;37)=38,75$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.30. att.). Arī etkarbatona ievade lielākā devā (0,5mg/kg) statistiski ticami paaugstināja DNS pārrāvumu līmeni gan veseliem dzīvniekiem ( $82,25 \pm 4,91$  AU,  $n=4$ ,  $p<0,01$ ), gan STZ modeļa dzīvniekiem, kur bojājumu skaits palielinājās 3,8 reizes, salīdzinot ar STZ kontroles grupu:  $341,4 \pm 23,96$  AU,  $n=8$ ,  $p<0,001$  ( $F(3;39)=168,7$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.30. att.).

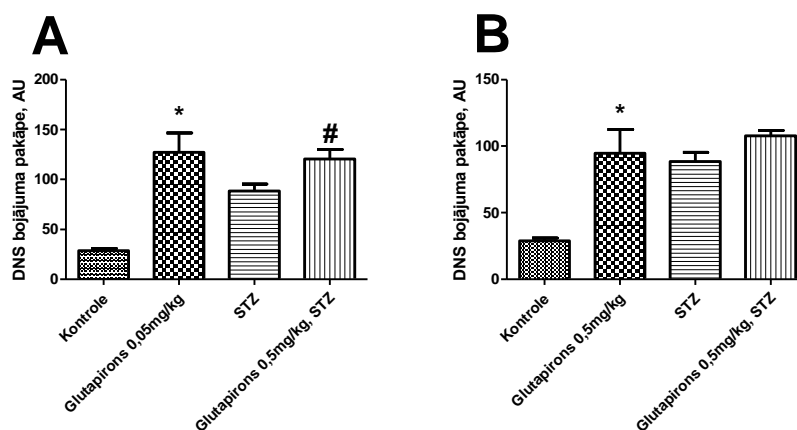


3.30.att. DNS vienpavediena pārrāvumu analīze perifēro venozo asiņu šūnu kodolos pēc A. metkarbatona 0,5 mg/kg un B. 0,05 mg/kg, C. etkarbatona 0,5 mg/kg un D. 0,05 mg/kg p/o ievades. Grupās ir no 3 līdz 17 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  S.E.M. \* $p<0,05$  statistiski ticami pret kontroles

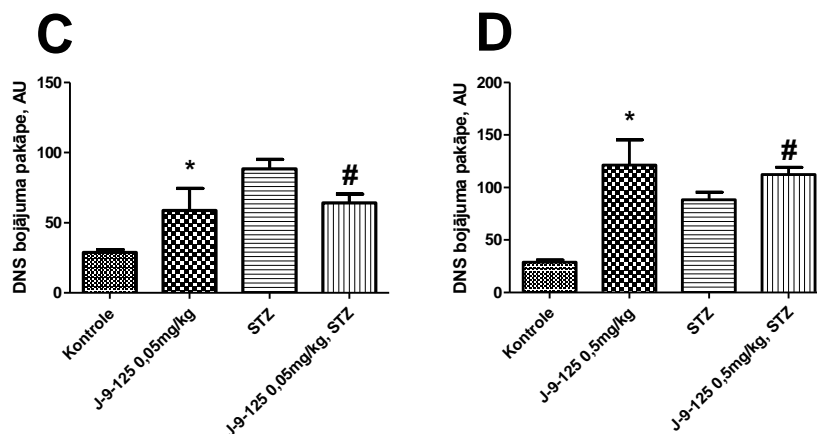
grupu, # $p < 0,05$  statistiski ticami pret STZ grupu (vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu).

Glutapirons (0,05 mg/kg) paaugstināja DNS pārrāvumu līmeni veselajos dzīvniekos līdz pat  $127,82 \pm 2,11$  AU,  $n=4$ ,  $p < 0,001$ , bet STZ modelī līdz  $120,4 \pm 9,70$  AU,  $n=7$ ,  $p < 0,01$  ( $F(3;38)=43,79$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.31. att.). Savukārt vielas ievade koncentrācijā 0,5 mg/kg veselajos dzīvniekos izsauc vairāk kā trīskārtīgu DNS pārrāvumu līmeņa paaugstinājumu ( $94,50 \pm 17,90$  AU,  $n=4$ ,  $p < 0,001$ ), bet STZ modelī, statistiski ticamu pieaugumu salīdzinot ar STZ modeļa grupu nekonstatējām,  $107,6 \pm 4,36$  AU,  $n=8$  ( $F(3;39)=41,36$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.31. att.).

J-9-125 (0,05 mg/kg) kontroles dzīvniekos paaugstināja DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni līdz  $58,67 \pm 15,90$  AU,  $n=3$ ,  $p < 0,05$ , bet slimos dzīvniekos šī koncentrācija samazināja DNS pārrāvumu līmeni, salīdzinot ar STZ modeļa grupu:  $64,17 \pm 6,93$  AU,  $n=6$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;36)=26,13$ ,  $p < 0,0001$ ) (sk. 3.31. att.). Paaugstinot J-9-125 koncentrāciju desmit reizes, viela uzrādīja DNS pārrāvumus paaugstinošas pastiprinošas īpašības, gan veselajos ( $121,30 \pm 24,02$  AU,  $n=4$ ,  $p < 0,0001$ ), gan slimajos dzīvniekos:  $112,20 \pm 7,19$  AU,  $n=5$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;36)=35,57$ ,  $p < 0,0007$ ) (sk. 3.31. att.).





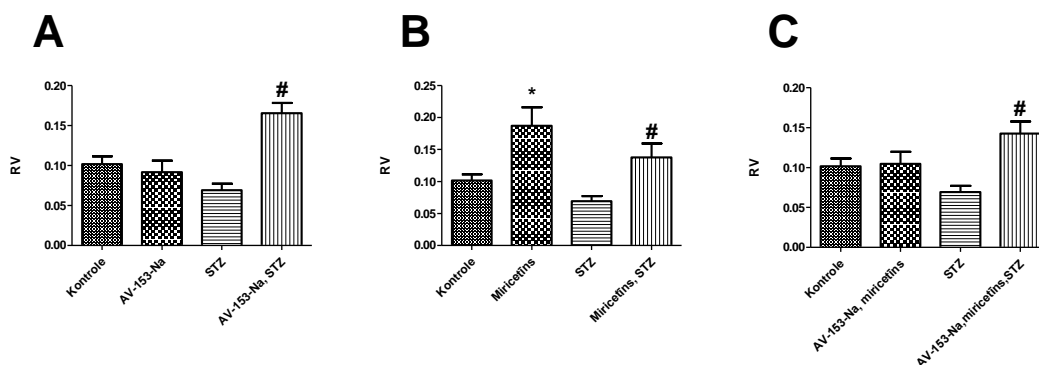


**3.31.att. DNS vienpavediena pārrāvumu analīze perifēro venozo asiņu šūnu kodolos pēc A. glutapirona 0,05 mg/kg un B. 0,5 mg/kg, C. J-9-125 0,05 mg/kg un D. 0,5 mg/kg p/o ievades.** Grupās ir no 3 līdz 17 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  statistiski ticami pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  statistiski ticami pret STZ grupu (vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēttestu).

### **3.2.2. Endoteliālas slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku nierēs streptozotocīna 1TCD modelī 1,4-DHP klātbūtnē**

eNOS gēna ekspresija veselos dzīvniekos ( $0,10 \pm 0,01$  RV,  $n=11$ ) par 30% pārsniedza eNOS gēna ekspresiju streptozotocīna inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī ( $0,07 \pm 0,01$  RV,  $n=13$ ),  $p=0,015$  pret kontroles grupu ar nepāra t-testu.

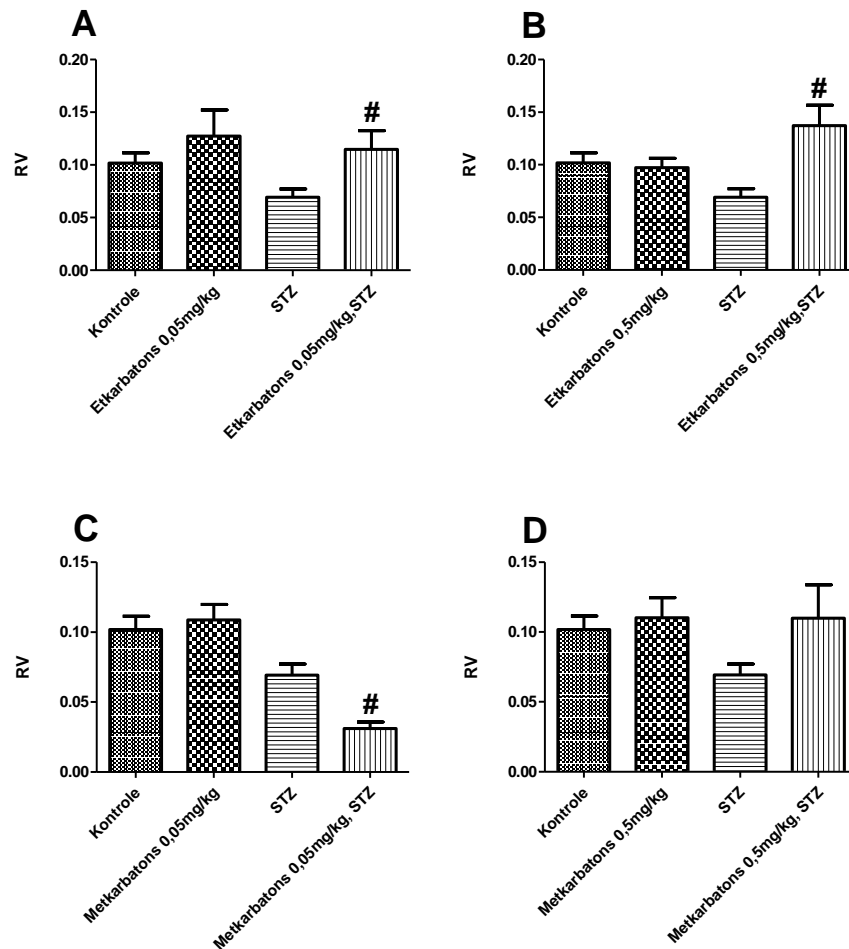
Veselajiem dzīvniekiem AV-153-Na (0,5 mg/kg) (sk. 3.32. A. att.) ( $F(3;29)=10,81$ ,  $P < 0,0001$ ) un AV-153-Na (0,5 mg/kg) – miricetīna (50 mg/kg) kombinācija (sk. 3.32. C. att.) ( $F(3;30)=7,19$ ,  $p=0,0009$ ) neizraisa statistiski ticamas eNOS gēna ekspresijas svārstības,  $0,09 \pm 0,01$  RV,  $n=5$ , un  $0,10 \pm 0,01$  RV,  $n=5$ . Savukārt miricetīns (50 mg/kg) paaugstina eNOS gēna ekspresiju līdz  $0,19 \pm 0,03$  RV,  $n=5$ ,  $p < 0,01$  (sk. 3.32. B. att.) ( $F(3;30)=11,93$ ,  $p < 0,0001$ ). STZ modelī gan AV-153-Na ( $0,17 \pm 0,01$  RV,  $n=4$ ,  $p < 0,01$ ), gan miricetīns ( $0,14 \pm 0,02$  RV,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ), gan vielu kombinācija ( $0,14 \pm 0,02$  RV,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ) paaugstina eNOS gēna ekspresijas līmeni salīdzinot ar STZ un veselo dzīvnieku kontroles grupām (sk. 3.32. att.).



3.32.att. eNOS gēna ekspresija kontroles un inducētā 1. tipa cukura diabēta dzīvnieku grupās A. AV-153-Na (0,5 mg/kg), B. miricetīna (50 mg/kg) un to C. kombināciju klātbūtnē nierēs. Grupās ir no 4 līdz 13 dzīvniekiem Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA Newman-Keuls pēctestu.

Veselajos dzīvniekos etkarbatons neuzrāda statistiski ticamas eNOS gēna ekspresijas svārstības, 0,05 mg/kg-  $0,13 \pm 0,03$  RV,  $n=3$  ( $F(3;27)=4,46$ ,  $p=0,0115$ ) (sk. 3.33. A. att.) un 0,5 mg/kg-  $0,10 \pm 0,09$  RV,  $n=4$  ( $F(3;28)=5,90$ ,  $p=0,003$ ) (sk. 3.33. B. att.). Cukura diabēta apstākļos etkarbatons 0,05 mg/kg uzrādīja spēju paaugstināt eNOS gēna ekspresijas līmeni līdz  $0,12 \pm 0,02$  RV,  $n=4$ ,  $p < 0,05$ , un 0,5 mg/kg  $0,13 \pm 0,02$  RV,  $n=4$ ,  $p < 0,01$ .

Metkarbatons kontroles grupās abās koncentrācijās neuzrādīja eNOS mRNS transkripciju ietekmējošas īpašības. Grupā, kurā ievadīja 0,05 mg/kg vielas, eNOS gēna koncentrācija bija  $0,11 \pm 0,01$  RV,  $n=4$  ( $F(3;29)=9,76$ ,  $p=0,0001$ ) (sk. 3.33. C. att.), bet grupā, kur ievadīja 0,5 mg/kg -  $0,11 \pm 0,02$  RV,  $n=4$  ( $F(3;28)=3,29$ ,  $p=0,0352$ ) (sk. 3.33. D. att.). 1TCD modelī metkarbatons 0,05 mg/kg koncentrācijā statistiski ticami samazina eNOS līmeni līdz  $0,03 \pm 0,01$   $n=5$ ,  $p < 0,05$ , bet 0,5 mg/kg paaugstina līdz  $0,11 \pm 0,02$  RV,  $n=4$ .

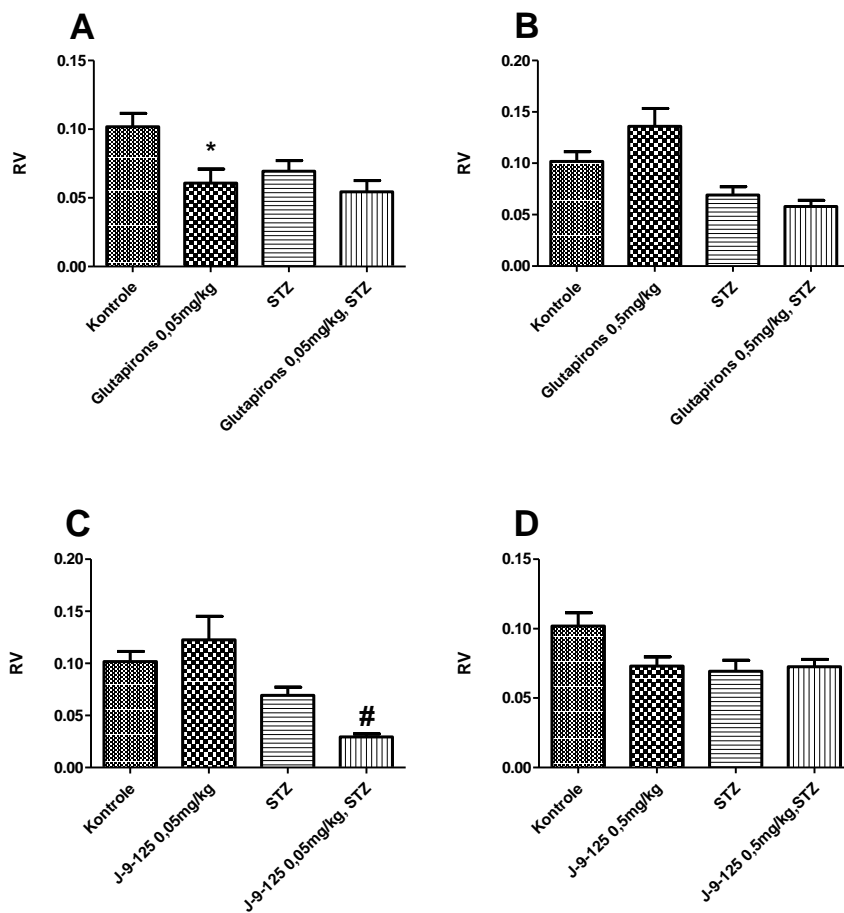


3.33.att. eNOS gēna ekspresija kontrolēs un inducētā 1. tipa cukura diabēta dzīvnieku grupās A. etķarbatona 0,05 mg/kg un B. 0,5 mg/kg, C. metķarbatona 0,05 mg/kg un D. 0,5 mg/kg devu klātbūtnē nierēs. Grupās ir no 3 līdz 13 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontrolēs grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pēctestu.

Glutapirona 0,05 mg/kg koncentrācija veselo dzīvnieku grupā uzrādīja statistiski ticamu eNOS gēna samazinājumu līdz  $0,06 \pm 0,01$  RV,  $n = 4$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3; 29) = 4,79$ ,  $p = 0,0079$ ) (sk. 3.34. A. att.), bet 0,5 mg/kg koncentrācijas klātbūtnē eNOS mRNS koncentrācija pieauga līdz  $0,14 \pm 0,02$  RV,  $n = 4$  ( $F(3; 29) = 8,07$ ,  $p = 0,0005$ ) (sk. 3.34. B. att.). Analizējot datus ar vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēctestu, glutapirona abas pētāmās koncentrācijas (0,05 mg/kg, 0,5 mg/kg) eNOS mRNS

koncentrāciju paraugos neietekmēja cukura diabēta modelī,  $0,05 \pm 0,01$  RV,  $n=5$  un  $0,06 \pm 0,01$  RV,  $n=5$ .

J-9-125 intaktajos dzīvniekos  $0,05$  mg/kg koncentrācijā eNOS mRNS līmenis ir  $0,12 \pm 0,02$  RV,  $n=4$  ( $F(3;29)=9,84$ ,  $p=0,0001$ ) (sk. 3.34. C. att.), bet  $0,5$  mg/kg -  $0,07 \pm 0,01$  RV,  $n=4$  ( $F(3;29)=3,29$ ,  $p=0,0344$ ) (sk. 3.34. D. att.). Cukura diabēta apstākļos J-9-125  $0,05$  mg/kg samazina eNOS mRNS koncentrāciju līdz  $0,03 \pm 3 \times 10^{-3}$  RV,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ , savukārt  $0,5$  mg/kg šādu efektu neuzrāda -  $0,07 \pm 0,01$  RV,  $n=5$ .

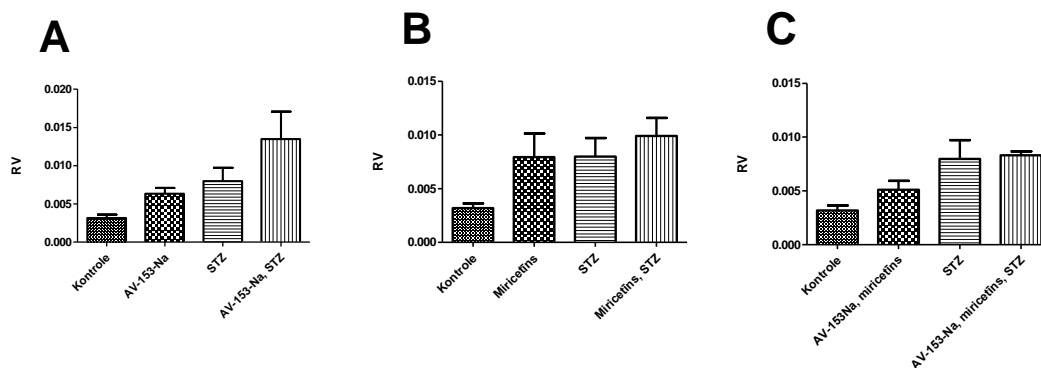


**3.34.att. eNOS gēna ekspresija kontroles un inducētā 1. tipa cukura diabēta dzīvnieku grupās A. glutapirona  $0,05$  mg/kg un B.  $0,5$  mg/kg devu, C. J-9-125  $0,05$  mg/kg un D.  $0,5$  mg/kg devu klātbūtnē nierēs.** Grupās ir no 4 līdz 13 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pēctestu.

### 3.2.3. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes gēna ekspresijas līmeņa noteikšana ar reversās transkripcijas kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas metodi dzīvnieku nierēs streptozotocīna 1. tipa cukura diabēta modelī 1,4- DHP klātbūtnē

iNOS gēna ekspresija STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos pieaug līdz  $8 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$  RV, n=13, no  $3 \times 10^{-3} \pm 4 \times 10^{-4}$  RV, n=11, kontroles grupā, p=0,0222, nepāra t-tests.

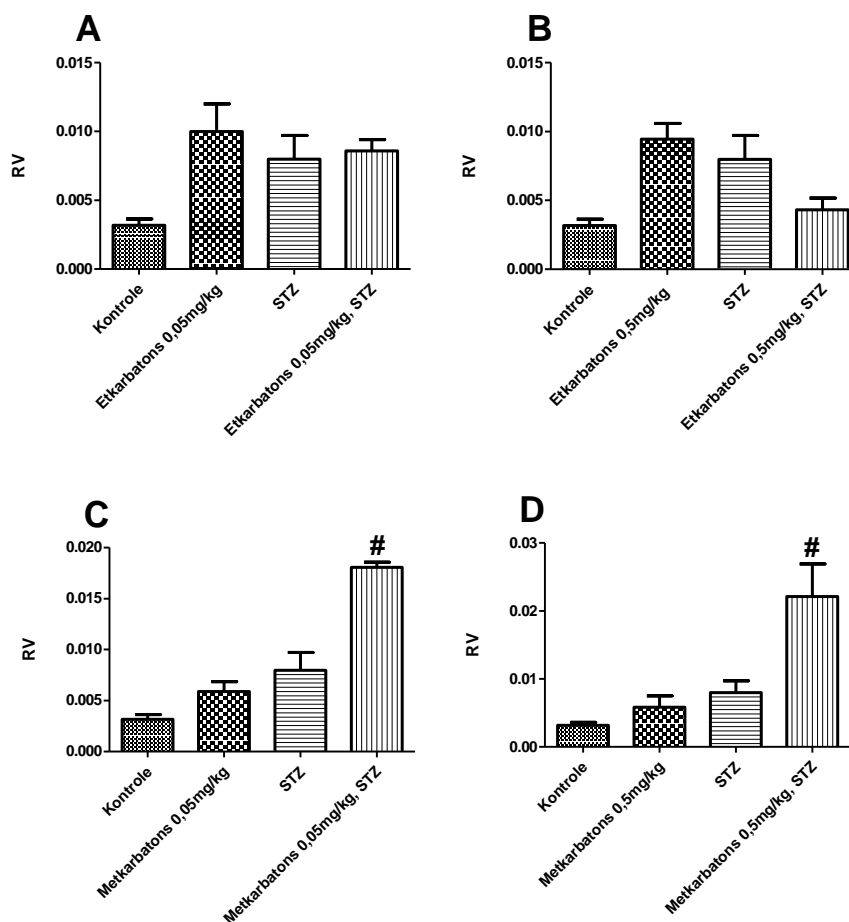
iNOS gēna transkripcijas līmenis kontroles grupā AV-153-Na 0,5 mg/kg koncentrācijas klātbūtnē pieaug līdz  $6 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-4}$  RV, n=4, STZ cukura diabēta modelī iNOS gēna ekspresiju paaugstina līdz  $0,01 \pm 4 \times 10^{-3}$  RV, n=4 (F(3;29)=4,97, p=0,0066) (sk. 3.35. A. att.). Miricetīns paaugstina iNOS mRNS koncentrāciju gandrīz līdz tās līmenim STZ cukura diabēta grupā-  $8 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$  RV, n=5, un diabēta modelī tās līmenis auga līdz  $9 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$  RV, n=5 (F(3;30)=3,332, p=0,0326). (sk. 3.35. B. att.). AV-153-Na un miricetīna kombinācija paaugstina iNOS mRNS līmenis mazāk nekā vienas katras atsevišķi-  $5 \times 10^{-3} \pm 8 \times 10^{-4}$  RV, n=5, šī tendence ir izsekojama arī cukura diabēta modelī-  $8 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-4}$  RV, n=5 (F(3;30)=3,28, p=0,0342) (sk. 3.35. C. att.).



3.35.att. iNOS gēna ekspresija kontroles un inducētā 1. tipa cukura diabēta dzīvnieku grupās A. AV-153-Na (0,5 mg/kg), B. miricetīna (50 mg/kg) un to C. kombināciju klātbūtnē nierēs. Grupās ir no 4 līdz 13 dzīvniekiem Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \*p<0,05 pret kontroles grupu, #p<0,05 pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA Newman-Keuls pēctestu.

Etikarbatons koncentrācijā 0,05 mg/kg izteikti uzrāda tendenci paaugstināt iNOS gēna ekspresiju veselajos dzīvniekos līdz  $0,01 \pm 2 \times 10^{-3}$  RV,  $n=3$ , bet cukura diabētā šī tendence ir izteikta vāji-  $9 \times 10^{-3} \pm 8 \times 10^{-4}$  RV,  $n=5$ , salīdzinot ar STZ kontroles grupu, ( $F(3;28)=3,63$ ,  $p=0,025$ ) (sk. 3.36. att.). 0,5 mg/kg veselajos dzīvniekos uzrāda ļoti līdzīgus skaitļus  $9 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$  RV,  $n=4$ , ko uzrādīja zemākā koncentrācija, bet STZ cukura diabēta modeļa apstākļos tika novērota tendence samazināt iNOS mRNS līmeni līdz  $4 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-4}$  RV,  $n=5$ , ( $F(3;29)=3,65$ ,  $p=0,0239$ ) (sk. 3.36. att.).

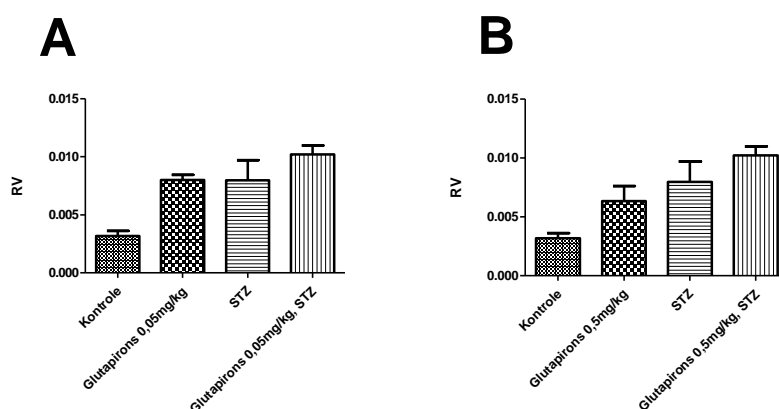
Metkarbatons kontroles grupās abās koncentrācijās (0,05 mg/kg un 0,5 mg/kg) nedaudz paaugstina iNOS gēna ekspresiju līdz  $6 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$  RV,  $n=4$ , un  $6 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-3}$   $n=4$ , attiecīgi. Cukura diabēta modelī šī līdzība saglabājās 0,05 mg/kg-  $0,02 \pm 5 \times 10^{-4}$  RV,  $n=5$ , un 0,5 mg/kg -  $0,02 \pm 6 \times 10^{-3}$  RV,  $n=5$ . Abos gadījumos dati tika analizēti ar vienvirziena ANOVA ar sekojošu *Newman-Keuls* pēctestu ( $F(3;29)=14,54$ ,  $p<0,0001$ ) un ( $F(3;29)=12,29$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.36. att.).

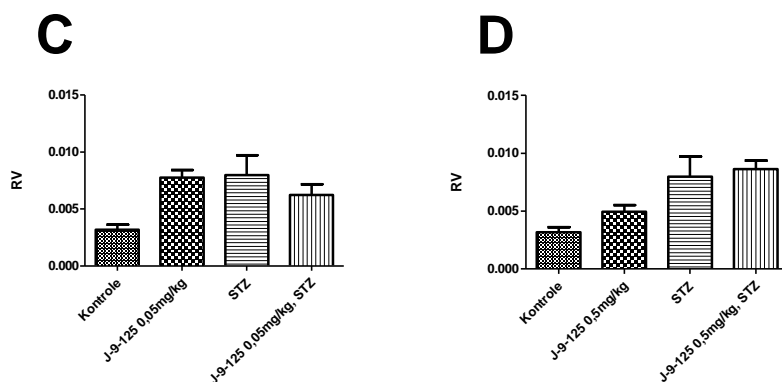


3.36.att. iNOS gēna ekspresija kontroles un inducētā 1. tipa cukura diabēta dzīvnieku grupās A. etkarbatona 0,05 mg/kg un B. 0,5 mg/kg, C. metkarbatona 0,05 mg/kg un D. 0,5 mg/kg devu klātbūtnē nierēs. Grupās ir no 3 līdz 13 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pētēstū.

Glutapirons koncentrācijā 0,05 mg/kg paaugstina iNOS gēna ekspresiju līdz  $8 \times 10^{-3} \pm 5 \times 10^{-4}$  RV,  $n=4$ , savukārt cukura diabēta modelī šī koncentrācija paaugstināja, salīdzinot ar STZ grupu, iNOS mRNS ekspresiju līdz  $0,01 \pm 8 \times 10^{-4}$  RV,  $n=5$  ( $F(3;29)=4,26$ ,  $p=0,013$ ) (sk. 3.37. A. att.). 0,5 mg/kg šīs vielas ietekmēja iNOS gēna ekspresiju ļoti līdzīgi gan intaktajos dzīvniekos-  $6 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-3}$  RV,  $n=4$ , gan cukura diabēta modelī-  $0,01 \pm 7 \times 10^{-4}$  RV,  $n=5$  ( $F(3;29)=3,99$ ,  $p=0,017$ ) (sk. 3.37. B. att.).

0,05 mg/kg J-9-125 paaugstina iNOS mRNS līmeni līdz  $8 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-4}$  RV,  $n=4$  intaktajos dzīvniekos, STZ modulētā cukura diabēta apstākļos tas samazinājās līdz  $6 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-4}$  RV,  $n=5$ , tomēr izanalizējot datus ar vienvirziena ANOVA ar sekojošu *Newman-Keuls* pētēstū, statistiska starpība starp analizējamām grupām netika sasniegta ( $F(3;29)=2,80$ ,  $p=0,0578$ ) (sk. 3.37. C. att.). J-9-125 koncentrācijā 0,5 mg/kg kontroles grupā iNOS gēna ekspresiju paaugstināja mazāk nekā iepriekš apskatītā koncentrācija, salīdzinot ar veselajiem dzīvniekiem,  $5 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-4}$  RV,  $n=3$ , savukārt cukura diabēta apstākļos viela apskatāmā koncentrācijā neuzrādīja iNOS mRNS līmeni ietekmējošas īpašības-  $9 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-4}$  RV,  $n=5$  ( $F(3;28)=3,20$ ,  $p=0,0384$ ) (sk. 3.37. D. att.).





3.37.att. iNOS gēna ekspresija kontroles un inducētā 1. tipa cukura diabēta dzīvnieku grupās A. glutapirona 0,05 mg/kg un B. 0,5 mg/kg devu, C. J-9-125 0,05 mg/kg un D. 0,5 mg/kg devu klātbūtnē nierēs. Katrā grupā ir no 4 līdz 13 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, ar vienvirziena ANOVA *Newman-Keuls* pēctestu.

#### 3.2.4. Inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dažādos dzīvnieku audos streptozotocīna inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī AV- 153- Na klātbūtnē

Sirdī iNOS proteīna ekspresija veselajiem dzīvniekiem bija  $9,00 \pm 1,95$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, bet STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos tas paaugstinājās līdz  $26,00 \pm 4,73$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, analizējot šīs grupas ar nepāra t- testu, atrasta statistiska starpība, kur p ir 0,0099. AV-153-Na klātbūtnē sirds audos. Kontroles grupā AV-153-Na neietekmēja iNOS proteīna ekspresiju sirds audos ( $11,00 \pm 3,51$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5), STZ inducētā cukura diabēta gadījumā AV-153-Na samazināja iNOS proteīna ekspresiju līdz  $8,40 \pm 1,30$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5,  $p < 0,01$  ( $F(3;16)=7,11$ ,  $p=0,003$ ) (sk. 3.38. A. att.).

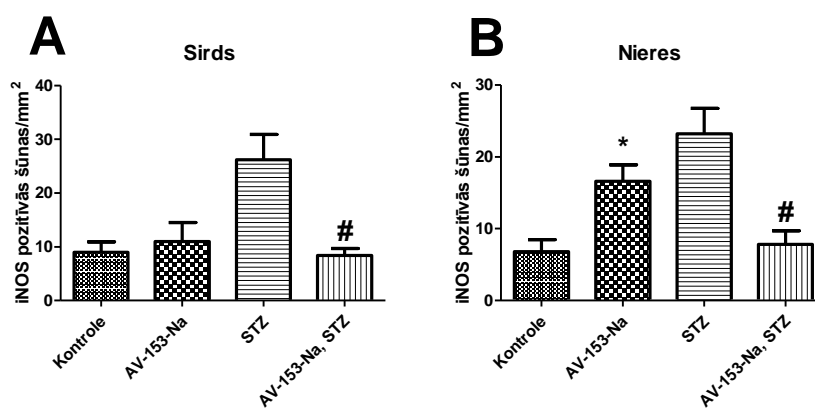
Kontroles dzīvniekiem iNOS gēna ekspresija nierēs audos bija  $6,80 \pm 1,66$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, bet pēc STZ ievades un cukura diabēta izsaukšanas tā līmenis nierēs paaugstinājās līdz  $16,60 \pm 2,29$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, sasniedzot statistiskās ticamības līmeni, analizējot abas grupas ar nepāra t- testu, kur p ir vienāds ar 0,003. AV-153-Na paaugstināja iNOS proteīna līmeni līdz  $16,60 \pm 2,29$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5,  $p < 0,05$ , kā arī

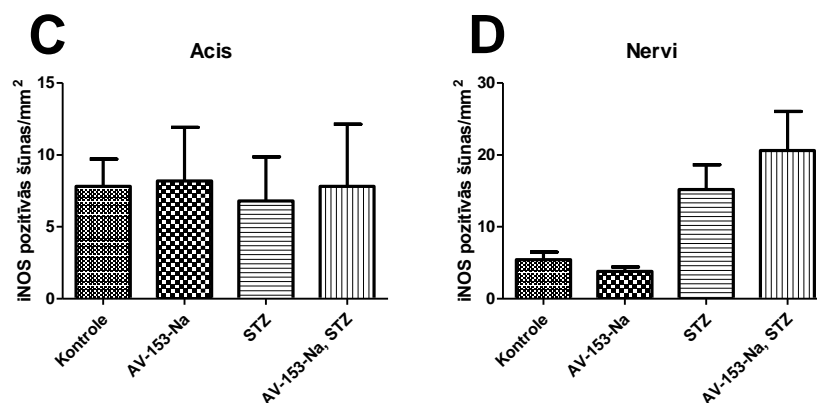


STZ inducētā cukura apstākļos tas uzrādīja iNOS proteīna ekspresiju samazinošās īpašības ( $7,80 \pm 1,91$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, p<0,05) ( $F(3;16)=10,02$ , p=0,0006) (sk. 3.38. B. att.).

Acīs iNOS proteīna ekspresija kontroles grupā sasniedza  $7,80 \pm 1,91$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, bet pēc stimulācijas ar STZ tā līmenis gandrīz nemainījās  $6,80 \pm 3,07$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=7, nesasniedzot statistiskās ticamības sliekšni. Ievadot AV-153- Na gan veselajiem dzīvniekiem ( $8,20 \pm 3,72$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5), gan dzīvniekiem ar inducētu cukura diabētu ( $7,8 \pm 4,33$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5) iNOS proteīna ekspresija būtiski nemainījās ( $F(3;16)=0,03$ , p=0,9923) (sk. 3.38. C. att.).

Veselos nervu audos iNOS proteīna ekspresijas līmenis bija  $5,40 \pm 1,01$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, bet cukura diabēta apstākļos paaugstinājās līdz  $15,20 \pm 3,43$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, salīdzinot abas grupas ar nepāra t- testu, tika uzrādīta statistiska ticamība, kur p bija vienāds ar 0,0259. AV-153-Na ievade kontroles grupā uzrādīja tendenci samazināt iNOS proteīnu ekspresiju nervos līdz  $3,80 \pm 0,58$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, bet STZ cukura diabēta apstākļos paaugstināt līdz  $20,60 \pm 5,47$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5 ( $F(3;16)=5,95$ , p=0,0063) (sk. 3.38. D. att.).





3.38.att. iNOS proteīna ekspresija kontroles un STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos dzīvnieku grupās pēc AV-153-Na p/o ievades 0,5 mg/kg koncentrācijā A. sirdī, B. nierēs, C. acīs un D. nervos. Katrā grupā ir 5 dzīvnieki. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, pēc vienvirziena ANOVA, *Newman–Keuls* pēctesta.

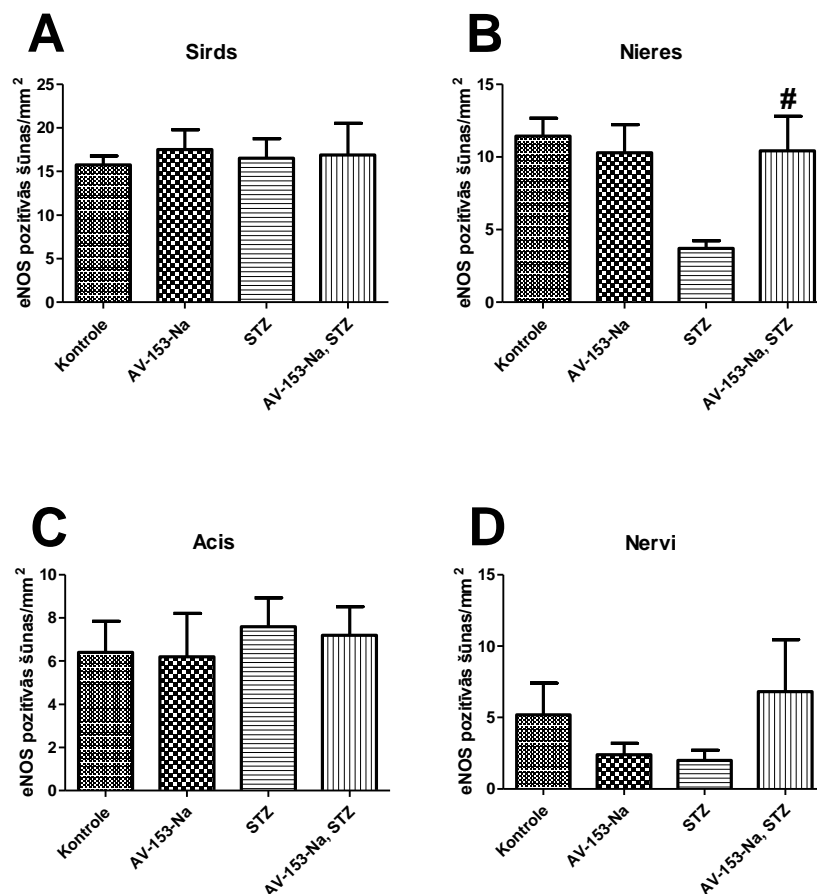
### 3.2.5. Endoteliālās slāpekļa oksīda sintāzes līmeņa noteikšana ar imūnhistoķīmijas metodi dažādos dzīvnieku audos streptozotocīna inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī AV- 153- Na klātbūtnē

Sirdī starp eNOS proteīna ekspresiju kontroles grupā ( $15,75 \pm 1,03$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=8$ ) un STZ iekaisuma grupā ( $16,50 \pm 2,29$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=8$ ) neuzrādās statistiska ticamība, pēc analīzes ar nepāra t-testu. Kā arī AV-153-Na ievade neuzrādīja eNOS proteīnu ekspresiju modulējošas īpašības ( $F(3;28)=0,08$ ,  $p=0,9669$ ) (sk. 3.39. A. att.) ne veselo ( $17,50 \pm 2,30$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=8$ ), ne slimu dzīvnieku sirds audos ( $16,88 \pm 3,63$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=8$ ).

Nierēs kontroles grupas dzīvniekos eNOS proteīna ekspresija ir  $11,43 \pm 1,23$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=7$ , cukura diabēta apstākļos tā ekspresija samazinās līdz  $3,71 \pm 0,52$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=7$ , analizējot datus ar nepāra t-testu,  $p < 0,0001$ , kas liecina par statistiski ticami starpību. Ievadot AV-153-Na veselajos dzīvniekos, eNOS līmenis gandrīz nemainījās ( $10,29 \pm 2,36$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=7$ ), salīdzinot ar kontroles grupu, savukārt ievadot STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos eNOS proteīna ekspresijas līmenis pieauga ( $10,43 \pm 1,94$  šūnas/mm<sup>2</sup>,  $n=7$ ), salīdzinot ar STZ kontroles grupu, gandrīz līdz kontroles grupas līmenim ( $F(3;24)=4,51$ ,  $p=0,0121$ ) (sk. 3.39. att. B.).

Acīs kontroles dzīvniekos eNOS saturs bija  $6,40 \pm 1,44$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, STZ modeļa grupā-  $7,60 \pm 1,33$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, analizējot abas grupas ar nepāra t- testu,  $p > 0,05$ . Ievadot AV-153-Na kontroles dzīvniekos acīs eNOS līmenis netika ietekmēts ( $6,20 \pm 2,01$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5), cukura diabēta apstākļos -  $7,20 \pm 1,32$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5 ( $F(3;16)=0,1819$ ,  $p=0,9071$ ) (sk. 3.39. C. att.).

Veselo dzīvnieku nervu audos eNOS līmenis bija  $5,20 \pm 2,22$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, bet cukura diabēta modelī-  $2,00 \pm 0,71$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, statistiski ticama starpība starp grupām, analizējot ar nepāra t-testu, netika sasniegta,  $p > 0,05$ . Ievadot AV-153-Na eNOS līmenis uzrādīja tendenci pazemināties līdz  $2,40 \pm 0,81$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5, cukura diabēta apstākļos AV-153-Na ievade izraisīja lielas eNOS svārstības starp grupām, kur vidējais lielums bija  $6,80 \pm 3,65$  šūnas/mm<sup>2</sup>, n=5 ( $F(3;16)=1,08$ ,  $p=0,3842$ ) (sk. 3.39. D. att.).



3.39.att. eNOS proteīna ekspresija kontroles un STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos dzīvnieku grupās pēc AV- 153- Na p/o ievades 0,5 mg/kg koncentrācijā A. sirdī, B. nierēs, C. acīs un D. nervos. Grupās ir 5 no 8

dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  pret LPS grupu, pēc vienvirziena ANOVA, *Newman-Keuls* pēctesta.

### **3.2.6. Glikozes koncentrācijas kontrole veselajos dzīvniekos un STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos 1,4-DHP klātbūtnē**

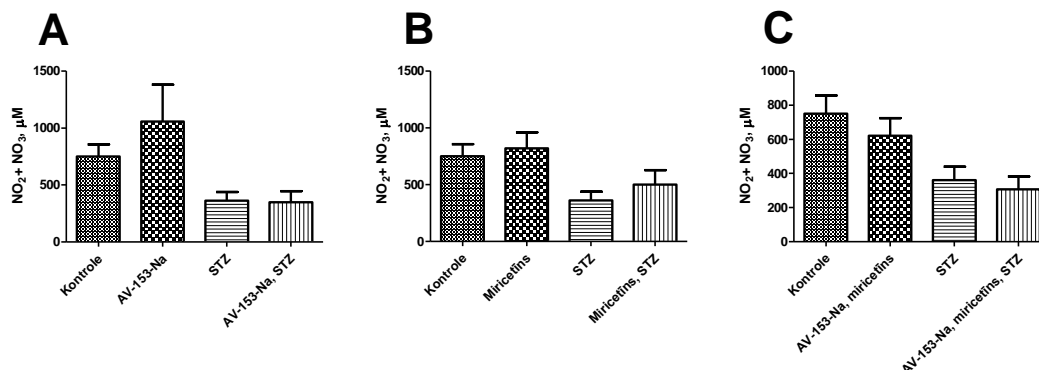
Glikozes koncentrācija paēdušiem dzīvniekiem tika kontrolēta pēc trīs dienu 1,4-DHP ievades. Veselo dzīvnieku grupā glikozes koncentrācija bija  $7,06 \pm 0,30$  mmol/l,  $n=5$ , bet STZ 1. tipa cukura diabēta modelī grupā –  $33,46 \pm 3,05$  mmol/l,  $n=9$ . Izanalizējot datus ar nepāra t-testu, konstatējām statistiski ticamu starpību starp grupām, kur  $p < 0,0001$ . Statistiski nozīmīgas, glikozes līmeni ietekmējošas īpašības neviena no pētītajām vielām (AV-153-Na 0,5 mg/kg, miricetīns 50 mg/kg, AV-153-Na un miricetīna 50 mg/kg kombinācija, metkarbatons 0,5 mg/kg un 0,05 mg/kg, etkarbatons 0,5 mg/kg un 0,05 mg/kg, J-9-125 0,5 mg/kg un 0,05 mg/kg, glutapirons 0,5 mg/kg un 0,05 mg/kg) neuzrādīja. Dati ir parādīti pielikumā Nr. 2.

### **3.2.7. Nitrātu/nitrītu koncentrācijas svārstības veselajos dzīvniekos un STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta apstākļos AV-153-Na, miricetīna un to kombinācijas klātbūtnē**

Urīnā nitrātu/nitrītu koncentrācija dzīvniekiem ar STZ inducēto 1. tipa cukura diabētu bija statistiski ticami samazināta ( $389,30 \pm 78,36$   $\mu$ M,  $n=5$ ) salīdzinot ar kontroles grupu – veselajiem dzīvniekiem ( $750,70 \pm 106,10$   $\mu$ M,  $n=4$ ),  $p < 0,0193$ , nepāra t-tests.

AV-153-Na (0,5mg/kg) veseliem dzīvniekiem  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  koncentrāciju urīnā paaugstināja līdz  $1058 \pm 323,40$   $\mu$ M,  $n=5$ , bet STZ modelī tā saglabājās gandrīz nemainīga:  $349,00 \pm 96,31$   $\mu$ M,  $n=5$ , salīdzinot ar kontroles grupu ( $F(3;15)=3,41$ ,  $p=0,0451$ ) (sk. 3.40. A. att.). Miricetīns (50 mg/kg) urīnā veseliem dzīvniekiem uzrādīja nelielu tendenci paaugstināt  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  līmeni ( $820,50 \pm 140,00$   $\mu$ M,  $n=5$ ) salīdzinot ar kontroles grupu. STZ modelī miricetīna (50 mg/kg) ievadīšana izraisīja līdzīgu efektu ( $501,90 \pm 128,00$   $\mu$ M,  $n=5$  ( $F(3;15)=3,41$ ,  $p=0,0452$ )) (sk. 3.40. B. att.). Savukārt abu vielu kombinācija (AV-153-Na (0,5 mg/kg) un miricetīns (50 mg/kg))

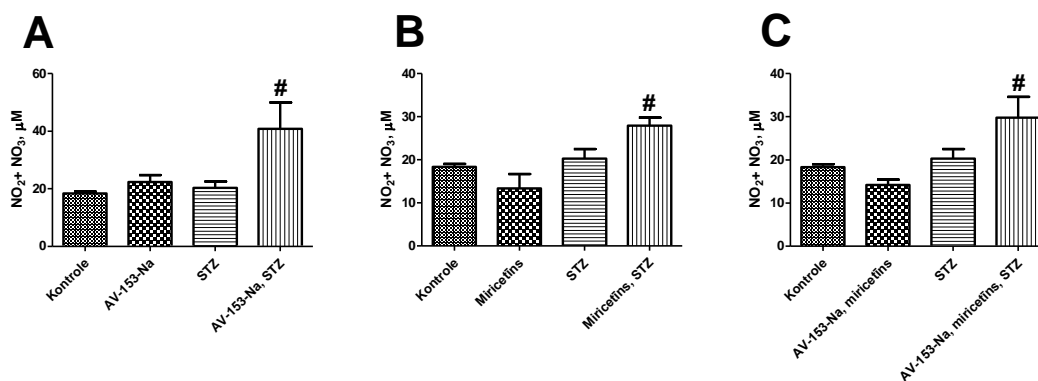
uzrādīja tendenci samazināt  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  koncentrāciju gan veselajos dzīvniekos ( $621,30 \pm 104,50 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ), gan dzīvniekos ar cukura diabētu ( $307,50 \pm 128,60 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ) ( $F(3;15)=5,15$ ,  $p=0,012$ ) (sk. 3.40. C. att.).



**3.40.att.  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  koncentrācijas svārstības urīnā veselajiem dzīvniekiem un STZ inducētajā 1. tipa cukura diabēta modelī AV-153-Na (0,5 mg/kg), miricetīna (50 mg/kg) un to kombinācijas klātbūtnē (AV-153-Na (0,5 mg/kg) un miricetīns (50 mg/kg)).** Grupās ir no 4 līdz 5 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti kā vidējais aritmētiskais  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  statistiski ticami pret kontroles grupu, # $p < 0,05$  statistiski ticami pret STZ grupu (vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pētēstetu).

Asins serumā nitrātu/nitrītu koncentrācija uzrādīja tendenci paaugstināties dzīvniekiem ar STZ izsaukto 1. tipa cukura diabētu ( $20,27 \pm 2,26 \mu\text{M}$ ,  $n=4$ ) salīdzinot kontroles grupu ( $18,36 \pm 0,66 \mu\text{M}$ ,  $n=4$ ).

AV-153-Na veselajos dzīvniekos neizsauca būtiskas nitrātu/nitrītu koncentrācijas svārstības serumā ( $22,38 \pm 2,40 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ), bet cukura diabēta apstākļos palielināja to koncentrāciju līdz  $40,83 \pm 9,12 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;14)=3,87$ ,  $p=0,0331$ ) (sk. 3.41. A. att.). Miricetīns veseliem dzīvniekiem uzrādīja tendenci samazināt nitrātu/nitrītu koncentrāciju līdz  $13,37 \pm 3,30 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ , bet STZ modelī paaugstināja to līdz  $27,93 \pm 1,82 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;14)=7,25$ ,  $p=0,0036$ ) (sk. 3.41. B. att.). Līdzīgi sevi parādīja arī vielu kombinācija: kontroles grupā, kur novēroja  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  samazinājumu:  $14,23 \pm 1,20 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ , bet 1. tipa cukura diabēta apstākļos stabilo slāpekļa oksīda metabolītu koncentrācija palielinājās līdz  $29,82 \pm 4,76 \mu\text{M}$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,05$  ( $F(3;14)=5,51$ ,  $p=0,0104$ ) (sk. 3.41. C. att.).



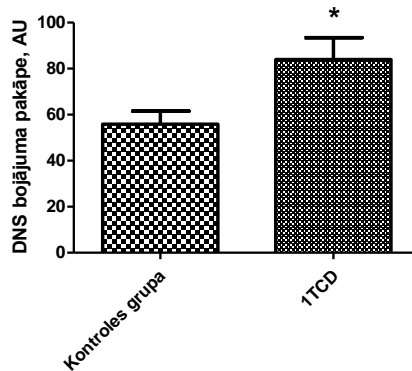
3.41.att. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> koncentrācijas svārstības asins serumā veselajiem dzīvniekiem un STZ inducētajā 1. tipa cukura diabēta modelī AV-153-Na (0,5 mg/kg), miricetfina (50 mg/kg) un to kombinācijas klātbūtnē. Grupās ir no 4 līdz 5 dzīvniekiem. Rezultāti ir parādīti kā vidējais aritmētiskais ± S.E.M. \*p<0,05 statistiski ticami pret kontroles grupu, #p<0,05 statistiski ticami pret STZ grupu (vienvirziena ANOVA ar *Newman-Keuls* pēttestu).

### 3.3. Klīniskais pētījums

#### 3.3.1. Vienpavediena DNS pārrāvumu analīze ar vienas šūnas elektroforēzes metodi 1. tipa cukura diabēta pacientu un indivīdos bez iepriekš diagnosticēta diabēta perifērajās venozajās asinīs šūnu kodolos

Veicot vienas šūnas elektroforēzi sārmainos apstākļos venozajās asinīs, tika konstatēts, ka 1. tipa cukura diabēta pacientu asins kodolu saturošajās šūnās ir par 31 % vairāk DNS vienpavediena pārrāvumu (83,98±9,45 AU, n=54) nekā kontroles grupā (58,03±6,15 AU, n=49). Veicot statistisku analīzi ar nepāra t-testu, tika secināts, ka starpība starp grupām ir statistiski ticama, kur p=0,0264 (sk. 3.42. att.).

Pētījuma piedalījās 1. tipa cukura diabēta pacienti no 19-71 gadam, vidējais vecums- 35,78±1,73 gadi, n=54, un indivīdi bez iepriekš diagnosticētā 1TCD no 20-71 gadiem, vidējais vecums- 28,05 ±1,88 gadi, n=49.



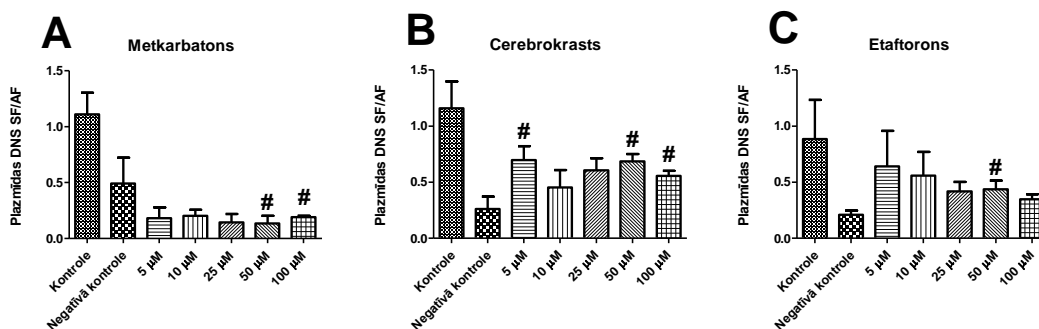
3.42.att. Vienpavedienu DNS pārrāvumi perifēro venozo asiņu šūnu kodolos indivīdos bez iepriekš diagnosticētā 1TCD un pacientiem ar 1TCD. Kontroles grupā n=49, 1TCD grupā n=54, \*p=0,0264, nepāra t- tests.

### 3.4. 1,4-DHP antiradikāļu un DNS molekulu pasargājošo īpašību analīze *in vitro*

#### 3.4.1. DNS analīze *in vitro* neitrālos apstākļos Fentona reakcijas apstākļos 1,4-DHP klātbūtnē

Šajā modelī tika analizēti 1,4-DHP grupas preparāti, AV- 153- Na, J-4-96, J-3-131-Na, J-8-120, J-7-53, J-3-186, AV-154-Na, AV-153-K, AV-153-Li, (J-6-93) PP-544-NH<sub>4</sub>, B-5-Na, tauropirons, metkarbatons, karbatons, alapirons, glutapirons, cerebrokrasts, etaforons, fenoforons. Visi dati ir analizēti ar nepāra t-testu pret grupu, kur tika izsaukta Fentona reakcija bez 1,4-DHP klātbūtnes, un uzrādīti pielikumā Nr. 3.

Metkarbatons uzrādīja statistiski ticamu DNS bojājumus pastiprinošu efektu koncentrācijās 50 μM (0,14±0,07 SF/AF, n=3) un 100 μM (0,19±0,01 SF/AF, n=3), sasniedzot statistisku ticamību p=0,0435 un p=0,0032, pret negatīvo kontroli, nepāra t-tests (sk. 3.43. A. att.). Savukārt cerebrokrasts parādīja aizsargājošu efektu koncentrācijās 5 μM (0,70±0,13 SF/AF n=4, p=0,0387), 50 μM (0,69±0,07 SF/AF, n=4, p=0,0154), kā arī 100 μM (0,56±0,05 SF/AF, n=4, p=0,0470) (sk. 3.43. B. att.). Cerebrokrasta koncentrācijas 10 un 25 μM uzrādīja tendenci saglabāt DNS molekulas integritāti. Interesantus rezultātus parādīja etkarbatons 5 μM koncentrācijā – visaugstāko pasargājošo efektu, bet tomēr statistisku ticamību izdevās sasniegt tikai 50 μM koncentrācijā (0,41±0,06 SF/AF, n=3, p=0,0419) (sk. 3.43. C. att.).

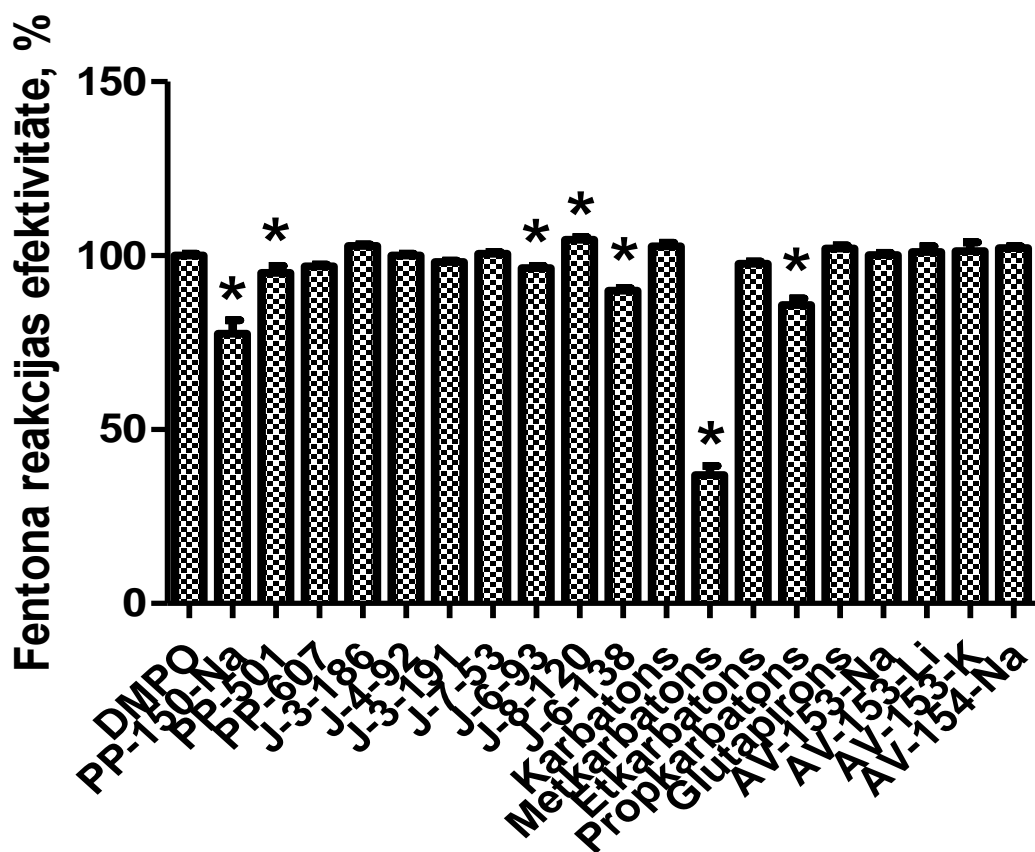


3.43.att. A. metkarbatona, B. cerebrokrasta, C. etaftorona DNS aizsargājošo un antioksidatīvo īpašību izvērtējums Fentona reakcijas ietvaros plazmīdas DNS klātbūtnē. # $p < 0,05$ , salīdzinot ar grupu, kur tika ierosināta Fentona reakcija bez 1,4-DHP klātbūtnē, rēķinot pēc nepāra t-testa, paraugu skaits grupā no 3-4, grafikā uzrādīts vidējais aritmētiskais  $\pm$  S.E.M.

### 3.4.2. 1,4- DHP spējas neitralizēt brīvos radikāļus izpēte ar EPR spektrometriju

Ir iegūti dati par 1,4-DHP spēju neitralizēt OH- radikāli, kas veidojas Fentona reakcijas rezultātā. Ir izanalizēti 19 savienojumi 1000  $\mu$ M koncentrācijā. 1,4-DHP darbības efektivitāti nosaka, salīdzinot DMPO-OH $\cdot$  EPR signālu intensitāti spektram, ko reģistrē tīrai Fentona reakcijai, un spektram, ko iegūst Fentona reakcijai pētāmās vielas klātbūtnē. Ja pieņemam, ka reakcijas ātrums tīrai Fentona reakcijai ir 100%, tad, pievienojot pētāmo vielu, novērojamās ātruma izmaiņas liecina par 1,4-DHP iesaisti šajā reakcijā. Ja 1,4-DHP reaģē ar OH- radikāli, tad DMPO-OH $\cdot$  radikāļu daudzums laikā samazinās ātrāk kā tīrā Fentona reakcijā un to raksturo vērtības, kas mazākas par 100%. Ja mērījumos iegūst vērtības, kas lielākas par 100%, tad var pieļaut, ka 1,4-DHP iesaistās reakcijā kā radikāļu donors. Visticamāk, ka šajā gadījumā no molekulas tiek atrauts elektrons vai ūdeņraža atoms un rezultātā Fentona reakcijas ātrums samazinās. Ar šo metodi tika izanalizētas 19 vielas: PP-150-Na, PP-501, PP-607, J-3-186, J-4-92, J-3-191, J-7-53, J-6-93 (PP-544-NH $_4$ ), J-8-120, J-6-138, karbatons, metkarbatons, etkarbatons, propkarbatons, glutapirons, AV-153-Na, AV-153-Li, AV-153-K, AV-154-Na 1 mM koncentrācijā. Vidi dati ir apkopoti pielikumā Nr.9.4.

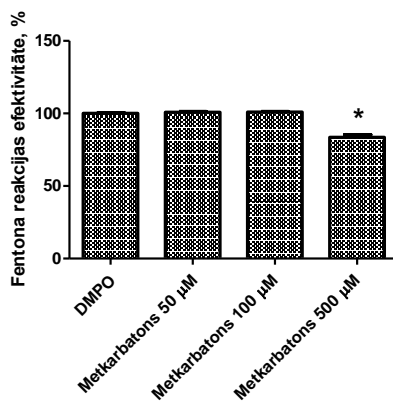




3.44.att. Fentona reakcijas ātruma izmaiņas dažādu 1,4-dihidropiridīnu klātbūtnē, izteiktas procentos. Grafikā ir uzrādīts vidējais aritmētiskais  $\pm$  S.E.M. Statistiskā ticamībā tika rēķināta pēc nepāra t-testa, \* $p < 0,05$  pret paraugu grupu, kurā tika izsaukta Fentona reakcija, saturēja DMPO, bet netika pievienots 1,4-DHP. Atkārtojumu skaits grupās ar analizējamo vielu bija 4-8, DMPO grupā 41.

PP-150-Na uzrādīja brīvos radikāļus neitralizējošas īpašības, Fentona reakcijas radīto radikāļu daudzums laikā samazinājās par 22,42% ( $77,58 \pm 3,80$  %,  $n=6$ ), salīdzinot ar tīro Fentona reakciju (DMPO paraugu grupa), iegūtie dati ir apstrādāti ar nepāra t-testu, kas uzrādīja statistiski nozīmīgu atšķirību,  $p < 0,0001$ , pret paraugu grupu, kur netika pievienots 1,4-DHP ( $100 \pm 0,56$  %,  $n=41$ ). PP-501 klātbūtnē brīvo radikāļu koncentrācija arī samazinājās, bet tikai par 5,00% ( $95,00 \pm 2,02$  %,  $n=6$ ), salīdzinot ar paraugiem bez 1,4-DHP, izanalizēto paraugu kopu ar nepāra t-testu, statistiskā atšķirība  $p=0,0044$ . J-6-93 uzrādīja nelielas brīvos radikāļus neitralizējošas īpašības, samazinot DMPO „pīķi” līdz  $96,38 \pm 0,63$  %,  $n=3$ ,  $p=0,0213$  (nepāra t-tests pret DMPO grupu). J-8-120 uzrādīja nelielas brīvo radikāļu donoru īpašības, kur

DMPO „pīķis” palielinājās līdz  $104,57 \pm 0,75$  %,  $n=6$ ,  $p=0,0044$ , rēķinot pret DMPO grupu, izmantojot nepāra t-testu. J-6-138 savukārt samazināja DMPO „pīķi” līdz  $89,89 \pm 0,86$  %,  $n=5$ ,  $p<0,0001$ , uzrādot brīvos radikāļus neitralizējošas īpašības. Propkarbatons samazināja brīvo radikāļu koncentrāciju par 14,18% ( $85,82 \pm 1,86$  %,  $n=5$ ,  $p<0,0001$ ) (sk. 3.44. att.). Metkarbatons 1000  $\mu\text{M}$  koncentrācijā uzrādīja izteiktas brīvos radikāļus neitralizējošas īpašības, brīvo radikāļu daudzumus samazinājās līdz  $36,94 \pm 2,59$  %,  $n=5$ ,  $p<0,0001$ , salīdzinot pret DMPO paraugu grupu, kur Fentona reakcija noritēja 100%. Sekojoši tika izpētītas metkarbatona spējas zemākās koncentrācijās. Diemžēl samazinoties analizējamās vielas koncentrācijai līdz 500  $\mu\text{M}$  paraugā, samazinājās arī tā brīvo radikāļu neitralizējošās īpašības  $83,61 \pm 1,65$  %,  $n=6$ ,  $p<0,0001$ . 100 un 50  $\mu\text{M}$ , vielas koncentrācijas neietekmēja Fentona reakcijas norisi (sk. 3.45. att.).



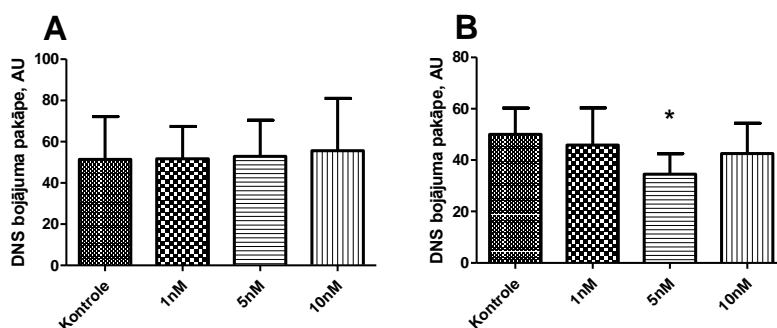
**3.45.att. Fentona reakcijas ātruma izmaiņas metkarbatona klātbūtnē dažādās koncentrācijās, izteiktas procentos.** Grafikā ir uzrādīts vidējais aritmētiskais  $\pm$  S.E.M. Statistiskā ticamība rēķināta pēc nepāra t-testa,  $*p<0,05$  pret paraugu grupu, kuriem tika izsaukta Fentona reakcija, saturēja DMPO, bet netika pievienots 1,4-DHP. Atkārtojumu skaits 4-6, DMPO grupā – 41.

### **3.4.3. Vienpavediena DNS pārrāvumu analīze ar vienas šūnas elektroforēzes metodi 1. tipa cukura diabēta pacientu un pacientos bez iepriekš diagnosticēta diabēta perifērajās venozajās asinīs AV-153-Na klātbūtnē**

Izvērtējot AV-153-Na ietekmi uz DNS pārrāvumu līmeni pacientos, kuriem iepriekš netika diagnosticēts 1TCD, konstatējām, ka 1 nM ( $51,68 \pm 15,75$  AU,  $n=6$ ), 5 nM ( $52,93 \pm 17,56$  AU,  $n=6$ ) un 10 nM ( $55,42 \pm 25,35$  AU,  $n=6$ ) koncentrācijas

neietekmē DNS integritāti salīdzinot ar kontroli ( $51,42 \pm 20,78$  AU,  $n=6$ ) (sk. 3.46. A. att.). Savukārt 1. tipa cukura diabēta apstākļos AV-153-Na samazina DNS vienpavedienu pārrāvumus 1 nM koncentrācijā līdz  $49,59 \pm 16,18$  AU,  $n=7$ , 10 nM -  $46,40 \pm 12,85$  AU,  $n=7$ , bet vidējā koncentrācija, 5 nM, līdz  $37,95 \pm 8,02$  AU,  $n=9$ , sasniedzot statistiskas ticamības sliekšni  $p=0,0016$ , pret kontroles grupu ( $55,15 \pm 9,95$  AU,  $n=9$ ), analizējot datus ar pāra t-testu (sk. 3.46. B. att.).

1. tipa cukura diabēta pacientu vidējais vecums bija  $39,22 \pm 2,63$  gadi,  $n=9$ , kontroles grupas pacientu vidējais vecums bija  $39,33 \pm 5,43$  gadi,  $n=9$ , analizējot abu grupu statistiski starpību ar nepāra t-testu,  $p > 0,05$ , tādā statistiska atšķirība netika sasniegta.



**3.46.att. Vienpavediena DNS pārrāvumu analīze A. veselo cilvēku un B. 1TCD apstākļos perifēro venozo asiņu šūnu kodolos pēc 3 stundu inkubācijas *ex vivo* ar AV-153-Na.** Grupās ir no 6 līdz 9 cilvēkiem. Rezultāti ir parādīti ar vidējo aritmētisko  $\pm$  S.E.M. \* $p < 0,05$  statistiski ticami pret kontroles grupu. Dati tika analizēti ar pāra t-testu.

## 4. DISKUSIJA

### 4.1. Dabas vielu ietekme uz slāpekļa oksīda sintēzi LPS izsuktā iekaisuma modelī

Slāpekļa oksīds ir molekula ar divējādām īpašībām. Nelielās koncentrācijās tā nodrošina daudzas fizioloģiskas funkcijas zīdītāju organismos. Savukārt, paaugstinoties tā koncentrācijai dažādu patoloģisku apstākļu rezultātā, kā, piemēram, sepse, izpaužas NO<sup>•</sup> toksiskās īpašības. Tās tiek ar makrofāgu starpniecību realizētas uz dažādiem patogēniem, bet ilgstošas slāpekļa oksīda pārprodukcijas rezultātā tiek bojāti arī paša organisma audi. Slāpekļa oksīds, reaģējot ar superoksīda radikāli, kas rodas pastiprināti dažādu patoloģisku faktoru ietekmē, izveido stipru oksidētāju – peroksinitrītu. Tas gan tiešā veidā, gan veidojot reaktīvus metabolītus, bojā lielās biomolekulas, to starpā DNS. Ilgstoša DNS bojājumu izsaukšana var rezultēties DNS punktveida mutācijās, citotoksiskos un citostatiskos efektos, kuru rezultātā var mainīties šūnas funkcija un aktivitāte. Izmainītā šūnas funkcija var izraisīt patoloģiskus procesus, kas ir slimību un to komplikāciju pamatā. Tādējādi ir svarīgi konstatēt vielas, kas pašas neizraisītu būtiskas slāpekļa oksīda svārstības, bet patoloģiskos apstākļos nomāktu tā pārprodukciju un tādējādi samazinātu NO<sup>•</sup> toksisko ietekmi uz organismu.

#### 4.1.1. Lipopolisaharīda izsuktā akūtā iekaisuma modeļa raksturojums

Pēc lipopolisaharīda i/p injekcijas Wistar līnijas žurkās koncentrācijā 10 mg/kg tika panākts akūts sepses stāvoklis. Pēc LPS ievades mūsu darbā iNOS gēna transkripcija aknās paaugstinājās 218 reizes (sk. 3.1. att.) un smadzeņu garozā – 5,7 reizes (sk. 3.4. att.), salīdzinot ar kontroles grupu. iNOS proteīna ekspresija pēc LPS stimulācijas paaugstinājās 6,4 reizes aknās (sk. 3.5. att.) un 5,6 reizes smadzeņu garozā (sk. 3.7. att.), salīdzinot ar veselo dzīvnieku audiem. Līdzīgas tendences novēroja visos audos, kur tika mērīta slāpekļa oksīda koncentrācija. Tā statistiski ticami palielinājās, salīdzinot ar veselo dzīvnieku kontroles grupu (sk. 3.1.5. nod.). Iegūtie rezultāti par LPS izraisīto akūto iekaisuma stāvokli sakrīt arī ar citu autoru publicētajiem datiem (Sebai et al., 2009b; Sebai et al., 2010; Sebai et al., 2011).

## 4.1.2. Flavonolu grupas pārstāvju nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana

### 4.1.2.1. Kvercetinš

Kvercetinš kā flavonolu grupas pārstāvis *in vitro* uzrāda antioksidatīvas īpašības (Wang and Mazza, 2002). Mūsu darbā kvercetinš koncentrācijā 50 mg/kg LPS iekaisuma modelī aknās 20 reizes samazināja iNOS gēna ekspresiju (sk. 3.2. att.), salīdzinot ar LPS modeļa grupu, bet neietekmēja iNOS proteīna ekspresiju. Savukārt slāpekļa oksīda produkcija iekaisuma apstākļos aknās palielinājās 1,6 reizes (sk. 3.11. att.), kā arī veselo dzīvnieku aknās tika uzrādīta NO<sup>•</sup> koncentrāciju paaugstinoša tendence. Kvercetīna ietekmē slāpekļa oksīda koncentrācija palielinājās LPS inducētā iekaisuma apstākļos arī žurku sēkliniekos (sk. 3.14. att).

Dati par kvercetīna aktivitāti iekaisuma apstākļos *in vivo* ir pretrunīgi. Kvercetinš (50 mg/kg), ievadīts žurkām stundu pēc iekaisuma modeļa izsaukšanas ar LPS un D-galaktozamīnu, neietekmē iNOS gēna un proteīna ekspresiju aknās (Lekic et al., 2013). Bet, ja kvercetīnu (60 mg/kg/dienā) ievada pelēm septiņas dienas pirms LPS injekcijas, slāpekļa oksīda līmenis ir zemāks nekā iekaisuma modelī (Wang et al., 2014). Tāpat eksperimentā, kur pelēm ievadīts p/o kvercetinš (10 mg/kg/dienā) trīs dienas līdz iekaisuma izsaukšanai, gan iNOS mRNS, gan iNOS proteīna, gan slāpekļa oksīda līmenis aknās samazinās (Jo et al., 2008). Ir parādīts, ka kvercetinš samazina fosforilētā IκB koncentrāciju (Garcia-Mediavilla et al., 2007), tādējādi inhibē LPS inducēto NF-κB aktivāciju *in vivo* pētījumos, nomācot iNOS gēna un proteīna ekspresiju (Kim et al., 2005).

Spriežot pēc augstāk minētajiem datiem, mūsu darbā veiktā vienlaicīga kvercetīna un LPS injekcija, izraisīja aizkavētu žurku organisma atbildes reakciju uz antioksidanta darbību, kas izpaudās ar samazinātu iNOS gēna ekspresiju, neizmainītu iNOS proteīna koncentrāciju un paaugstinātu NO<sup>•</sup> līmeni aknās. Tātad ir nepieciešama šīs vielas preventīva uzņemšana organismā, lai nomāktu nitrozatīvo stresu.

#### 4.1.2.2. Miricetīns

Mūsu darbā miricetīns samazināja iNOS gēna līmeni žurku aknu audos iekaisuma modeļa apstākļos (sk. 3.2. att.), savukārt iNOS proteīna ekspresija iekaisuma apstākļos nebija izmainīta, salīdzinot ar LPS modeļa kontroles grupas datiem.

Apskatot publicētos datus par miricetīna lomu slāpekļa oksīda produkcijas mazināšanā, ir pretrunas starp autoriem. Vieni autori ziņo, ka miricetīns un tā analogi LPS stimulētos peļu makrofāgos samazina iNOS proteīna līmeni un slāpekļa oksīda produkciju (Wang and Mazza, 2002; Kim et al., 2013b), kā arī tiek nomākts NF-κB signālpārnese ceļš (Tsai et al., 1999). Savukārt citi autori proponē, ka peļu makrofāgos miricetīns vairākās koncentrācijās pat stimulē nitrītu koncentrācijas pieaugumu un neietekmē iNOS proteīna līmeni šūnās LPS inducētā iekaisuma apstākļos (Liang et al., 1999). *Al-Shalmani* un līdzautori eksperimentos ar izolētu cūkas aortu nekonstatē miricetīna spēju pēc LPS stimulācijas samazināt nitrītu līmeni, kas raksturīgs citiem testētajiem flavonoīdiem (Al-Shalmani et al., 2011).

Mūsu darbā konstatētā slāpekļa oksīda koncentrācijas palielināšanās asinīs (sk. 3.16. att.) nav pretrunā ar citu pētnieku rezultātiem. Miricetīns spēj reducēt  $Fe^{3+}$  par  $Fe^{2+}$  (Laughton et al., 1991), kas var iesaistīties Fentona reakcijā un radīt hidroksilradikāli apstākļos, kad ir paaugstināta ROS veidošanās. Tāpēc nav izslēgta miricetīna līdzdarbība LPS stimulētajā oksidatīvā stresa veicināšanā. Tāpat, paturot prātā iNOS mRNS līmeņa pazemināšanos aknās, nevar izslēgt, ka miricetīns aizkavēti inhibē iNOS produkciju. Varētu domāt, ka antioksidatīvā efekta realizācijai, ir nepieciešama audu piesātināšana ar miricetīnu.

#### 4.1.2.3. Kemferols

Mūsu darbā kemferols samazināja iNOS gēna ekspresiju aknās par 60% iekaisuma apstākļos, tomēr nerasniedzot statistisku ticamību (sk. 3.1. att.). iNOS proteīna samazinājums izpaudās izteiktāk iekaisušos aknu audos, pietuvojoties veselo dzīvnieku iNOS proteīna koncentrācijas līmenim (sk. 3.6. att.). Tādējādi mūsu *in vivo* dati sasaucas ar citu pētnieku *in vitro* datiem, kā, piemēram, peļu makrofāgos kemferols bloķē iNOS mRNS, iNOS proteīna ekspresiju un slāpekļa oksīda

produkciju pēc LPS stimulācijas, nomācot NF-κB un ierobežojot STAT1 aktivāciju (Liang et al., 1999; Hamalainen et al., 2007). Tomēr šī viela mūsu testētajā iekaisuma modelī i paaugstināja slāpekļa oksīda līmeni asinīs par 35% (sk. 3.15. att.) un neietekmēja NO<sup>•</sup> svārstības citos apskatītajos orgānos. Ir dati, kas pierāda, ka flavonoīdiem, polifenolu savienojumiem, piemīt prooksidatīvas īpašības (Galati et al., 1999). Vairākas peroksidāzes, piemēram, mieloperoksidāzes katalizē polifenolu oksidēšanos, veidojot prooksidatīvos fenoksilradikāļus, tie katalizē lipoproteīdu oksidāciju, proteīnu šķērssaišu, iekaisuma un aterosklerotiskās pangas veidošanos (Heinecke et al., 1993). Ir arī dati, ka fenoksilradikāļi, īpaši to polifenolu savienojumi, kas satur B gredzenu (Galati et al., 2002), inducē lipīdu peroksidāciju un glutaciona kooksidāciju (Goldman et al., 1999). Tādējādi var uzskatīt, ka kemferols ne tikai nomāc iNOS produkciju, bet arī pastiprina LPS izsaukto nitroztatīvo un oksidatīvo stresu asinīs. Tomēr nevar arī izslēgt iespējamo organisma aizkavēto reakciju uz antioksidanta ievadi vienlaicīgi ar LPS molekulu, secinot, ka veiksmīgam antioksidatīvām efektam ir nepieciešama organisma audu piesātinājums ar kemferolu.

#### **4.1.3. Flavonu grupas pārstāvju nitroztatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana**

##### **4.1.3.1. Baikaleīns**

Baikaleīns samazina iNOS proteīna, slāpekļa oksīda un iekaisuma citokīnu produkciju peļu makrofāgos, nomācot STAT1, STAT2 fosforilāciju un translokāciju uz šūnas kodolu - JAK/STAT signālceļa aktivāciju (Qi et al., 2013). Tāpat ir publicēti dati, ka baikaleīns (20 mg/kg) žurkām LPS inducētas sepses apstākļos samazina nitrātu/nitrītu līmeni serumā un iNOS proteīna ekspresiju aortas audos, sešas stundas pēc LPS injekcijas un piecas ar pusi stundas pēc baikaleīna ievades (Cheng et al., 2007). Šie paši autori ziņo par IκBα degradācijas samazināšanos un NF-κB aktivitātes nomākšanu peļu makrofāgos pēc LPS indukcijas baikaleīna klātbūtnē, tādējādi nomācos iNOS ekspresiju.

Mūsu iegūtie dati nav pretrunā ar publicētajiem datiem. Baikaleīns LPS iekaisuma apstākļos samazināja iNOS gēna ekspresijas līmeni aknās sešas reizes (sk. 3.1. att.), kā arī slāpekļa oksīda koncentrāciju sirdī 2 reizes (sk. 3.12. att.), līdzīgs

efekts bija arī nierēs (sk. 3.13. att.). Pārējos audos, kur analizējām baikaleīna ietekmi uz NO<sup>·</sup> produkciju, tika novērota tendence samazināt slāpekļa oksīda koncentrāciju (asinīs, plaušās) vai arī lielas svārstības starp paraugiem (aknās, smadzeņu garozā), kas varētu norādīt uz baikaleīna iNOS aktivitātes nomākšanas sākumposmu.

#### 4.1.3.2. Luteolīns

Interesanti dati ir publicēti par luteolīna ietekmi uz iNOS proteīna ekspresiju LPS inducētā plaušu iekaisuma apstākļos. Li un kolēģi parādīja luteolīna (70 μmol/kg) i/p ievade pusstundu pirms LPS inhalācijas uzrādīja sešas stundas pēc LPS injekcijas samazinātu iNOS proteīna ekspresiju, samazinot to gandrīz līdz veselo dzīvnieku līmenim, kā arī samazinājās arī iekaisuma citokīnu līmenis un COX-2 proteīnu saturs plaušās (Li et al., 2012). iNOS proteīna koncentrācijas samazināšanās luteolīna klātbūtnē LPS modelī ir arī novērota peļu makrofāgos (Hu and Kitts, 2004). Luteolīns nomāc NF-κB ceļa aktivāciju, tādējādi samazinot iNOS gēna transkripciju (Li et al., 2012). Luteolīns ietekmē ne tikai iekaisuma signālceļus, bet tam piemīt arī antioksidatīvas un antinitrozatīvas spējas (Cai et al., 1997; Ko et al., 1998; Lemanska et al., 2004; Odontuya et al., 2005), kas, iespējams, parādās mūsu darbā, kur mēs novērojam slāpekļa oksīda koncentrācijas pazeminājumu asinīs par 33%, salīdzinot ar LPS modeļa grupu. Lai luteolīns kā aktīvā viela varētu sasniegt mērķorgānus, ir nepieciešams samērā ilgs laika periods. Ir dati, ka, pēc luteolīna (14,3 mg/kg) ievadīšanas žurkām, tā maksimālā koncentrācija asinīs tiek sasniegta pēc 1,02±0,22 stundām un tā pussabrukšanas periods ir 4,94±1,2 stundas (Zhou et al., 2008). Plazmā luteolīns lielākoties ir atrodams kā konjugāts un aktīvā forma ir ļoti zemā koncentrācijā (Shimoi et al., 1998). Tātad, ja iNOS gēna transkripcijas līmenis pēc stimulācijas ar LPS pieaug aptuveni pēc divām stundām, bet iNOS proteīna pēc aptuveni četrām (Xie et al., 1992), tad varam secināt, ka luteolīna inhibējošo ietekmi uz iNOS gēna transkripcijas līmeni pēc mūsu veiktā eksperimenta jau varētu novērot, bet iNOS proteīna ekspresija varētu būt vēl palielināta un slāpekļa oksīda līmenis audos paaugstināts. Mūsu darbā mēs novērojam šādu ainu. Luteolīns (50 mg/kg) LPS inducētā iekaisuma apstākļos aknās samazināja iNOS gēna ekspresiju 9,5 reizes (sk. 3.2. att.) un iNOS proteīna līmeni – par 43% (sk. 3.5. att.), NO<sup>·</sup> līmeni statistiski ticami neietekmējot. Smadzeņu garozā luteolīns neuzrādīja iNOS gēna ekspresiju



modulējošu efektu iekaisuma apstākļos, bet tika novērotas lielas svārstības starp paraugiem. iNOS proteīna līmenis iekaisuma apstākļos smadzeņu garozā samazinājās uz pusi, bet statistiska ticamība netika sasniegta (sk. 3.7. att.). Savukārt slāpekļa oksīda koncentrācija smadzeņu garozā bija paaugstināta par 20%, salīdzinot ar LPS modeli (sk. 3.8. att.). Tādējādi var uzskatīt, ka mūsu darbā novērotā aizkavējusies orgānu atbildes reakcija uz luteolīna ievadi LPS iekaisuma apstākļos var tikt skaidrota ar luteolīna lēno absorbciju un metabolismu.

#### **4.1.3.3. Luteolīna kombinācija ar baikaleīnu**

Mēs savā darbā analizējām arī luteolīna 30 mg/kg un baikaleīna 30mg/kg kombinācijas ietekmi uz iNOS gēna ekspresiju un slāpekļa oksīda produkciju. iNOS gēna produkcijas līmenis iekaisušos aknu audos luteolīna un baikaleīna kombinācijas klātbūtnē samazinājās par 66% (sk. 3.3. att.), salīdzinot ar LPS kontroles grupu, bet statistisku ticamību nesasniedza. Slāpekļa oksīda koncentrācija paaugstinājās nierēs un asinīs LPS iekaisuma apstākļos, citos orgānos izteiktas tās svārstības netika novērotas, salīdzinot ar LPS modeļa grupu. Līdz ar to varam secināt, ka divu flavonu kombinācija, kas dažādos audos atsevišķi uzrāda slāpekļa oksīda pazeminošas īpašības, nav veiksmīga, analizējot tās ietekmi uz konkrēto modeli. Tomēr pievēršot uzmanību iNOS gēna ekspresijas līmeņa samazinājumam aknu audos, varētu prognozēt, ka pagarinot inkubācijas periodu vai arī ievadot vielas pirms iekaisuma modeļa izsaukšanas, varētu izpausties slāpekļa oksīda koncentrāciju samazinošas īpašības.

#### **4.1.4. Karotinoīdu nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana**

##### **4.1.4.1. Likopēns**

Neskatoties uz to, ka likopēns tiek uzskatīts par stipru antioksidantu (Wang, 2012), mūsu darbā tas neietekmēja slāpekļa oksīda līmeni audos LPS inducētā akūtā iekaisuma apstākļos. Mūsu iegūtie dati ir pretrunā *in vitro* pētījumiem, kur peritoneālos makrofāgos likopēna pievienošana nomāc LPS stimulēto NF-κB aktivāciju (Palozza et al., 2012), līdzīga aina tika novērota peļu makrofāgos (Rafi et

al., 2007). Mūsu darbā likopēns neietekmēja iNOS gēna ekspresiju LPS inducētajā iekaisuma modelī: aknās un smadzeņu garozā. Savukārt iNOS proteīna līmenis aknās samazinājās (sk. 3.5. att.), bet smadzeņu garozā bija samazinoša tendence. Likopēnam piemīt arī prooksidanta īpašības, kas, tiek uzskatīts, izpaužas ievadot vielu augstās koncentrācijās un oksidatīvā stresa apstākļos, kas izsauc prokancerogēnu aktivāciju, DNS oksidatīvos bojājumus, lipīdu peroksidāciju un mitohondriju aktivitātes izmaiņas (Wang, 2012). Neskatoties uz to, ka slāpekļa oksīda koncentrācija audos nesamazinājās pēc LPS un likopēna vienlaicīgas ievades, mēs nevaram ignorēt būtisku iNOS proteīna līmeņa samazinājumu, ko var novērot aknās. Mēs uzskatām, ka pastāv vēl neizpētīti likopēna aktivitātes ceļi, kas var regulēt, piemēram, iNOS mRNS stabilitāti vai iNOS proteīna aktivitāti.

#### **4.1.5. Polifenolu nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana**

##### **4.1.5.1. Resveratrols**

Mēs novērojām, ka, ievadot resveratrolu koncentrācijā 50 mg/kg p/o, žurku smadzeņu garozā slāpekļa oksīda koncentrācija paaugstinājās divkārt, smadzenītēs par 84 %, aknās par 97%, sirdī par 89%, nierēs par 96%, sēkliniekos par 93%, asinīs par 50%, plaušās par 74%, liesā par 125%, šķērsvītrotajā muskulatūrā par 94% iekaisuma apstākļos, salīdzinot ar LPS kontroles grupu (sk. 3.1.5. nod.).

Savukārt citu autoru publicētajos datos, kur resveratrols ievadīts (20 mg/kg, i/p, katru dienu) nedēļu pirms iekaisuma inducēšanas ar LPS, novēro slāpekļa oksīda līmeņa samazinājumu dzīvnieku aknās 24 stundas pēc iekaisuma inducēšanas, gandrīz sasniedzot kontroles grupas līmeni (Sebai et al., 2010), līdzīgos apstākļos novērots slāpekļa oksīda samazinājums pēc preinkubācijas ar resveratrolu smadzenēs un plazmā (Sebai et al., 2009b). Šie paši autori ziņo arī par resveratrola (40 mg/kg) slāpekļa oksīda koncentrāciju samazinošu ietekmi aktivitāti asins plazmā, ievadot to vienlaicīgi ar LPS un mērot NO līmeni pēc 24 stundām, līdzīgu ainu novēro arī miokardā (Sebai et al., 2009a; Sebai et al., 2011).

Tomēr ir arī ziņojumi par resveratrola prooksidatīvajām īpašībām. *In vitro*, kur palielinoties resveratrola koncentrācijai H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> un Cu(II) jonu klātbūtnē, Fentona reakcija, plazmīdas DNS bojājumu līmenis paaugstinās; līdzīgu ainu novēro arī,

inkubējot resveratrolu tikai ar vara joniem (Win et al., 2002). Citi autori arī parāda tā spēju reaģēt ar vara kompleksiem, izraisot brīvo radikāļu veidošanos. Tie inducē DNS bojājumus kodolā, kur ir augsta vara koncentrācija, un sekojošu punktveida mutāciju veidošanos (Ahmad et al., 2005). Interesants ir fakts, ka resveratrols var aktivēt arī nNOS, tādējādi palielinot slāpekļa oksīda daudzumu tiešā veidā (Fotiou et al., 2010).

Apkopojot augstāk minētos datus, mūsu rezultāti vairs neliekas tik pretrunīgi. Resveratrols pats par sevi izraisa oksidatīvo stresu, līdzdarbojoties LPS inducētajam iekaisumam. Ņemot vērā to, ka audu paraugi tika ņemti tikai četras stundas pēc resveratrola ievades, tā iNOS ekspresiju regulējošās īpašības varēja vēl neizpausties spēcīga oksidatīvā un nitrozatīvā stresa apstākļos vai/arī resveratrola un LPS inducēties ROS stimulēja iNOS ekspresiju caur Nrft2 signālceļa aktivāciju.

#### 4.1.5.2. Ellagskābe

Citu pētnieku publicētajos datos redzams, ka ellagskābes aktivitāte tiek pētīta lielākoties ekstraktu sastāvā, piemēram, granātābolu, kur ir augsta šīs vielas koncentrācija. Ellagskābe *in vitro* parāda slāpekļa oksīda un superoksīda radikāļa neitralizējošas īpašības LPS stimulētos makrofāgos (Wang et al., 2012). Tomēr ir pētījumi, kur granātābolu ekstrakts ir vairāk potents neitralizēt slāpekļa oksīdu nekā tīrā viela LPS stimulētos peļu makrofāgos (Shukla et al., 2008; Panichayupakaranant et al., 2010). Citi autori parāda, ka ellagskābe 100 mg/kg, kas injicēta i/p divas stundas pirms iekaisuma modeļa inducēšanas, samazina slāpekļa oksīda metabolītu, nitrātu un nitrītu, saturu žurku ķepas iekaisuma audos, kā arī samazina NF-κB gēna un proteīna ekspresiju žurkās inducētā iekaisuma audos (El-Shitany et al., 2014). Savukārt ir arī dati, ka ellagskābe granātābolu ekstrakta sastāvā aktivizē eNOS pelēs ar hiperholesterīnēmiju, kā rezultātā notiek pastiprināta slāpekļa oksīda sintēze (de Nigris et al., 2005).

Mūsu darbā LPS iekaisuma apstākļos ellagskābe paaugstināja slāpekļa oksīda līmeni dažādos audos, salīdzinot ar LPS kontroles grupu: smadzeņu garozā par 40%, aknās par 55%, sirdī par 38%, nierēs par 51%, sēkliniekos par 62%, asinīs par 25%, liesā par 85% un šķērsvītrotajā muskulatūrā par 54% (sk. 3.1.5. nod.). Salīdzinot mūsu iegūtos datus ar publicētajiem, varam secināt, ka ellagskābes deva ir pārāk zema

un ir nepieciešama vielas preventīva ievade, lai nomāktu ar NF-κB starpniecību LPS stimulēto slāpekļa oksīda produkciju.

#### **4.1.5.3. Kafijskābes esteris**

Kafijskābes estera, polifenola, ievade mūsu darbā LPS inducētā iekaisuma apstākļos izsauca slāpekļa oksīda līmeņa samazināšanos smadzeņu garozas audos par 21% (sk. 3.9. att.), smadzenītēs par 28% (sk. 3.10. att.), liesā par 20% (sk. 3.18. att.), pārējos testētos audos šī viela neizraisīja statistiski ticamas slāpekļa oksīda koncentrācijas svārstības. Iegūtie dati sasaucas ar citu autoru publicētajiem datiem, kur *in vitro* LPS stimulētos žurku hepatocītos un peļu makrofāgos kafijskābes esteris, nomācot NF-κB signālceļu, samazina iNOS gēna un proteīna ekspresiju, kā arī slāpekļa oksīda sintēzi (Nagaoka et al., 2003; Lee et al., 2010; Zhao et al., 2014).

#### **4.1.6. Alkoloīdu nitrozatīvā stresa modulējošo īpašību izvērtēšana**

##### **4.1.6.1. Indol-3-karbinols**

Mūsu darbā četras stundas pēc indol-3-karbinola 50 mg/kg p/o un LPS i/p ievades žurkās, konstatējām iNOS gēna ekspresijas līmeņa palielinājumu par 73% aknās (sk. 3.1. att.) un 3,5 reizes smadzeņu garozā (sk. 3.4. att.), salīdzinot ar iNOS mRNS līmeni LPS modelī. Savukārt iNOS proteīna līmenis pēc indol-3-karbinola ievades samazinājās par 30% aknās (sk. 3.5 att.), smadzeņu garozā – uz pusi (sk. 3.7. att.), tomēr nerasniedzot statistiskas ticamības sliekšni. NO<sup>•</sup> produkcija indol-3-karbinola ietekmē paaugstinājās aknās (sk. 3.11. att.), smadzeņu garozā (sk. 3.9. att.), sirdī (sk. 3.12. att.), nierēs (sk. 3.13. att.), sēkliniekos (sk. 3.14. att.), asinīs (sk. 3.16. att.), plaušās (sk. 3.17. att.) un šķērsvītrotajā muskulatūrā (sk. 3.19. att.).

Salīdzinot ar citu pētnieku datiem, nākas secināt, ka mūsu dati ir pretrunā ar *in vitro* darbiem, kur peļu makrofāgos pēc stimulācijas ar LPS un apstrādes ar indol-3-karbinolu, slāpekļa oksīda, iNOS mRNS un iNOS proteīna līmenis samazinās (Tsai et al., 2010; Jiang et al., 2013). Ir publicēti dati, ka indol-3-karbinols inhibē Akt signālceļu, kura aktivācija var nomākt vairāku proapoptotisku faktoru aktivāciju. Inhibējot Akt proteīna fosforilāciju, indol-3-karbinols samazina IKK aktivāciju un

NF- $\kappa$ B fosforilāciju. Tomēr šie dati ir iegūti darbā ar vēža šūnām (Sarkar and Li, 2004). Autori arī ziņo, ka indol-3-karbinols uzrāda inhibējošu efektu uz MAPK signālceļu prostatas vēža šūnās, savukārt citi pētnieki, analizējot indol-3-karbinola ietekmi uz MAPK signālceļu peļu makrofāgos, šādu saistību neatklāj (Jiang et al., 2013). Izpētot publicētos datus par indol-3-karbinola farmakodinamiku grauzējos, konstatējām, ka indol-3-karbinols sasniedz maksimālo koncentrāciju asinīs jau pēc 15 min pēc 250 mg/kg ievadīšanas pelēm, savukārt citos pētījumos to neizdevās konstatēt tā ātrās oligomerizācijas dēļ. Pēc absorbcijas viela tiek nogādāta aknās, nierēs, plaušās, sirdī, smadzenēs. Interesanti atzīmēt, ka ir dati, ka smadzenēs un aknās tā koncentrācija ir augstāka nekā asins plazmā vai asinīs (Ratnam et al., 2006). Tādējādi izvērtējot šos datus, secinām, ka mūsu darbā indol-3-karbinols LPS inducētajā sepses modelī ir jau veicis savas antioksidatīvās un slāpekļa oksīda koncentrāciju samazinošās funkcijas, balstoties uz augstākminētajiem *in vitro* publicētajiem datiem. Bet tā kā tas tika ātri metabolizēts žurku organismā, sekojoši tā efekts tika kompensēts ar pastiprinātu iNOS mRNS sintēzi un slāpekļa oksīda produkciju. Nevar arī izslēgt regulatoros efektus, kas ir zināmi citiem antioksidantiem, kur viela veicina lipopolisaharīdu inducēto slāpekļa oksīda produkciju, aktivējot proteīnkināzi C (Fukuzawa et al., 2004).

#### **4.1.6.2. Indol-3-karbinola kombinācija ar kvercetinū**

Kvercetīns tiek uzskatīts par vienu no spējīgākajiem antioksidantiem starp dabas vielām, bet indol-3-karbinols nomāc brīvo radikāļu veidošanos organismā (Ratnam et al., 2006), tādējādi pastiprinot viens otra antioksidatīvās īpašības.

Aknās iNOS mRNS līmenis pēc šīs kombinācijas (indol-3-karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg) ievades neuzrādīja statistiski ticamas svārstības ne kontroles, ne LPS modeļa grupās. Savukārt daudzos žurku orgānos, smadzeņu garoza (sk. 3.20. att.), smadzenītes (sk. 3.21. att.), aknas (sk. 3.22. att.), sirds (sk. 23. tt.), nieres (sk. 3.24. att.), sēklinieki, asinis, plaušas (sk. 3.25. att.), šķērsvītrotā muskulatūra (sk. 3.27. att.), šī kombinācija izteikti samazināja slāpekļa oksīda koncentrāciju. Vielu kombinācija, kur indol-3-karbinols bija 25 mg/kg un kvercetīns 50 mg/kg neuzrādīja slāpekļa oksīda koncentrāciju modulējošas īpašības. Bet vielu kombinācija pretējās koncentrācijās (indol-3-karbinols bija 50 mg/kg un kvercetīns 25

mg/kg) paaugstināja slāpekļa oksīda saturu žurku smadzeņu garozā, aknās, sirdī, nierēs, liesā un šķērsvītrotajā muskulatūrā. Šīs kombinācijas veiksmīgais slāpekļa oksīdu samazinošais efekts šajā modelī abu vielu 50 mg/kg koncentrācijās varētu būt skaidrojams ar to, ka indol-3-karbinols tiek ātri absorbēts un metabolizēts, tā antioksidatīvais efekts izpaužas vienlaicīgi ar LPS inducēto organisma stresu, savukārt kvercētīns uzrāda savas slāpekļa oksīda koncentrāciju samazinošās īpašības vēlākā laika periodā, tādējādi turpinot indol-3-karbinols iesākto procesu.

#### **4.2. 1, 4- dihidropiridīna atvasinājumu antioksidatīvo un DNS pasargājošo spēju analīze**

##### **4.2.1. Streptozotocīna izsauktā 1. tipa cukura diabēta modeļa raksturojums**

Injicējot vienreizēji Wistar līnijas žurkām 50 mg/kg streptozotocīna 10 mM Na citrāta buferī un veicot glikozes koncentrācijas kontroli 48 stundas pēc injekcijas, tika konstatēts vidējais glikozes pieaugums asinīs lielāks par 13,89 mmol/l, kas liecināja par 1. tipa cukura diabēta attīstību modeļa grupā (pielikums Nr. 2). Tādējādi mēs panācām glikozes līmeņa paaugstināšanos, kā rezultātā šūnas veidojas mitohondriālas ģenēzes ROS (Yan, 2014). Ir ziņojumi, ka ROS nomāc eNOS fosforilēšanu (Du et al., 2001), kā rezultātā paaugstinās superoksīda radikāļa veidošanās intensitāte, tiek samazināta eNOS mRNS transkripcija un proteīna ekspresija. Paaugstinoties ROS, tiek aktivēta AP-1 transkripcijas faktora migrācija uz DNS, kas samazina eNOS gēna transkripciju (Srinivasan et al., 2004). Mūsu darbā pēc 12 dienu STZ inducētā diabēta, eNOS gēna mRNS līmenis samazinājās par 30% (sk. 3.32.att.) un eNOS proteīna līmenis – par 67,5% nierēs (sk. 3.39. att.), norādot uz endoteliālās disfunkcijas attīstību šajā orgānā. Pārējos analizētajos orgānos (acis, sirds, nervi) nekonstatējām būtiskas eNOS izmaiņas starp veselajiem dzīvniekiem un ar STZ modulēto 1. tipa cukura diabētu. eNOS proteīna samazinātā aktivācija un gēna nomāktā aktivācija, samazina šajā stadijā slāpekļa oksīda produkciju endoteliālajās šūnās, ko mūsu darbā parāda nitrātu/nitrītu līmeņa kritums par 48% diabētisko žurku urīnā, salīdzinot ar veselajiem dzīvniekiem (sk. 3.40. att.). Atjūgtā eNOS nierēs ražo lielā daudzumā superoksīdradikāli slāpekļa oksīda vietā, tas reaģē ar slāpekļa oksīda molekulu, tādā veidā samazinot NO<sup>•</sup> ekskrēciju ar urīnu (Ishii et al., 2001). Nierēs 2

nedēļas pēc 1. tipa cukura diabēta ierosināšanas *Ishii* un kolēģi konstatēja superoksīddismutāzes aktivitātes, superoksīda radikāļa un nitrotirozīna līmeņu pieaugumu, norādot uz eNOS atjūgšanos un peroksinitrīta līmeņa paaugstināšanos audos (*Ishii et al.*, 2001). Audos tā klātbūtni netiešā veidā var detektēt pēc nitrotirozīna klātbūtnes (*Pacher et al.*, 2007). Tomēr asins serumā izteikta līmeņu atšķirība netika novērota (sk. 3.41. att.), ko parādījuši arī citi autori (*Ishii et al.*, 2001). Hiperglikēmija vēl nav izraisījusi eNOS ekspresijas un aktivitātes izmaiņas lielākajā daļā no dzīvnieku kardiovaskulārās sistēmas, ko parāda neizmainīta eNOS proteīna ekspresija sirds audos cukura diabēta dzīvniekiem (sk. 3.39. att.).

Mūsu darbā iNOS gēna ekspresija palielinājās hiperglikēmijas apstākļos par 166% (sk. 3.35. att.) un iNOS proteīns – par 144% nierēs, salīdzinot ar veselajiem dzīvniekiem, kā arī sirds audos iNOS proteīna līmenis palielinājās par 188%, bet acīs un nervos iNOS proteīna būtiskas koncentrācijas izmaiņas nekonstatējām (sk. 3.38. att.). Tas sasaucas ar jau publicētajiem datiem, kur pēc cukura diabēta indukcijas ar STZ ir konstatēts iNOS proteīna pieaugums, bet eNOS proteīna samazinājums žurku kardiovaskulārajos audos (*Nagareddy et al.*, 2005). Palielināta glikozes koncentrācija šūnā aktivē NF- $\kappa$ B ceļu (*Spitaler and Graier*, 2002), kā rezultātā tiek stimulēta arī iNOS gēna transkripcija un proteīna ekspresija (*Varsha et al.*, 2015). Mūsu laboratorijā veiktajos pētījumos pēc 12 dienu hiperglikēmijas slāpekļa oksīda līmenis palielinās žurku nierēs, asinīs, šķērsvītrotajā muskulatūrā un aknās (*Sokolovska*, 2014). Tādējādi hiperglikēmijas izsuktā eNOS dimēra atjūgšanās, prooksidatīvo enzīmu darbības stimulācija, glikolīzes starpproduktu izsuktā brīvo radikāļu veidošanās utt. (*Spitaler and Graier*, 2002; *Srinivasan et al.*, 2004; *Pacher et al.*, 2007), vēl vairāk veicina paaugstinātu superoksīda anjona veidošanos un iNOS sintezētā slāpekļa oksīda pieaugums un peroksinitrīta veidošanos. Peroksinitrīts izraisa tiešā veidā un pastarpināti šūnas lielo molekulu: DNS, lipīdu, proteīnu, bojājumus. Peroksinitrīts augstās koncentrācijās var izsukt DNS bojājumus, fragmentēšanos, kas var novest līdz pat šūnas nāvei (*Pacher et al.*, 2007). Mūsu darbā mēs esam detektējuši ar vienas šūnas elektroforēzes metodi sārmainos apstākļos pēc 12 dienu ilgas hiperglikēmijas vienpavediena DNS pārrāvumus venozo asiņu šūnu kodolos, kas pārsniedza DNS bojājumu līmeni kontroles dzīvniekos par 206% (sk. 3.29. att.).

Tādējādi mēs secinām, ka 1. tipa cukura diabēta modelis ir izveidots veiksmīgs, lai izvērtētu mūsu analizējamās vielu spēju modulēt iNOS un eNOS līmeņus un novērst DNS molekulas bojājumus.

#### 4.2.2. Glutapirons

Baltkrievijas zinātnieki ziņo par glutapirona (5-10 mM) spēju novērst abāzisku vietu veidošanos DNS molekulā, pasargājot no gēnu mutācijas un hromosomāliem bojājumiem (Kuzhir and Goncharova, 1997). Turklāt glutapirons varētu inducēt DNS reparējošo enzīmu darbību (Kuzhir et al., 1999). Glutapirons samazina audzēju daudzumu un to spektru žurkām, kas pakļautas hroniskam gamma starojumam (Vartanian et al., 2004). Glutapirons samazina mutagēna inducēto mikrokodolu, kas norāda uz hromosomāliem bojājumiem, veidošanos peļu eritroblastos 24 h pēc ievades (470,4 mg/kg) (Goncharova et al., 2001). Tādējādi varētu domāt, ka glutapirons ir DNS reparāciju veicinoša molekula.

Tomēr mūsu dati parādīja, ka pēc glutapirona ievades koncentrācijā 0,05 mg/kg DNS vienpavediena pārrāvumu līmenis veselo žurku venozo asiņu šūnu kodolos palielinājās 4,4 reizes, salīdzinot ar kontroles grupu (sk. 3.31. A. att.), bet pie desmit reizes lielākas devas (0,5 mg/kg) DNS bojājumu līmenis pārsniedza kontroles grupas skaitļus 3,3 reizes (sk. 3.31. B. att.). Tas norāda uz analizējamās vielas spēju inducēt DNS bojājumus. Ievadot glutapironu 0,05 mg/kg koncentrācijā DNS vienpavediena bojājumu līmenis paaugstinājās arī 1. tipa cukura diabēta apstākļos, bet ne tik izteikti kā veselajos dzīvniekos – par 36%, salīdzinot ar STZ modeļa grupu (sk. 3.31. A. att.). Palielinot vielas koncentrāciju desmit reizes (0,5 mg/kg), DNS vienpavedienu bojājumu pieauguma līmenis STZ grupā samazinājās līdz 21% (sk. 3.31. B. att.). Varētu domāt, ka glutapirona ievadītā koncentrācija bija pārāk zema, arī salīdzinot ar publicētiem datiem (Goncharova et al., 2001).

Izvērtējot datus par glutapirona ietekmi uz iNOS gēna ekspresiju, kur iNOS mRNS līmenis pēc glutapirona ievades koncentrācijās 0,05 mg/kg un 0,5 mg/kg paaugstinājās par 166% un 100%, attiecīgi, veselo dzīvnieku nierēs, parādot iNOS gēna ekspresiju paaugstinošo tendenci (sk. 3.37. A., B. att.). Arī dzīvniekos ar 1. tipa cukura diabēta modeli iNOS gēna pieauguma tendence samazinās, paaugstinot glutapirona koncentrāciju. Interessants ir fakts, ka glutapirons koncentrācijā 0,05



mg/kg veselajiem dzīvniekiem samazināja eNOS mRNS ekspresijas līmeni zemāku par to STZ modeļa grupā (sk. 3.34. A. att.), bet paaugstinot ievadāmo glutapirona koncentrāciju līdz 0,5 mg/kg, uzrādījās eNOS mRNS ekspresiju stimulējoša aktivitāte nierēs (sk. 3.34. B. att.). Glutapirons 1. tipa cukura diabēta apstākļos eNOS mRNS līmeni statistiski ticami neietekmēja nevienā no analizētajām koncentrācijām (sk. 3.34. A., B. att.), bet tika novērota samazinoša tendence, salīdzinot ar STZ modeļa grupu. Tas varētu norādīt uz glutapirona spēju nomākt eNOS mRNS transkripciju un eNOS dimēra atjūgšanos, kas ir raksturīgs endoteliālās disfunkcijas apstākļos (Förstermann, 2010), kas izraisa superoksīda radikāļu pieaugumu audos. Pieaugot slāpekļa oksīda un superoksīda anjona koncentrācijai, veidojas peroksinitrīta molekula, kas ir pats stiprs oksidētājs, kā arī sadalās par reaktīvajiem brīvajiem radikāļiem, kas izteikti bojā šūnas lielās molekulas tai skaitā arī DNS.

Glutapirons neuzrāda spēju neitralizēt hidroksilradikāli Fentona reakcijas apstākļos, kas tika analizēts ar EPR spektrometriju (sk. 3.44. att.), kā arī neaizsargāja nevienā no analizējamām koncentrācijām plazmīdas DNS molekulu Fentona reakcijas apstākļos (pielikums Nr. 4). Klimavičiusa un viņas kolēģi savā darbā ar smadzenīšu šūnām parādīja, ka glutapirons nepasargā tās no mākslīgi izsuktā intracelulārā oksidatīvā stresa, salīdzinot, piemēram, ar cerebrokrastu (Klimaviciusa et al., 2007), kas arī mūsu darbā *in vitro* eksperimentos uzrādīja DNS aizsargājošas īpašības (sk. 3.43. att.).

Tātad mūsu darbā glutapirons neuzrādīja hidroksilradikāli neitralizējošas, iNOS un eNOS ekspresiju atjaunojošas un DNS molekulas integritāti pasargājošas īpašības.

#### 4.2.3. J-9-125

Ir publicēti dati par 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumu DNS pasargājošām īpašībām gan oksidatīvā stresa apstākļos, gan dažādu ķīmisku mutagēnu, gan jonizējošā starojuma ietekmē (Dalivelya et al., 2006; Ryabokon et al., 2008; Wojewodzka et al., 2009). Nifedipīns, kas ir kalcija kanālu blokators, samazina angiotenzīna II inducēto NF- $\kappa$ B saistīšanos pie DNS, nomācot I $\kappa$ B $\alpha$  un I $\kappa$ B $\beta$  degradāciju, izolētās žurku aortas gludās muskulatūras šūnās (Wu et al., 2006). Tādējādi varētu domāt, ka citiem 1,4-DHP atvasinājumiem arī varētu būt šo

signālceļu regulējošas īpašības, kas savukārt varētu ietekmēt iNOS ekspresiju (Jobin and Sartor, 2000). Ir arī dati par 1,4-DHP antioksidatīvām īpašībām (Klimaviciusa et al., 2007). Ryabokon un viņas kolēģi ir uzrādījuši šo atvasinājumu spēju reparēt ūdeņraža pārskābes un jonizējošā starojuma izsauktus DNS bojājumus cilvēka limfocītos (Ryabokon et al., 2005).

J-9-125 ir 1,4-DHP atvasinājums, kas ir sintezēts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā un kura īpašības mūsu darbā tiek izvērtētas pirmo reizi. Tas ir darīts ar mērķi noskaidrot šīs vielas ietekmi uz nitrozoatīvo stresu, īpaši uz iNOS un eNOS regulatoriem procesiem un tās spēju ietekmēt DNS integritāti *in vivo*.

Izanalizējot datus, mēs ieguvām interesantu ainu. J-9-125 koncentrācijā 0,05 mg/kg samazina DNS vienpavediena bojājumu līmeni cukura diabēta apstākļos venozo asiņu šūnu kodolos, bet, pieaugot koncentrācijai, aizsargājošais efekts zūd un parādās bojājumus stimulējoša darbība (sk. 3.31. C., D. att.). J-9-125 0,05 mg/kg cukura diabēta apstākļos uzrādīja tendenci samazināt iNOS gēna ekspresiju (sk. 3.37. C., D. att.), kas zūd paaugstinoties devai līdz 0,5 mg/kg. Tātad varētu spriest, ka J-9-125, samazinot iNOS gēna ekspresiju, nomāc paaugstināto slāpekļa oksīda veidošanos, līdz ar to nepieļaujot peroksinitrīta molekulas bojājošo efektu uz DNS molekulu. Tomēr ir mūsu darbā mēs konstatējām, ka J-9-125 koncentrācijā 0,05 mg/kg statistiski ticami samazina eNOS gēna mRNS līmeni cukura diabēta apstākļos, kas varētu būt bīstami, norādot uz eNOS dimēra atjūgšanos un superoksīda radikāļa paaugstinātu produkciju, savukārt, paaugstinot J-9-125 koncentrāciju desmit reizes, šāds efekts netika novērots (sk. 3.34. C., D. att.).

Veselajos dzīvniekos J-9-125 izraisīja DNS pārrāvumu skaita pieaugumu: 0,05mg/kg divkārtīgu DNS vienpavediena bojājumu pieaugumu, bet desmit reizes lielākas devas ietekmē (0,5 mg/kg) bojājumu līmenis pieauga par 332%, salīdzinot ar veselo dzīvnieku kontroles grupu (sk. 3.31. C., D. att.). Tas sasauca ar iNOS gēna ekspresiju paaugstinām tendencēm šajās grupās (sk. 3.37. C., D. att.), bet eNOS gēna ekspresija grupā, kur ievadīja J-9-125 0,05 mg/kg, uzrādīja tendenci paaugstināties, savukārt, kur veseliem dzīvniekiem ievadīja J-9-125 0,5 mg/kg samazināja eNOS gēna līmeni līdz līmenim, kas tika sasniegts žurkās cukura diabēta apstākļos (sk. C., D. 3.34. att.). Tātad paaugstinot vielas koncentrāciju tiek panākta iNOS gēna ekspresijas stimulācija, kas izraisa NO<sup>•</sup> paaugstinātu veidošanos, eNOS gēna ekspresijas nomākšana, kas varētu nozīmēt, ka NO<sup>•</sup> vietā eNOS ražo superoksīda

radikāli, kā rezultātā veselajos dzīvniekos paaugstinās peroksinitrīta veidošanās un DNS bojājumu līmenis. Tādējādi mēs uzskatām, ka J-9-125 ir potenciāla DNS molekulu pasargājoša viela, kuras īpašības ir vērts apskatīt *in vivo* vēl zemākās devās.

Šī viela neuzrādīja arī antiradikālu un DNS molekulu pasargājošas īpašības Fentona reakcijas apstākļos (Pielikums nr. 4).

#### 4.2.4. Metkarbatons

Balstoties uz publicētajiem datiem par LOSI sintezēto 1,4-DHP DNS aizsargājošām un antioksidatīvām īpašībām, mēs turpinājām pētīt arī citus 1,4-DHP atvasinājumus gan *in vitro*, gan *in vivo* modeļos.

Metkarbatons bija vienīgā viela, kura, analizējot ar EPS spektrometrijas metodi Fentona reakcijas apstākļos, uzrādīja hidroksilradikāli neitralizējošas īpašības 1 mM un 0,5 mM koncentrācijās (sk. 3.44. att.). Tomēr zemākās (0,1 mM un 0,05 mM) koncentrācijās tā nesamazināja DMPO pīķi, kā arī nepasargāja DNS molekulu no Fentona reakcijas izraisītajiem bojājumiem *in vitro* nevienā no analizētām koncentrācijām (sk. 3.45. att.). Savukārt mūsu *in vivo* darbā metkarbatons (0,5 mg/kg) parādīja pārsteidzošu rezultātu, samazinot DNS vienpavediena bojājumus STZ inducētā cukura diabēta apstākļos perifēro asiņu šūnu kodolos (sk. 3.30. B. att.). Tas gāja roku rokā ar eNOS gēna ekspresijas līmeņa atjaunošanos līdz veselo dzīvnieku eNOS mRNS ekspresijas līmenim, kas gan nerasniedza statistiskās ticamības robežu (sk. 3.33. D. att.). Metkarbatons (0,5 mg/kg) stimulē eNOS gēna ekspresiju nierēs un, varētu domāt, arī dimerizāciju, tādā veidā samazinot superoksīda radikāļa koncentrāciju audos un peroksinitrīta veidošanos, līdz ar to arī samazinot DNS bojājumu līmeni asinīs. Neskatoties uz to, ka tas ir uzrādījis izteiktas iNOS gēna līmeņa paaugstinājošas īpašības (sk. 3.36. D. att.).

Grupā ar 1. tipa cukura diabēta modeli, kur ievadīja metkarbatonu 0,05 mg/kg, nieru audos konstatēja eNOS gēna ekspresijas līmeņa vēl lielāku samazinājumu (sk. 3.33. C. att.) nekā tas bija STZ modeļa grupā, kā arī netika novērots DNS molekulu pasargājošs efekts (sk. 3.30. A. att.). iNOS gēna ekspresijas līmenis ir statistiski ticami paaugstināts (sk. 3.36. D. att.).

Veselajos dzīvniekos abās koncentrācijās metkarbatons izraisīja DNS vienpavediena pārrāvumu līmeņa paaugstinājumu asinīs (sk. 3.30. A., B. att.),

neietekmējot eNOS gēna ekspresiju (sk. 3.33. C., D. att.) un izraisot tendenci paaugstināties iNOS gēna līmeņiem (sk. 3.36. C., D. att.).

Tādējādi mēs uzskatām, ka metkarbatons, neskatoties uz to, ka ir paaugstināts slāpekļa oksīda līmenis audos, pasargā DNS molekulu asins šūnās, atjaunojot eNOS mRNS ekspresijas līmeni un veicinot eNOS proteīna dimerizācijas procesu, tādā veidā samazinot ROS veidošanos. Turpinot pētījumu būtu nepieciešams izpētīt fosforilētā eNOS proteīna līmeni audos, lai noskaidrotu, vai metkarbatons ir novērsis eNOS atjūgšanos, un DNS reparācijas fermentu aktivitāti.

#### 4.2.5. Etkarbatons

Etkarbatons vēl viens LOSI sintezēts 1,4-DHP atvasinājums tika izvēlēts kā karbatona un metkarbatona līdzinieks, lai noskaidrotu, vai tam piemīt antioksidatīvas un DNS molekula pasargājošas īpašības *in vivo*.

Diemžēl nākas secināt, ka etkarbatons abās koncentrācijās (0,05 un 0,5 mg/kg), bet izteiktāk – augstākajā vielas devā, stimulēja DNS pārrāvumu veidošanos gan veselām žurkām, gan dzīvniekiem ar 1. tipa cukura diabētu (sk. 3.30. C., D. att.). Etkarbatons arī paaugstināja eNOS gēna ekspresiju nierēs cukura diabēta apstākļos par 71% (0,05 mg/kg) un 86% (0,5 mg/kg), salīdzinot ar STZ modeļa grupu, pārsniedzot pat veselo dzīvnieku eNOS gēna ekspresijas līmeni (sk. 3.33. A., B. att.). Turpretī iNOS gēna ekspresija statistiski ticami netika ietekmēta nevienā no grupām. Cukura diabēta apstākļos 0,5 mg/kg etkarbatona ievade uzrādīja pat tendenci samazināt iNOS gēna ekspresiju, salīdzinot ar STZ modeļa grupu (sk. 3.36. B. att.). Tādējādi ir grūti spriest par mehānismiem, kā etkarbatons inducē DNS vienpavediena bojājumus venozo asiņu kodolu saturošajās šūnās. Etkarbatons varētu piemist prooksidatīvas īpašības, kuru izpausme pastiprinās līdz ar ievadītās vielas koncentrācijas paaugstināšanos.

#### 4.2.6. AV-153-Na

AV-153-Na uzrāda antioksidatīvas un antimutagēnas īpašības. Pētījumā, kur kāpuri tika pakļauti stipra mutagēna iedarbībai, tas pasargāja DNS molekulu no punktveida mutācijām, hromosomāliem pārrāvumiem (Goncharova and Kuzhir,

1989). Šie autori arī parādīja, ka iepriekšminētais efekts nav saistīts ar tiešu AV-153-Na mijiedarbību ar mutagēnu. Pēc citu autoru datiem AV-153-Na inducē PARP1 – enzīmu, kas ir iesaistīts DNS reparācijas procesos - un samazina DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni pēc ūdeņraža pārskābes un gamma starojuma iedarbības zemās koncentrācijas, nM, kā arī dažādās šūnu līnijas uzrāda atšķirīgu jutību pret preparātu (Ryabokon et al., 2005).

Taču mūsu *in vivo* darbā AV-153-Na koncentrācijā 0,5 mg/kg neparādīja DNS protektīvas īpašības. Veselajos dzīvniekos tas DNS vienpavediena bojājumu biežumu palielināja 4,9 reizes, bet cukura diabēta apstākļos – par 49% (sk. 3.29. att.). Izanalizējot datus, secinājām, ka ievadot dzīvniekiem, iespējams, pārlietu lielu AV-153-Na koncentrāciju, šūnās pastiprinās poli-ADP-ribozes polimēru veidošanās, ko papildus vēl stimulē DNS bojājumi, ko izraisa augstais ROS līmenis 1. tipa cukura diabēta apstākļos. Izsmelot šūnas enerģijas rezerves, var attīstīties šūnas nekroze. Ryabokon un kolēģi ziņo par AV-153-Na apoptozi stimulējošām īpašībām (Ryabokon et al., 2009). Pārstimulētais PARP1 var izraisīt iekaisuma gēnu transkripcijas aktivēšanu un proteīnu sintēzi, tādējādi vēl vairāk pastiprinot oksidatīvo un nitrozatīvo stresu (Pacher et al., 2007).

Mūsu pētījumā AV-153-Na (0,5 mg/kg) veselo dzīvnieku nierēs izsauca lielas iNOS gēna ekspresijas svārstības ar tendenci paaugstināties (sk. 3.35. A. att.), kā arī stabilu iNOS proteīna palielinājumu par 144%, salīdzinot ar veselo dzīvnieku kontroli (sk. 3.35. att.). Tātad AV-153-Na pastarpināti stimulē iNOS ekspresiju un slāpekļa oksīda produkciju nierēs, par ko liek domāt tendence  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  līmenim paaugstināties veselo žurku urīnā (sk. 3.40. A. att.). Arī cukura diabēta apstākļos AV-153-Na izraisīja lielas iNOS mRNS svārstības starp paraugiem ar tendenci paaugstināties (sk. 3.35. A. att.). Tomēr iNOS proteīna ekspresiju nierēs AV-153-Na samazināja līdz kontroles dzīvnieku rādītājiem (sk. 3.38. B. att.). Līdzīga aina ir sirds muskulī, kur iNOS proteīna līmenis samazinājās par 67,7% (sk. 3.38. A. att.). AV-153-Na 0,5 mg/kg normalizēja arī STZ inducētā cukura diabēta apstākļos eNOS gēna un proteīna ekspresiju nierēs, sasniedzot kontroles grupas skaitļus proteīnu līmenī (sk. 3.39. att.). Ir publicēti dati par 1,4-DHP atvasinājuma antihipertensīva preparāta amlodipīna spēju kavēt iNOS proteīna ekspresiju, nomācot NF- $\kappa$ B un MAPK signālceļus, un samazināt nitrotirozīna līmeni audos; vienlaicīgi amlodipīns stimulē eNOS gēna ekspresiju hiperglikēmijas apstākļos cilvēku limfocītos *ex vivo* (Toma et

al., 2011). Viens no mehānismiem, kas izraisa eNOS aktivāciju, ir amlodipīna spēja disociēt eNOS/kaveolīna kompleksus, tādējādi aktivējot eNOS (Batova et al., 2006). Citi autori ir uzrādījuši cita 1,4-DHP atvasinājuma, nifedipīna, spēju inhibēt eNOS dimēra atjūgšanos un stimulēt tā fosforilāciju (aktivāciju) (Yamamoto et al., 2010). Mūsu eksperimentā konstatētais  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  līmeņa divkārtšs pieaugums asins serumā pēc AV-153-Na ievades cukura diabēta apstākļos (sk. 3.41. att.) var tikt uzskatīts par pozitīvu efektu, kad slāpekļa oksīds tiek metabolizēts par stabilu metabolītu un, iespējams, netiek iesaistīts reakcijās ar superoksīda radikāli. Tomēr urīnā AV-153-Na nitrātu/nitrītu līmeni neietekmēja cukura diabēta apstākļos (sk. 3.40. A. att.).

Apkopojot visu augstāk minēto, secinām, ka AV-153-Na ir potenciāls nitrozatīvā un oksidatīvā stresa regulators, kas atsevišķos orgānos uzrāda iNOS proteīna ekspresiju pazeminošas īpašības, ka arī normalizē eNOS gēna un proteīna ekspresiju nierēs. Pēc citu autoru datiem tā normalizējošā aktivitāte izpaužas ļoti zemās koncentrācijās, ko apstiprina arī mūsu iegūtie *ex vivo* dati, kur 1. tipa cukura diabēta pacientu venozo perifēro asiņu šūnu kodolos DNS vienpavediena pārrāvumu līmenis pēc inkubācijas ar AV-153-Na 5nM koncentrācijā samazinājās par 31% (sk. 3.46. att.), salīdzinot ar DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni 1. tipa cukura diabēta apstākļos bez AV-153-Na klātbūtnes.

### **4.3. Flavonolu grupas dabas vielas un to kombinācijas ar 1,4-DHP antioksidatīvo un DNS aizsargājošo spēju analīze 1. tipa cukura diabēta apstākļos**

#### **4.3.1. Miricetīns**

Daudzi autori uzskata, ka diabēta vaskulārās komplikācijas attīstās brīvo radikāļu ietekmē, kas rodas glikozes metabolisma traucējumu rezultātā (Varga et al., 2014). Tamdēļ darbā mēs izvērtējam arī dabas vielas miricetīna, kas jau ir uzrādījis antioksidatīvās īpašības (Ong and Khoo, 1997), spēju modulēt iNOS un eNOS gēnu transkripciju, kā arī ietekmēt DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni pēc tā ievades STZ inducētā cukura diabēta apstākļos. Mūsu iepriekš veiktajos pētījumos miricetīns LPS inducētā iekaisuma apstākļos uzrādīja iNOS gēna ekspresiju samazinošas īpašības (sk. 3.2. att.) aknu audos. Pamatojot efektu, ar publicētajiem datiem par miricetīna spēju nomākt IKK kināžu aktivitāti, tādā veidā nomācot NF- $\kappa$ B migrāciju

uz kodolu un sekojošu iekaisuma gēnu ekspresijas samazinājumu (Tsai et al., 1999), par to liecina arī citu autoru dati, kur miricetīns samazina slāpekļa oksīda produkciju LPS un interferona-  $\gamma$  stimulētos peļu makrofāgos (Yang et al., 2011). Miricetīns samazina ksantīnoksidāzes/ ksantīndehidrogenāzes aktivitātes līmeņus, kas cukura diabēta apstākļos paaugstinās, norādot uz pastiprinātu brīvo radikāļu produkciju. Normalizē glutationa peroksidāzes, kas intracelulārais antioksidants, aktivitāti. Tādējādi normalizējot brīvo radikāļu līmeni cukura diabēta apstākļos žurku nierēs (Ozcan et al., 2012). Kā arī ir dati, ka miricetīns samazina glikozes līmeni diabēta apstākļos žurku asins plazmā (Ong and Khoo, 2000; Ozcan et al., 2012). Mūsu darbā veselajos dzīvniekos, miricetīna trīs dienu ievade, izsauca tendenci paaugstināties iNOS gēna ekspresijas līmenim un STZ modelī tā ievade neizsauca būtiskās iNOS mRNS svārstības nierēs (sk. 3.35. att.). Savukārt eNOS gēna ekspresija pieauga par 90% veselo dzīvnieku, šīs īpašības miricetīns saglabāja arī ievadot to STZ inducētā cukura diabēta modelī, normalizējot eNOS gēna ekspresiju līdz kontroles dzīvnieku līmenim nierēs (sk. 3.32. att.).  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  līmenis asins serumā STZ inducētā cukura diabēta apstākļos pieauga pēc miricetīna ievades par 37% (sk. 3.41. att.), salīdzinot ar STZ modeļa grupu. Mūsu datus arī apstiprina darbi uz izolētas žurku sirds, kur miricetīns izraisa stabilu koronāro asinsvadu dilatāciju, zemās koncentrācijās  $10^{-12}$  līdz  $10^{-9}$  mol/l, un stimulē eNOS fosforilāciju (aktivāciju) (Angelone et al., 2011). Ir pieejami dati par flavonolu grupas savienojumu, kvercetinā un kemferola spēju atjaunot eNOS gēna ekspresiju cilvēka endoteliālajās šūnās pēc apstrādes ar ūdeņraža pārskābi (Martinez-Fernandez et al., 2014). Tomēr asinīs tas uzrādīja savas prooksidanta īpašības (Canada et al., 1989; Canada et al., 1990) un DNS molekulas bojājošās īpašības (Smith et al., 1992), paaugstinot, pirmkārt, DNS vienpavedienu pārrāvumu līmeni gandrīz 5 reizes veselajiem dzīvniekiem un STZ modelī par 60%, salīdzinot ar STZ modeļa grupu (sk. 3.29.att.).

Izteiktā eNOS gēna ekspresijas stimulācija cukura diabēta apstākļos, ļauj domāt, ka tā ir potenciāla molekula, kas varētu tikt iesaistīta endoteliālās disfunkcijas regulēšanā, ko apraksta arī citi autori (Yi et al., 2012), un ir noderīgi apskatīt miricetīna aktīvās spējas arī zemākā koncentrācijā.

#### **4.3.2. 1,4- dihidropiridīna atvasinājuma, AV-153-Na, kombinācija ar flavonolu grupas pārstāvi, miricetīnu**

Ņemot vērā jau zināmās 1,4- DHP, AV-153-Na, DNS pasargājošās īpašības un flavonola, miricetīna, antioksidatīvās īpašības, bija vērtīgi izvērtēt, vai šīs abas fenola gredzenu saturošas vielas nepapildina viena otru. Tomēr nācās secināt, ka DNS vienpavedienu pārrāvumi veselajos dzīvniekos pēc kombinācijas ievades pieauga 4,5 reizes, salīdzinot kontroles grupu, un cukura diabēta apstākļos DNS 1,44 reizes augstāk par STZ modeļa grupu (sk. 3.29. att.). iNOS gēnam statistiski ticamas svārstības pēc kombinācijas ievades netika novērotas (sk. 3.35. att.). Savukārt eNOS gēna līmenis nepaaugstinājās pēc kombinācijas ievades veselos dzīvniekos, kā tas tika novērots pēc miricetīna ievades, bet cukura diabēta apstākļos kombinācija stimulēja eNOS gēna līmeņa normalizēšanos (sk. 3.32. att.). AV-153-Na un miricetīna kombinācija paaugstināja  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  līmenis asins serumā STZ inducētā cukura diabēta apstākļos kā to parādīja AV-153-Na un miricetīns atsevišķi (3.41. att.). Neskatoties uz to, ka abas molekulas ir ļoti atšķirīgas pēc struktūras, tās parādīja STZ inducētā 1, tipa cukura diabēta apstākļos ļoti līdzīgu aktivitāti gan katra par sevi, gan kombinācijā.

#### **4.4. 1,4- dihidropiridīnu hidroksilradikāli neitralizējošo īpašību analīze *in vitro***

Mēs esam izanalizējuši astoņpadsmit 1,4-DHP atvasinājumu (Pielikums Nr. 4) hidroksilradikāli neitralizējošas īpašības, kas rodas Fentona reakcijā, izmantojot EPR spektroskopijas metodi. OH<sup>•</sup> radikāļu detektēšanai izmanto radikāļu ķērāju DMPO. Metodes pamatā ir konkurēšana par brīvajiem radikāļiem, jo vairāk analizējamā viela, 1000 μM koncentrācijā, neitralizē brīvos radikāļus, jo mazāks ir DMPO-OH<sup>•</sup> pīķis, ko reģistrē ar EPR- spektrometru. Savukārt, ja analizējamā viela ir radikāļu donors, tad DMPO-OH<sup>•</sup> pīķis tiek reģistrēts augstāks, nekā tīrā Fentona reakcijā DMPO klātbūtnē.

AV-153-Na līdzinieki (AV-153-K, AV-153-Li, AV-154-Na), neuzrāda hidroksilradikāli neitralizējošas īpašības, neskatoties uz to, ka 4. pozīcijā satur ūdeņraža atomu un karboksilgrupu, kas pēc publicētajiem datiem varētu potencēt 1,4-DHP antiradikālās īpašības, kā arī vielas satur brīvu ūdeņraža atomu N1. pozīcijā, kas



varētu norādīt uz amino-oksīdanta īpašībām (Augustyniak et al. 2010). Samazinot 3. un 5. piesaistīto grupu garumus, savienojumu aktivitāte būtiski nemainās (AV-154-Na, J-7-53). Cianīd grupas 3. un 5. pozīcijās (PP-607) aktivitāti neietekmēja, kā arī glutamīnskābes pievienošana 4. pozīcijā (glutapīrons), nepastiprināja hidroksilradikāli neitralizējošas īpašības. Savukārt DHP gredzena 3. un 5. pozīciju aizvietotājiem fenil grupas pievienošana (J-8-120), pat paaugstina Fentona reakcijas efektivitāti par 5 %, uzrādot iespējamās hidroksilradikāļa donora īpašības.

Karbatona līdzinieki- propkarbatons un metkarbatons it īpaši, parāda hidroksilradikāli neitralizējošas īpašības, samazinot Fentona reakcijas efektivitāti par 14 % un 63 % attiecīgi. Tomēr karbatons, kuram ir brīvas 4. un N1. pozīcijas un kas citu pētnieku darbos uzrāda antioksidatīvās īpašības (Velena et al. 1999), mūsu darbā neuzrādīja hidroksilradikāli neitralizētāja aktivitāti. Etkarbatons, kam 4. pozīcijā ir etil grupa, un savienojumi, kuriem C4. pozīcijā ir divi ūdeņraža atomi un ir dažādā veidā izmainītas 3. un 5. aizvietotājķēdes: -nātrija 2-metil-2-(karboniloksi)propanoāts (J-4-92), -nātrija 2-(karboniloksi)propanoāts (J-3-186), -nātrija fenilkarboniloksi acetāts (J-3-191), aktivitāti neparādīja. Savukārt, savienojums PP-501, kuram 2. un 6. pozīcijās metilgrupas vietā ir nātrija acetāts samazina Fentona reakcijas efektivitāti par 5%, kas ir pretrunā ar publicētiem datiem, kas norāda, ka aizvietotāji 2. un 6. pozīcijās, samazina savienojuma antiradikāļu īpašības (Tirzit et al., 1981; Rojstaczer and Triggle, 1996).

Mūsu pētījumā nelielas, bet stabilas hidroksilradikāļa neitralizētāju īpašības uzrādīja tricikliskie dihidropīridīna atvasinājumi: J-6-138, J-6-93 un it īpaši PP-150-Na, kuram DHP cikla 4. pozīcijā ir fenil grupa un N1. pozīcijā- nātrija heksanoāta grupa. PP-150-Na samazināja Fentona reakcijas efektivitāti par 22%, J-6-138 un J-6-93 par 10% un 3% attiecīgi.

Tātad var secināt, ka hidroksilradikāļa neitralizētāja īpašības uzrāda karbatona līdzinieki- metkarbatons un propkarbatons, kā arī tricikliskie dihidropīridīna atvasinājumi - PP-150-Na, J-6-138, J-6-93. (sk. 3.45. att.).

Vielu ar antiradikālām un DNS pasargājošām īpašībām meklējumi turpinājās arī citā *in vitro* sistēmā. Lai noteiktu prelimināri, vai vielas tiešā veidā var pasargāt DNS molekulu oksidatīvā stresa apstākļos, ar Fentona reakcijas palīdzību *in vitro* sistēmā tika izsaukta hidroksilradikāļu veidošanās. Hidroksilradikāli bombardējot DNS molekulu, izsauc tās ķēdes vienpavediena vai divpavediena bojājumus.

Vienpavediena bojājumi attin superspiralizēto plazmīdas DNS formu (SF), izveidojot atvērto formu (AF), savukārt, ja izveidojas DNS molekulas pilnīgs pārrāvums, tad molekula pāriet linearizētā formā (LF). Pievienojot šim modelim analizējamo vielu, var noskaidrot, vai tai piemīt antiradikālas- hidroksilradikāli neitralizējošas īpašības, vai arī tā tiešā veidā mijiedarbojoties ar DNS molekulu var pasargāt no OH<sup>·</sup> destrukīvās ietekmēs (Fernandez et al., 2011).

Šajā modelī mēs testējām deviņpadsmit vielas (Pielikums Nr. 3), no kurām statistiski ticamas DNS pasargājošās īpašības uzrādīja ūdenī nešķīstošie savienojumi, cerebrokrasts un etaforons, kur etaforons uzrādīja devas atkarīgo tendenci pasargāt DNS molekulu, sasniedzot statistisku ticamību 50 μM koncentrācijā (sk. 3.43. att.). Cerebrokrastam devas atkarība netika novērota, tas pasargāja DNS molekulu gan 5 μM, gan 50 μM, gan 100 μM koncentrācijā (sk. 3.43. att.), kur 5 un 50 μM koncentrācijās superspiralizētās plazmīdas DNS formas attiecība pret atvērto DNS molekulas formu ir vienā līmenī, tādējādi secinot, ka vielas pasargājošās aktivitātes sliekšnis nav sasniegts ne mazajās, ne lielajās koncentrācijās. Cerebrokrasts jau ir pazīstams ar savām antioksidatīvām īpašībām (Klimaviciusa et al., 2007). Savukārt metkarbatons uzrādīja stabilas DNS molekulas bojājošas īpašības 50 un 100 μM koncentrācijās (sk. 3.43. att.). Izpētot citu analizēto vielu tendences, varam minēt, ka fenoflorons koncentrācijās 5, 25, 50 un 100 μM SF/AF līmenis bija augstāks nekā negatīvajā kontrolē.

#### **4.5. DNS pārrāvumu līmeņa atšķirības 1. tipa cukura diabēta pacientu un pacientu bez autoimūnām saslimšanām perifēro venozo asiņu kodolu saturošajās šūnās**

Hiperglikēmijas apstākļi izsauc brīvo radikāļu veidošanos un DNS bojājumus, kas varētu būt pamatā diabētiskajām komplikācijām (Pacher et al., 2007; Magenta et al., 2014). Tomēr nav skaidrs mehānisms, kad pacientiem, kuriem ir adekvāta insulīna terapija un glikozes līmeņa kontrole, veidojas diabētiskās komplikācijas. Tamdēļ ir liela interese par šiem procesiem cilvēku populācijā. Mēs esam noteikuši DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni ar vienas šūnas elektroforēzes metodi 1. tipa cukura diabēta pacientiem un brīvprātīgajiem, kuriem iepriekš nav diagnosticēta autoimūna saslimšana. DNS vienpavedienu pārrāvumu līmenis asins kodolu saturošajās šūnās 1.

tipa cukura diabēta pacientiem bija augstāks par 31% nekā veselo brīvprātīgo kontroles grupā (sk. 3.42. att.). Mūsu iegūtie dati nav pretrunā ar jau publicētajiem līdzīgiem pētījumiem (Dincer et al., 2003), kā arī sasaucas ar mūsu STZ inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī iegūtajiem datiem dzīvniekos. Tādējādi 1. tipa cukura diabēta pacientu asinis un tajās esošās šūnas var izmantot kā modeli dažādu DNS reparāciju veicinošu vielu analīzei *ex vivo* apstākļos.

## 5. SECINĀJUMI

1. Flavonu grupas vielas būtiski ietekmē slāpekļa oksīda produkciju. Luteolīna ietekmē LPS inducētā iekaisuma apstākļos žurku iNOS gēna un proteīna ekspresijas līmeņi aknās, kā arī slāpekļa oksīda koncentrācija asinīs samazinās. Baikaleīns samazina iNOS gēna ekspresijas līmeni aknās un slāpekļa oksīda koncentrāciju žurku sirdī, nierēs iekaisuma apstākļos.
2. Flavonoli: kvercētīns un miricētīns samazina iNOS gēna, bet kemferols – iNOS proteīna ekspresijas līmeni aknās pēc LPS inducēta iekaisuma žurkās.
3. Karotinoīdu grupas pārstāvis likopēns uzrāda iNOS gēna ekspresijas līmeni pazeminošas īpašības aknās LPS inducēta akūta iekaisuma apstākļos žurkās.
4. Kafijskābes estera, kas ir polifenolu grupas savienojums, klātbūtne samazina slāpekļa oksīda līmeni žurku smadzeņu garozā, smadzenītēs un liesā pēc LPS ievadīšanas.
5. Alkaloīda indol-3-karbinola kombinācija ar flavonolu kvercētīnu samazina slāpekļa oksīda produkciju smadzeņu garozā, smadzenītēs, aknās, sirdī, nierēs, sēkliniekos, plaušās, asinīs un šķērsvītrotajā muskulatūrā sepses apstākļos.
6. AV-153-Na uzrāda eNOS gēna un proteīna, kā arī iNOS proteīna ekspresiju normalizējošas īpašības STZ 1TCD modelī. Etkarbatons, miricētīns un AV-153-Na kombinācijā ar miricētīnu parāda sevi kā vielas, kas stimulē eNOS gēna transkripciju nierēs STZ 1TCD modelī. Metkarbatons un J-9-125 samazina DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni venozo asiņu šūnu kodolos. Tas liecina, ka 1,4-DHP, neskatoties uz savu strukturālo līdzību, uzrāda aktivitāti dažādos slāpekļa oksīda biosintēzes posmos un tiešā vai netiešā veidā ietekmē DNS molekulas integritāti.
7. 1. tipa cukura diabēta pacientiem ir augstāks DNS vienpavediena pārrāvumu līmenis perifēro asiņu kodolu saturošajās šūnās nekā veselajiem indivīdiem.
8. Metkarbatons uzrāda OH<sup>•</sup> saistošas, bet cerebrokrasts un etaftorons – DNS molekulu pasargājošas īpašības *in vitro* Fentona reakcijas apstākļos.
9. 1,4-dihidropiridīna atvasinājums AV-153-Na samazina vienpavediena DNS pārrāvumus 1. tipa cukura diabēta pacientu perifēro asiņu šūnu kodolos 5 nM koncentrācijā *ex vivo* apstākļos.

## 6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

### Raksti starptautiski recenzējamos izdevumos:

1. **Rostoka E.**, Baumanė L., Isajevs S., Line A., Dzintare M., Svirina D., Sharipova J., Silina K., Kalvinsh I., Sjakste N. Effects of Kaempferol and Myricetin on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Production in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108(6):436.
2. **Rostoka E.**, Isajevs S., Baumanė L., Line A., Silina K., Dzintare M., Sharipova J., Svirina D., Kalvinsh I. and Sjakste N. Effects of Lycopene, Indole-3-carbinol and Luteolin on Nitric Oxide Production and iNOS Expression are Organ-Specific in Rats. *Arh Hig Rada Toksikol* 2010; 61: 275-285.
3. **Rostoka E.**, Baumanė L., Isajevs S., Line A., Silina K., Dzintare M., Svirina D., Sharipova J., Kalvinsh I., Sjakste N. Effects of Indole-3-Carbinol and Flavonoids Administered Separately and in Combination on Nitric Oxide Production and iNOS Expression in Rats. *Chinese Medicine*, 2010; 1: 5-17.

### Konferenču tēzes par pētāmo tēmu

#### Referāti starptautiskās konferencēs

1. The 2nd Genetics and Genomics Conference (GC 2014) & the 2nd Int'l Conf. on Biomedical Engineering (ICBE 2014), Beijing, China 2014 June. **Rostoka E.**, Buraka E., Baumanė L., Boucher J.-L., Borisovs V., Sjakste N. In vitro studies of 1, 4-dihydropyridine peroxy-nitrite scavenging and DNA protective activities. *Engii Conferences Series, Conference Program Guide Article ID: 40112, In Book of Abstracts (p. 59-60.)*
2. 7th International Conference on Diabetes & Obesity, Riga, Latvia, Oct 24-25, 2013. **Rostoka E.**, Buraka E., Baumanė L., Sjakste N. Ability of 1,4-dihydropyridines to protect DNA against nocive action of ROS possible implication in treatment of diabetes complications. *In Book of Abstracts (p. 89)*
3. From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies, Paris, France, Oct 17- 18, 2013. **Rostoka E.**, S. Isajevs, E. Buraka, L. Baumanė, N. Sjakste, Search for molecules with combined antioxidant and DNA-binding activities. *In Book of Abstracts (p27).*

4. 6<sup>th</sup> Conference on Synthesis, Properties and Implications of Nitroxides. Spin 2011, Marseille, France, 26-29 Sept. 2011. Sjakste N., Baumane L., **Rostoka E.**, Isajevs S. and Kalvinsh I. Direct measurements of the tissue nitric oxide in pharmacological experiments with natural compounds contradict NOS II gene and protein expression data. Poster. In Book of Abstracts No 42, (p.118).

#### Referāti Latvijas konferencēs

1. **E. Rostoka**, L. Baumane, J. Šaripova, G. Duburs, N. Sjakste. 1,4-DHP antioksidatīvo un DNS pasargājošo īpašību izvērtēšana *in vitro*. LU 72. zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums (20.-21.lpp). 2014. gada 14. februārī. Rīga, Latvija.
2. **E. Rostoka**, S. Isajevs, L. Baumane, M. Dzintare, I. Kalviņš, N. Sjakste. Dabīgo antioksidantu ietekme uz NO<sup>•</sup> un iNOS ekspresiju žurkās. LU 69. zinātniskās konferences Medicīnas sekcijas tēžu apkopojums, 2011. gada 3.februārī, 15. lpp. Rīga, Latvija.
3. M. Dzintare, L. Baumane, **E. Rostoka**, S. Isajevs, N. Sjakste. Flavonoīdu un citu bioloģiski aktīvu vielu ietekme uz NO<sup>•</sup> koncentrāciju žurku audos. Latvijas Universitātes 67. konference, 2009. g., Rīga, Latvija.
4. **E. Salna**, S. Isajevs, L. Baumane, J. Šaripova, K. Siliņa, A. Linē, N. Sjakste. Flavonoīdu ietekme uz iNOS ekspresiju kontroles un LPS inducētā iekaisuma gadījumā Wistar līnijas žurku aknās. Latvijas Universitātes 66. konference, 2008. g., Rīga, Latvija.
5. N. Sjakste, L. Baumane, T. Sjakste, D. Meirēna, M. Dzintare, S. Isajevs, V. Gardjušina, J.Šaripova, L. Ļauberte, **E. Salna**, I. Kalviņš. Slāpekļa oksīda (NO<sup>•</sup>) koncentrācijas izmaiņas dažādos žurku orgānos flavonoīdu ietekmē, noteiktas ar EPR spektroskopiju. Latvijas Universitātes 65. konference, 2007. g. Rīga, Latvija.

## 7. PATEICĪBAS

Izsaku dziļu pateicību promocijas darba vadītājam prof. *Dr. habil. biol.* Nikolajam Sjakstem, visiem LU MF Medicīniskās bioķīmijas katedras, LOSI Bioķīmijas grupas un LUBI Bioinformātikas un Genomikas grupas kolēģiem par atbalstu darbā.

Darbs tika veikts ar ESF projekta Nr. 1DP/1.1.1.2.0/13/APIA/VIAA/002 atbalstu.

## 8. IZMANTOTĀ LITERTŪRA

1. Abdalla AE TD, Tirzitis G, Roozen JP. 1999. Antioxidant activity of 1,4-dihydropyridien derivatives in  $\beta$ -carotenemethyl linoleate, sunflower oil and emulsions. *Food Chem* 66:189 – 195.
2. Ahmad A, Syed FA, Singh S, Hadi SM. 2005. Prooxidant activity of resveratrol in the presence of copper ions: mutagenicity in plasmid DNA. *Toxicol Lett* 159:1-12.
3. Al-Shalmani S, Suri S, Hughes DA, Kroon PA, Needs PW, Taylor MA, Tribolo S, Wilson VG. 2011. Quercetin and its principal metabolites, but not myricetin, oppose lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of the porcine isolated coronary artery. *Br J Pharmacol* 162:1485-1497.
4. Altamirano F, Valladares D, Henriquez-Olguin C, Casas M, Lopez JR, Allen PD, Jaimovich E. 2013. Nifedipine treatment reduces resting calcium concentration, oxidative and apoptotic gene expression, and improves muscle function in dystrophic mdx mice. *PLoS One* 8.
5. Angelone T, Pasqua T, Di Majo D, Quintieri AM, Filice E, Amodio N, Tota B, Giammanco M, Cerra MC. 2011. Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21:362-371.
6. Augustyniak A, Bartosz G, Cipak A, Duburs G, Horakova L, Luczaj W, Majekova M, Odysseos AD, Rackova L, Skrzydlewska E, Stefek M, Strosova M, Tirzitis G, Venskutonis PR, Viskupicova J, Vraka PS, Zarkovic N. 2010. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview. *Free Radic Res* 44:1216-1262.
7. Azqueta A, Collins AR. 2013. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol* 87:949-968.
8. Basu A, Imrhan V. 2007. Tomatoes versus lycopene in oxidative stress and carcinogenesis: conclusions from clinical trials. *Eur J Clin Nutr* 61:295-303.
9. Batova S, DeWever J, Godfraind T, Balligand JL, Dessy C, Feron O. 2006. The calcium channel blocker amlodipine promotes the unclamping of eNOS from caveolin in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 71:478-485.
10. Baumane L, Dzintare M, Zvejniece L, Meirena D, Lauberte L, Sile V, Kalvinsh I, Sjakste N. 2002. Increased synthesis of nitric oxide in rat brain cortex due to halogenated volatile anesthetics confirmed by EPR spectroscopy. *Acta Anaesthesiol Scand* 46:378-383.
11. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2012. *Biochemistry*. Basingstoke: W.H. Freeman.
12. Bilecova-Rabajdova M, Birkova A, Urban P, Gregova K, Durovcova E, Marekova M. 2013. Naturally occurring substances and their role in chemoprotective effects. *Cent Eur J Public Health* 21:213-219.
13. Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.



14. Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. 1987. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem J* 248:953-956.
15. Borovic S, Tirzitis G, Tirzite D, Cipak A, Khoschsorur GA, Waeg G, Tatzber F, Scukanec-Spoljar M, Zarkovic N. 2006. Bioactive 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives prevent oxidative damage of liver cells. *Eur J Pharmacol* 537:12-19.
16. Bossert F, Vater W. 1971. [Dihydropyridines, a new group of strongly effective coronary therapeutic agents]. *Naturwissenschaften* 58:578.
17. Bossert F, Vater W. 1989. 1,4-Dihydropyridines--a basis for developing new drugs. *Med Res Rev* 9:291-324.
18. Bryan NS, Bian K, Murad F. 2009. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:1-18.
19. Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.
20. Buchanan B. GW, Jones R., editor. 2002. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville, Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists.
21. Buraka E, Chen CY, Gavare M, Grube M, Makarenkova G, Nikolajeva V, Bisenieks I, Bruvere I, Bisenieks E, Duburs G, Sjakste N. 2014. DNA-binding studies of AV-153, an antimutagenic and DNA repair-stimulating derivative of 1,4-dihydropyridine. *Chem Biol Interact* 10:200-207.
22. Cai Q, Rahn RO, Zhang R. 1997. Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Lett* 119:99-107.
23. Calderon-Montano JM, Burgos-Moron E, Perez-Guerrero C, Lopez-Lazaro M. 2011. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem* 11:298-344.
24. Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. 1990. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic Biol Med* 9:441-449.
25. Canada AT, Watkins WD, Nguyen TD. 1989. The toxicity of flavonoids to guinea pig enterocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 99:357-361.
26. Cao G, Sofic E, Prior RL. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22:749-760.
27. Cattaruzza M, Wachter R, Wagner AH, Hecker M. 2000. Modulation by dihydropyridine-type calcium channel antagonists of cytokine-inducible gene expression in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 129:1155-1162.
28. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. 2008. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 49:134-140.
29. Chen Y, Wang J, Jia X, Tan X, Hu M. 2011. Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in Yinyanghuo. *Molecules* 16:1336-1348.

30. Chen YH, Dai HJ, Chang HP. 2003. Suppression of inducible nitric oxide production by indole and isothiocyanate derivatives from Brassica plants in stimulated macrophages. *Planta Med* 69:696-700.
31. Chen W, Feng L, Huang Z, Su H. 2012. Hispidin produced from *Phellinus linteus* protects against peroxynitrite-mediated DNA damage and hydroxyl radical generation. *Chem Biol Interact* 199:137-142.
32. Cheng IF, Breen K. 2000. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biomaterials* 13:77-83.
33. Cheng PY, Lee YM, Wu YS, Chang TW, Jin JS, Yen MH. 2007. Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 73:793-804.
34. Cho HJ, Seon MR, Lee YM, Kim J, Kim JK, Kim SG, Park JH. 2008. 3,3'-Diindolylmethane suppresses the inflammatory response to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Nutr* 138:17-23.
35. Chowdhury AR, Sharma S, Mandal S, Goswami A, Mukhopadhyay S, Majumder HK. 2002. Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochem J* 366:653-661.
36. Collins AR. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261.
37. Corredor Z, Stoyanova E, Rodriguez-Ribera L, Coll E, Silva I, Diaz JM, Ballarin J, Marcos R, Pastor S. 2014. Genomic damage as a biomarker of chronic kidney disease status. *Environ Mol Mutagen* 19:21911.
38. Coussens LM, Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
39. Croft KD. 1998. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854:435-442.
40. Dai JY, Yang JL, Li C. 2008. Transport and metabolism of flavonoids from Chinese herbal remedy Xiaochaihu- tang across human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Acta Pharmacol Sin* 29:1086-1093.
41. Dalivelya O, Savina N, Kuzhir T, Buraczewska I, Wojewódzka M, Szumiel I. 2006. Effects of an antimutagen of 1,4-dihydropyridine series on cell survival and DNA damage in L5178Y murine sublines. *NUKLEONIKA* 51:141-146.
42. de la Lastra CA, Villegas I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 35:1156-1160.
43. de Nigris F, Williams-Ignarro S, Lerman LO, Crimi E, Botti C, Mansueto G, D'Armiento FP, De Rosa G, Sica V, Ignarro LJ, Napoli C. 2005. Beneficial effects of pomegranate juice on oxidation-sensitive genes and endothelial nitric oxide synthase activity at sites of perturbed shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4896-4901.
44. Desai B, Sureja D, Naliapara Y, Shah A, Saxena AK. 2001. Synthesis and QSAR studies of 4-substituted phenyl-2,6-dimethyl-3, 5-bis-N-(substituted

- phenyl)carbamoyl-1,4-dihydropyridines as potential antitubercular agents. *Bioorg Med Chem* 9:1993-1998.
45. Di Marco A, Marcucci I, Chaudhary A, Taliani M, Laufer R. 2005. Development and validation of a high-throughput radiometric cyp2c9 inhibition assay using tritiated diclofenac. *Drug Metab Dispos* 33:359-364.
  46. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. 2002. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J* 20:556-563.
  47. Dincer Y, Akcay T, Ilkova H, Alademir Z, Ozbay G. 2003. DNA damage and antioxidant defense in peripheral leukocytes of patients with Type I diabetes mellitus. *Mutat Res* 527:49-55.
  48. Dizdaroglu M. 2012. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett* 327:26-47.
  49. Du Q, Geller DA. 2010. Chapter 8 - Molecular Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. p 269-300.
  50. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, Brownlee M. 2003. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 112:1049-1057.
  51. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M. 2001. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108:1341-1348.
  52. Duburs G VB, Plotniece A, Krauze A, Sobolevs A, Briede J, Kluš a V, Velena A. 2008. Dihydropyridine derivatives as bioprotectors. *Chem Today* 26:68 – 70.
  53. El-Remessy AB, Behzadian MA, Abou-Mohamed G, Franklin T, Caldwell RW, Caldwell RB. 2003. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. *Am J Pathol* 162:1995-2004.
  54. El-Shitany NA, El-Bastawissy EA, El-desoky K. 2014. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *Int Immunopharmacol* 19:290-299.
  55. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 567:1-61.
  56. Felgines C, Talavera S, Texier O, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, Remesy C. 2005. Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *J Agric Food Chem* 53:7721-7727.

57. Fernandes MA, Santos MS, Moreno AJ, Chernova L, Krauze A, Duburs G, Vicente JA. 2009. Effects of 5-acetyl(carbamoyl)-6-methylsulfanyl-1,4-dihydropyridine-5-carbonitriles on rat liver mitochondrial function. *Toxicol In Vitro* 23:1333-1341.
58. Fernandes MA, Santos MS, Vicente JA, Moreno AJ, Velena A, Duburs G, Oliveira CR. 2003. Effects of 1,4-dihydropyridine derivatives (cerebrocrast, gammapyrone, glutapyrone, and diethone) on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress: a comparative study. *Mitochondrion* 3:47-59.
59. Fernandez LL, Montes-Bayon M, Gonzalez EB, Sierra LM, Sanz-Medel A, Bettmer J. 2011. Initial studies on quantitative DNA induced oxidation by gel electrophoresis (GE)-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26:195-200.
60. Fink MP. 2014. Animal models of sepsis. *Virulence* 5:143-153.
61. Firuzi O, Miri R, Tavakkoli M, Saso L. 2011. Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Curr Med Chem* 18:3871-3888.
62. Flamini R, Mattivi F, De Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L. 2013. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int J Mol Sci* 14:19651-19669.
63. Förstermann U. 2010. Chapter 5 - Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Cardiovascular Disease and its Pharmacological Reversal. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. p 139-167.
64. Fotiou S, Fotiou D, Alamanou A, Deliconstantinos G. 2010. Resveratrol activation of nitric oxide synthase in rabbit brain synaptosomes: singlet oxygen ( $^1O_2$ ) formation as a causative factor of neurotoxicity. *In Vivo* 24:49-53.
65. Friedman M. 2013. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, alpha-tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. *J Agric Food Chem* 61:9534-9550.
66. Fukuzawa K, Kogure K, Morita M, Hama S, Manabe S, Tokumura A. 2004. Enhancement of nitric oxide and superoxide generations by alpha-tocopheryl succinate and its apoptotic and anticancer effects. *Biochemistry* 69:50-57.
67. Furuno K, Akasako T, Sugihara N. 2002. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol Pharm Bull* 25:19-23.
68. Galati G, Chan T, Wu B, O'Brien PJ. 1999. Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chem Res Toxicol* 12:521-525.
69. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology* 177:91-104.

70. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H. 1999. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta* 16:643-650.
71. Garcia-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J. 2007. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol* 557:221-229.
72. Garrido AG, Figueiredo LFPd, Silva MRe. 2004. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cirurgica Brasileira* 19:82-88.
73. Gautam R, Jachak SM. 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev* 29:767-820.
74. Giller SA DG, Uldrikis YR, Tirzit GD, Valdman AR, Zakharchenko IM, Spruz YY, Ronis VY, Markov AA. 1970. Improvements in or relating to the stabilization of carotene. In: UK Patent.
75. Girish C, Pradhan SC. 2008. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin. *Fundam Clin Pharmacol* 22:623-632.
76. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. 2006. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* 72:1493-1505.
77. Goldman R, Claycamp GH, Sweetland MA, Sedlov AV, Tyurin VA, Kisin ER, Tyurina YY, Ritov VB, Wenger SL, Grant SG, Kagan VE. 1999. Myeloperoxidase-catalyzed redox-cycling of phenol promotes lipid peroxidation and thiol oxidation in HL-60 cells. *Free Radic Biol Med* 27:1050-1063.
78. Goncharova R, Zabrejko S, Dalivelya O, Kuzhir T. 2001. Anticlastogenicity of two derivatives of 1,4-dihydroisonicotinic acid in mouse micronucleus test. *Mutat Res* 496:129-135.
79. Goncharova RI, Kuzhir TD. 1989. A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 214:257-265.
80. Guengerich FP, Brian WR, Iwasaki M, Sari MA, Baarnhielm C, Berntsson P. 1991. Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4. *J Med Chem* 34:1838-1844.
81. Gupta SC, Tyagi AK, Deshmukh-Taskar P, Hinojosa M, Prasad S, Aggarwal BB. 2014. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 559:91-99.
82. Habib S, Ali A. 2011. Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem* 26:3-17.
83. Hayashi T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Taguchi K, Maeda M, Kuzuya M, Hattori Y. 2014. eNOS-dependent antisense effect of a calcium channel blocker in human endothelial cells. *PLoS One* 9.

84. Hamada H, Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori A. 1993. Free radical scavenging action of baicalein. *Arch Biochem Biophys* 306:261-266.
85. Hamalainen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators Inflamm* 45673:45673.
86. Han DH, Denison MS, Tachibana H, Yamada K. 2002. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:1479-1487.
87. Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16:845-850.
88. Hantzsch A. 1881. Condensationsprodukte aus Aldehydammoniak und ketonartigen Verbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 14:1637-1638.
89. Hegde AH, Prashanth SN, Seetharamappa J. 2012a. Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods. *J Pharm Biomed Anal* 63:40-46.
90. Hegde ML, Izumi T, Mitra S. 2012b. Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 110:123-153.
91. Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ, Bast A. 2001a. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol In Vitro* 15:3-6.
92. Heijnen CG, Haenen GR, Vekemans JA, Bast A. 2001b. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship. *Environ Toxicol Pharmacol* 10:199-206.
93. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13:572-584.
94. Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA. 1993. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest* 91:2866-2872.
95. Heinrich T, Burschka C, Warneck J, Tacke R. 2003. Synthesis and Pharmacological Properties of Silicon-Containing 1,4-Dihydropyridine Derivatives: Calcium Channel Antagonists and  $\alpha$ 1 Adrenoceptor Antagonists of the Sila-niguldipine Type. *Organometallics* 23:361-366.
96. Heumann D, Roger T. 2002. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 323:59-72.

97. Hishikawa K, Luscher TF. 1998. Felodipine inhibits free-radical production by cytokines and glucose in human smooth muscle cells. *Hypertension* 32:1011-1015.
98. Hobbs AJ, Stasch J-P. 2010. Chapter 9 - Soluble Guanylate Cyclase: Allosteric Activation and Redox Regulation. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. p 301-326.
99. Hodgson JC. 2006. Endotoxin and mammalian host responses during experimental disease. *J Comp Pathol* 135:157-175.
100. Hong JT, Yen JH, Wang L, Lo YH, Chen ZT, Wu MJ. 2009. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 237:59-68.
101. Hu C, Kitts DD. 2004. Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol Cell Biochem* 265:107-113.
102. Hur HG, Lay JO, Jr., Beger RD, Freeman JP, Rafii F. 2000. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol* 174:422-428.
103. Ioan P, Carosati E, Micucci M, Cruciani G, Broccatelli F, Zhorov BS, Chiarini A, Budriesi R. 2011. 1,4-Dihydropyridine scaffold in medicinal chemistry, the story so far and perspectives (part 1): action in ion channels and GPCRs. *Curr Med Chem* 18:4901-4922.
104. Ishii N, Patel KP, Lane PH, Taylor T, Bian K, Murad F, Pollock JS, Carmines PK. 2001. Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 12:1630-1639.
105. Yagami T, Ueda K, Sakaeda T, Itoh N, Sakaguchi G, Okamura N, Hori Y, Fujimoto M. 2004. Protective effects of a selective L-type voltage-sensitive calcium channel blocker, S-312-d, on neuronal cell death. *Biochem Pharmacol* 67:1153-1165.
106. Yamamoto E, Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Dong YF, Fukuda M, Nako H, Yasuda O, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. 2010. Nifedipine prevents vascular endothelial dysfunction in a mouse model of obesity and type 2 diabetes, by improving eNOS dysfunction and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 403:258-263.
107. Yan LJ. 2014. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res* 137919:16.
108. Yang ZG, Jia LN, Shen Y, Ohmura A, Kitanaka S. 2011. Inhibitory effects of constituents from *Euphorbia lunulata* on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. *Molecules* 16:8305-8318.
109. Ye F, Wang H, Zhang L, Zou Y, Han H, Huang J. 2015. Baicalein induces human osteosarcoma cell line MG-63 apoptosis via ROS-induced BNIP3 expression. *Tumour Biol* 25:25.
110. Yi L, Chen CY, Jin X, Zhang T, Zhou Y, Zhang QY, Zhu JD, Mi MT. 2012. Differential suppression of intracellular reactive oxygen species-mediated

- signaling pathway in vascular endothelial cells by several subclasses of flavonoids. *Biochimie* 94:2035-2044.
111. Janjua NK, Siddiqa A, Yaqub A, Sabahat S, Qureshi R, ul Haque S. 2009. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA binding interactions at physiological conditions. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 74:1135-1137.
  112. Jiang J, Kang TB, Shim do W, Oh NH, Kim TJ, Lee KH. 2013. Indole-3-carbinol inhibits LPS-induced inflammatory response by blocking TRIF-dependent signaling pathway in macrophages. *Food Chem Toxicol* 57:256-261.
  113. Jo HY, Kim Y, Nam SY, Lee BJ, Kim YB, Yun YW, Ahn B. 2008. The inhibitory effect of quercitrin gallate on iNOS expression induced by lipopolysaccharide in Balb/c mice. *J Vet Sci* 9:267-272.
  114. Jobin C, Sartor RB. 2000. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C451-462.
  115. Ju W, Wang X, Shi H, Chen W, Belinsky SA, Lin Y. 2007. A critical role of luteolin-induced reactive oxygen species in blockage of tumor necrosis factor-activated nuclear factor-kappaB pathway and sensitization of apoptosis in lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 71:1381-1388.
  116. Kachlicki P, Einhorn J, Muth D, Kerhoas L, Stobiecki M. 2008. Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling. In: *Journal of Mass Spectrometry*: John Wiley & Sons, Ltd. p 572-586.
  117. Kalyanaraman B. 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 1:244-257.
  118. Kanakis CD, Tarantilis PA, Polissiou MG, Diamantoglou S, Tajmir-Riahi HA. 2005. DNA interaction with naturally occurring antioxidant flavonoids quercetin, kaempferol, and delphinidin. *J Biomol Struct Dyn* 22:719-724.
  119. Kanakis CD, Tarantilis PA, Polissiou MG, Tajmir-Riahi HA. 2006. Interaction of antioxidant flavonoids with tRNA: intercalation or external binding and comparison with flavonoid-DNA adducts. *DNA Cell Biol* 25:116-123.
  120. Kanazawa K, Uehara M, Yanagitani H, Hashimoto T. 2006. Bioavailable flavonoids to suppress the formation of 8-OHdG in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys* 455:197-203.
  121. Kim BH, Cho SM, Reddy AM, Kim YS, Min KR, Kim Y. 2005. Down-regulatory effect of quercitrin gallate on nuclear factor-kappa B-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 69:1577-1583.
  122. Kim DH, Hossain MA, Kang YJ, Jang JY, Lee YJ, Im E, Yoon JH, Kim HS, Chung HY, Kim ND. 2013a. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, induces apoptosis in human colon cancer cells and prevents AOM/DSS-induced colon cancer in mice. *Int J Oncol* 43:1652-1658.



123. Kim DH, Sung B, Chung HY, Kim ND. 2014. Modulation of Colitis-associated Colon Tumorigenesis by Baicalein and Betaine. *J Cancer Prev* 19:153-160.
124. Kim EJ, Park H, Kim J, Park JH. 2010. 3,3'-diindolylmethane suppresses 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin via the downregulation of inflammatory mediators. *Mol Carcinog* 49:672-683.
125. Kim HH, Kim DH, Kim MH, Oh MH, Kim SR, Park KJ, Lee MW. 2013b. Flavonoid constituents in the leaves of *Myrica rubra* sieb. et zucc. with anti-inflammatory activity. *Arch Pharm Res* 36:1533-1540.
126. King AJF. 2012. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology* 166:877-894.
127. Kirsch M, de Groot H. 1999. Reaction of peroxyxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 274:24664-24670.
128. Klegeris A, Liutkevicius E, Mikalauskiene G, Duburs G, McGeer PL, Klusa V. 2002. Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells. *Eur J Pharmacol* 441:203-208.
129. Kleinert H, Art J, Pautz A. 2010. Chapter 7 - Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. p 211-267.
130. Klimaviciusa L, Klusa V, Duburs G, Kaasik A, Kalda A, Zharkovsky A. 2007. Distinct effects of atypical 1,4-dihydropyridines on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity. *Cell Biochem Funct* 25:15-21.
131. Ko FN, Chu CC, Lin CN, Chang CC, Teng CM. 1998. Isoorientin-6"-O-glucoside, a water-soluble antioxidant isolated from *Gentiana arisanensis*. *Biochim Biophys Acta* 15:81-90.
132. Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. 2005. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep* 57:390-394.
133. Kudo S, Okumura H, Miyamoto G, Ishizaki T. 1999. Cytochrome P-450 isoforms involved in carboxylic acid ester cleavage of Hantzsch pyridine ester of pranidipine. *Drug Metab Dispos* 27:303-308.
134. Kuthan J, Kurfurst A. 1982. Development in dihydropyridine chemistry. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* 21:191-261.
135. Kuzhir TD, Dalivelia OV, Savina NV. 1999. [Modification of the repair processes in chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*]. *Genetika* 35:919-924.
136. Kuzhir TD, Goncharova RI. 1997. Some effects of 1,4-dihydroisonicotinic acid derivatives on repair pathways involved in chemical mutagenesis. *Biochem Soc Trans* 25:139S.

137. Larrosa M, Garcia-Conesa MT, Espin JC, Tomas-Barberan FA. 2010. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol Aspects Med* 31:513-539.
138. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 42:1673-1681.
139. Lee Y, Shin DH, Kim JH, Hong S, Choi D, Kim YJ, Kwak MK, Jung Y. 2010. Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and I $\kappa$ B kinase inhibition are involved in NF $\kappa$ B inhibitory effect: structural analysis for NF $\kappa$ B inhibition. *Eur J Pharmacol* 643:21-28.
140. Lee S, Kim YJ, Kwon S, Lee Y, Choi SY, Park J, Kwon HJ. 2009. Inhibitory effects of flavonoids on TNF- $\alpha$ -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB Rep* 42:265-270.
141. Lekic N, Canova NK, Horinek A, Farghali H. 2013. The involvement of heme oxygenase 1 but not nitric oxide synthase 2 in a hepatoprotective action of quercetin in lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity of D-galactosamine sensitized rats. *Fitoterapia* 87:20-26.
142. Lemanska K, van der Woude H, Szymusiak H, Boersma MG, Gliszczynska-Swiglo A, Rietjens IM, Tyrakowska B. 2004. The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin--a mechanistic insight. *Free Radic Res* 38:639-647.
143. Letelier ME, Entrala P, Lopez-Alarcon C, Gonzalez-Lira V, Molina-Berrios A, Cortes-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Santander P, Nunez-Vergara L. 2007. Nitroaryl-1,4-dihydropyridines as antioxidants against rat liver microsomes oxidation induced by iron/ascorbate, nitrofurantoin and naphthalene. *Toxicol In Vitro* 21:1610-1618.
144. Leung HW, Kuo CL, Yang WH, Lin CH, Lee HZ. 2006. Antioxidant enzymes activity involvement in luteolin-induced human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur J Pharmacol* 534:12-18.
145. Li-Weber M. 2009. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treat Rev* 35:57-68.
146. Li YC, Yeh CH, Yang ML, Kuan YH. 2012. Luteolin Suppresses Inflammatory Mediator Expression by Blocking the Akt/NF $\kappa$ B Pathway in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 383608:20.
147. Li W, Wang G, Lu X, Jiang Y, Xu L, Zhao X. 2014. Lycopene ameliorates renal function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Int J Clin Exp Pathol* 7:5008-5015.
148. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20:1945-1952.

149. Lopez-Alarcon C, Speisky H, Squella JA, Olea-Azar C, Camargo C, Nunez-Vergara LJ. 2004. Reactivity of 1,4-dihydropyridines toward SIN-1-derived peroxynitrite. *Pharm Res* 21:1750-1757.
150. Lovakovic T, Poljak-Blazi M, Duburs G, Cipak A, Cindric M, Vigante B, Bisenieks E, Jaganjac M, Mrakovcic L, Dedic A, Zarkovic N. 2011. Growth modulation of human cells in vitro by mild oxidative stress and 1,4-dihydropyridine derivative antioxidants. *Coll Antropol* 35:137-141.
151. Lundberg JO, Weitzberg E. 2010. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun* 396:39-45.
152. Lushchak VI. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification: *Chem Biol Interact*. 2014 Oct 28;224C:164-175. doi: 10.1016/j.cbi.2014.10.016.
153. Magenta A, Greco S, Capogrossi MC, Gaetano C, Martelli F. 2014. Nitric oxide, oxidative stress, and p66Shc interplay in diabetic endothelial dysfunction. *Biomed Res Int* 193095:5.
154. Makino T, Tsubouchi R, Murakami K, Haneda M, Yoshino M. 2006. Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis of HL60 cells by ingredients of traditional herbal medicine, Sho-saiko-to. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:401-405.
155. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727-747.
156. Manju V, Nalini N. 2005. Chemopreventive potential of luteolin during colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine. *Ital J Biochem* 54:268-275.
157. Manson MM. 2005. Inhibition of survival signalling by dietary polyphenols and indole-3-carbinol. *Eur J Cancer* 41:1842-1853.
158. Manson MM, Gescher A, Hudson EA, Plummer SM, Squires MS, Prigent SA. 2000. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicol Lett* 113:499-505.
159. Martinez-Fernandez L, Pons Z, Margalef M, Arola-Arnal A, Muguerza B. 2014. Regulation of vascular endothelial genes by dietary flavonoids: structure-expression relationship studies and the role of the transcription factor KLF-2. *J Nutr Biochem* 9:00246-00240.
160. Mason RP, Jacob RF, Corbalan JJ, Kaliszan R, Malinski T. 2014. Amlodipine increased endothelial nitric oxide and decreased nitroxidative stress disproportionately to blood pressure changes. *Am J Hypertens* 27:482-488.
161. Matern, I. A, Charushin, N. V, Chupakhin, N. O. 2007. Moskva, RUSSIE, FEDERATION DE: Nauka.
162. Matsubara M, Yao K, Hasegawa K. 2006. Benidipine, a dihydropyridine-calcium channel blocker, inhibits lysophosphatidylcholine-induced endothelial injury via stimulation of nitric oxide release. *Pharmacol Res* 53:35-43.
163. Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. 2005. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull* 28:253-259.

164. Mattila JT, Thomas AC. 2014. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front Immunol* 5.
165. Mattivi F, Guzzon R, Vrhovsek U, Stefanini M, Velasco R. 2006. Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J Agric Food Chem* 54:7692-7702.
166. Michalets EL. 1998. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 18:84-112.
167. Mikoyan VD, Kubrina LN, Serezhenkov VA, Stukan RA, Vanin AF. 1997. Complexes of Fe<sup>2+</sup> with diethyldithiocarbamate or N-methyl-D-glucamine dithiocarbamate as traps of nitric oxide in animal tissues: comparative investigations. *Biochim Biophys Acta* 29:225-234.
168. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 36:1199-1208.
169. Moon YJ, Wang X, Morris ME. 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* 20:187-210.
170. Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. 2008. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 40:180-196.
171. Nagao A, Seki M, Kobayashi H. 1999. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 63:1787-1790.
172. Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. 2003. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. *Biol Pharm Bull* 26:487-491.
173. Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, MacLeod KM. 2005. Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:8.
174. Nemeikaite-Ceniene A, Imbrasaite A, Sergediene E, Cenas N. 2005. Quantitative structure-activity relationships in prooxidant cytotoxicity of polyphenols: role of potential of phenoxyl radical/phenol redox couple. *Arch Biochem Biophys* 441:182-190.
175. Odontuya G, Hoult JR, Houghton PJ. 2005. Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother Res* 19:782-786.
176. Okamura T, Tawa M, Geddaya A, Shimosato T, Iwasaki H, Shintaku H, Yoshida Y, Masada M, Shinozaki K, Imamura T. 2014. Effects of atorvastatin, amlodipine, and their combination on vascular dysfunction in insulin-resistant rats. *J Pharmacol Sci* 124:76-85.
177. Ong KC, Khoo HE. 1997. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol* 29:121-126.
178. Ong KC, Khoo HE. 2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci* 67:1695-1705.

179. Oriz ME, Nunez-Vergara LJ, Squella JA. 2003. Relative reactivity of dihydropyridine derivatives to electrogenerated superoxide ion in DMSO solutions: a voltammetric approach. *Pharm Res* 20:292-296.
180. Ozcan F, Ozmen A, Akkaya B, Aliciguzel Y, Aslan M. 2012. Beneficial effect of myricetin on renal functions in streptozotocin-induced diabetes. *Clin Exp Med* 12:265-272.
181. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
182. Palozza P, Catalano A, Simone R, Cittadini A. 2012. Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochim Pol* 59:21-25.
183. Panichayupakaranant P, Tewtrakul S, Yuenyongsawad S. 2010. Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardised pomegranate rind extract. *Food Chemistry* 123:400-403.
184. Parker SJ, Watkins PE. 2001. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 88:22-30.
185. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23:75-93.
186. Pedemonte N, Diena T, Caci E, Nieddu E, Mazzei M, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galietta LJ. 2005. Antihypertensive 1,4-dihydropyridines as correctors of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations. *Mol Pharmacol* 68:1736-1746.
187. Petukhov VI, Baumann L, Kalvinsh IY, Skesters AP, Silova AA, Rozentale B, Ivanchenko LA. 2008. Chronic hepatitis C: quantitative EPR analysis of nitrogen oxide and copper in patients' blood. *Bull Exp Biol Med* 146:875-877.
188. Philipps APR, L.D. October 3, 1944. Quinoline substituted dihydropyridines. In: U.S. Patent 2,359,329.
189. Qi Z, Yin F, Lu L, Shen L, Qi S, Lan L, Luo L, Yin Z. 2013. Baicalein reduces lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing JAK/STATs activation and ROS production. *Inflamm Res* 62:845-855.
190. Rafi MM, Yadav PN, Reyes M. 2007. Lycopene inhibits LPS-induced proinflammatory mediator inducible nitric oxide synthase in mouse macrophage cells. *J Food Sci* 72:S069-074.
191. Ragazzon PA, Bradshaw T, Matthews C, Iley J, Missailidis S. 2009. The characterisation of flavone-DNA isoform interactions as a basis for anticancer drug development. *Anticancer Res* 29:2273-2283.
192. Raines KW, Bonini MG, Campbell SL. 2007. Nitric oxide cell signaling: S-nitrosation of Ras superfamily GTPases. *Cardiovasc Res* 75:229-239.
193. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MR. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29:91-98.
194. Rao AV, Ray MR, Rao LG. 2006. Lycopene. *Adv Food Nutr Res* 51:99-164.

195. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MN. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 113:189-207.
196. Ryabokon NI, Goncharova RI, Duburs G, Hancock R, Rzeszowska-Wolny J. 2008. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining. *Mutat Res* 637:173-181.
197. Ryabokon NI, Goncharova RI, Duburs G, Rzeszowska-Wolny J. 2005. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cells in vitro. *Mutat Res* 587:52-58.
198. Ryabokon NI, Nikitchenko NV, Dalivelya OV, Goncharova RI, Duburs G, Konopacka M, Rzeszowska-Wolny J. 2009. Modulation of cellular defense processes in human lymphocytes in vitro by a 1,4-dihydropyridine derivative. *Mutat Res* 679:33-38.
199. Robak J, Gryglewski RJ. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37:837-841.
200. Robak J, Shridi F, Wolbis M, Krolikowska M. 1988. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Pol J Pharmacol Pharm* 40:451-458.
201. Rojstaczer N, Triggle DJ. 1996. Structure-function relationships of calcium antagonists. Effect on oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol* 51:141-150.
202. Ross JA, Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 22:19-34.
203. Rusak G, Piantanida I, Masic L, Kapuralin K, Durgo K, Kopjar N. 2010. Spectrophotometric analysis of flavonoid-DNA interactions and DNA damaging/protecting and cytotoxic potential of flavonoids in human peripheral blood lymphocytes. *Chem Biol Interact* 188:181-189.
204. Sarkar FH, Li Y. 2004. Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutat Res* 555:53-64.
205. Sebai H, Ben-Attia M, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. 2009a. Protective effect of resveratrol in endotoxemia-induced acute phase response in rats. *Arch Toxicol* 83:335-340.
206. Sebai H, Gadacha W, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Ben-Attia M. 2009b. Protective effect of resveratrol against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat brain. *Brain Inj* 23:1089-1094.
207. Sebai H, Sani M, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N. 2011. Cardioprotective effect of resveratrol on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat. *Drug Chem Toxicol* 34:146-150.
208. Sebai H, Sani M, Yacoubi MT, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Ben-Attia M. 2010. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1078-1083.
209. Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. 2008a. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 74:1667-1677.

210. Seelinger G, Merfort I, Wolfle U, Schempp CM. 2008b. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* 13:2628-2651.
211. Sesink AL, O'Leary KA, Hollman PC. 2001. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *J Nutr* 131:1938-1941.
212. Sharma V, Joseph C, Ghosh S, Agarwal A, Mishra MK, Sen E. 2007. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Mol Cancer Ther* 6:2544-2553.
213. Shawki SM, Meshaal SS, El Dash AS, Zayed NA, Hanna MO. 2014. Increased DNA damage in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *DNA Cell Biol* 33:884-890.
214. Shen SC, Ko CH, Tseng SW, Tsai SH, Chen YC. 2004. Structurally related antitumor effects of flavanones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production. *Toxicol Appl Pharmacol* 197:84-95.
215. Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinae N. 1998. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett* 438:220-224.
216. Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. 2008. Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Nutrition* 24:733-743.
217. Smith C, Halliwell B, Aruoma OI. 1992. Protection by albumin against the pro-oxidant actions of phenolic dietary components. *Food Chem Toxicol* 30:483-489.
218. Sokolovska J. 2014. GLIKOZES TRANSPORTIERU UN SLĀPEKĻA OKSĪDA PRODUKCIJAS IZMAIŅAS CUKURA DIABĒTA KOMPLIKĀCIJU PATOĢENĒZĒ UN TO FARMAKOLOĢISKĀS KOREKCIJAS IESPĒJAS. Promocijas darbs.
219. Spitaler MM, Graier WF. 2002. Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45:476-494.
220. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC. 2004. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 47:1727-1734.
221. Stuehr DJ, Ghosh S. 2000. Enzymology of Nitric Oxide Synthases. In: Mayer B, editor. *Nitric Oxide: Springer Berlin Heidelberg*. p 33-70.
222. Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. 1999. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med* 27:1313-1323.
223. Suk K, Lee H, Kang SS, Cho GJ, Choi WS. 2003. Flavonoid baicalein attenuates activation-induced cell death of brain microglia. *J Pharmacol Exp Ther* 305:638-645.

224. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. 2003. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors* 3:276-284.
225. Svilar D, Goellner EM, Almeida KH, Sobol RW. 2011. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal* 14:2491-2507.
226. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6:662-680.
227. Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:537-546.
228. Tan HW, Xing SS, Bi XP, Li L, Gong HP, Zhong M, Zhang Y, Zhang W. 2008. Felodipine attenuates vascular inflammation in a fructose-induced rat model of metabolic syndrome via the inhibition of NF-kappaB activation. *Acta Pharmacol Sin* 29:1051-1059.
229. Thomas DD, Flores-Santana W, Switzer CH, Wink DA, Ridnour LA. 2010. Chapter 1 - Determinants of Nitric Oxide Chemistry: Impact of Cell Signaling Processes. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. p 3-25.
230. Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA. 2008. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. *Free Radic Biol Med* 45:18-31.
231. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221.
232. Tirzitz GD, Byteva IM, Salokhiddinov KI, Gurinovich GP, Dubur GY. 1981. 1,4-Dihydropyridine derivatives as deactivators of singlet oxygen. *Chem Heterocycl Compd* 17:682-684.
233. Tirzitz GD, Dubur GY. 1972. 1,4-Dihydropyridines as inhibitors of free-radical reactions. *Chem Heterocycl Compd* 8:126-127.
234. Tirzitz D, Koronova J, Plotniece A. 1998. Influence of some quaternised 1,4-dihydropyridine derivatives on liposomes and erythrocyte membranes. *Biochem Mol Biol Int* 45:849-856.
235. Tirzitz D, Tirzitz G, Antipova D. 1999. Reductive ability of 1,4-dihydropyridine derivatives in relation to ions of trivalent iron. *Chem Heterocycl Compd* 35:592-594.
236. Tirzitz G TD, Hyvonen Z. 2001. Antioxidant activity of 2,6-dimethyl-3,5-dialkoxycarbonyl-1,4-dihydropyridines in metal-ion catalyzed lipid peroxidation. *Czech J Food Sci* 19:81 – 84.
237. Tolba MF, Azab SS, Khalifa AE, Abdel-Rahman SZ, Abdel-Naim AB. 2013. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a



- plethora of biological activities: a review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* 65:699-709.
238. Toma L, Stancu CS, Sanda GM, Sima AV. 2011. Anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms of amlodipine action to improve endothelial cell dysfunction induced by irreversibly glycated LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 411:202-207.
  239. Trostchansky A, Möller MN, Bartesaghi S, Botti H, Denicola A, Radi R, Rubbo H. 2010. Chapter 2 - Nitric Oxide Redox Biochemistry in Lipid Environments. In: Ignarro LJ, editor. *Nitric Oxide (Second Edition)*. San Diego: Academic Press. p 27-60.
  240. Tsai JT, Liu HC, Chen YH. 2010. Suppression of inflammatory mediators by cruciferous vegetable-derived indole-3-carbinol and phenylethyl isothiocyanate in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Mediators Inflamm* 293642:13.
  241. Tsai SH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. 1999. Suppression of TNF $\alpha$ -mediated NF $\kappa$ B activity by myricetin and other flavonoids through downregulating the activity of IKK in ECV304 cells. *J Cell Biochem* 74:606-615.
  242. Vanin AF. 1998. Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilization and transport of nitric oxide in biological systems. *Biochemistry* 63:782-793.
  243. Varga ZV, Giricz Z, Liaudet L, Hasko G, Ferdinandy P, Pacher P. 2014. Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta*.
  244. Varsha MK, Thiagarajan R, Manikandan R, Dhanasekaran G. 2015. Vitamin K1 alleviates streptozotocin-induced type 1 diabetes by mitigating free radical stress, as well as inhibiting NF- $\kappa$ B activation and iNOS expression in rat pancreas. *Nutrition* 31:214-222.
  245. Vartanian LP, Ivanov EV, Vershinina SF, Markochev AB, Bisenieks EA, Gornaeva GF, Pustovalov Iu I, Ponomareva TV. 2004. [Antineoplastic effect of glutapyrone in continual gamma-irradiation of rats]. *Radiats Biol Radioecol* 44:198-201.
  246. Vartanyan LP, Ivanov, E.V., Vershinina, S.F., Markochev, A.B., Biseniekis, E.A., Gornaeva, G.F., Pustovalov, Yu.I., Ponomareva, T.V. 2004. The study of anticarcinogenic effect of glutapyrone in chronic  $\gamma$ -radiation of rats. *RadiatBiolog Radioeko* 44:198–201.
  247. Veitch NC, Grayer RJ. 2011. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports* 28:1626-1695.
  248. Velena A, Zilbers J, Duburs G. 1999. Derivatives of 1,4-dihydropyridines as modulators of ascorbate-induced lipid peroxidation and high-amplitude swelling of mitochondria, caused by ascorbate, sodium linoleate and sodium pyrophosphate. *Cell Biochem Funct* 17:237-252.

249. Virag L, Szabo C. 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54:375-429.
250. Wakabayashi I. 1999. Inhibitory effects of baicalein and wogonin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages. *Pharmacol Toxicol* 84:288-291.
251. Walsky RL, Astuccio AV, Obach RS. 2006. Evaluation of 227 drugs for in vitro inhibition of cytochrome P450 2B6. *J Clin Pharmacol* 46:1426-1438.
252. Walsky RL, Gaman EA, Obach RS. 2005. Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J Clin Pharmacol* 45:68-78.
253. Wang BS, Tang CH, Chiu CK, Huang MH. 2012. Inhibitory effects of water extract from longan twigs on mutation and nitric oxide production. *Food Chem* 135:440-445.
254. Wang J, Mazza G. 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem* 50:850-857.
255. Wang L, Chen J, Wang B, Wu D, Li H, Lu H, Wu H, Chai Y. 2014. Protective effect of quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting inflammatory cell influx. *Exp Biol Med* 239:1653-1662.
256. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. 2006. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem* 54:9798-9804.
257. Wang XD. 2012. Lycopene metabolism and its biological significance. *Am J Clin Nutr* 96:10.
258. Wang ZH, Ah Kang K, Zhang R, Piao MJ, Jo SH, Kim JS, Kang SS, Lee JS, Park DH, Hyun JW. 2010. Myricetin suppresses oxidative stress-induced cell damage via both direct and indirect antioxidant action. *Environ Toxicol Pharmacol* 29:12-18.
259. Wenzel P, Daiber A, Oelze M, Brandt M, Closs E, Xu J, Thum T, Bauersachs J, Ertl G, Zou MH, Forstermann U, Munzel T. 2008. Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-CoA reductase inhibition in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 198:65-76.
260. Win W, Cao Z, Peng X, Trush MA, Li Y. 2002. Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro. *Mutat Res* 513:113-120.
261. Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Mitchell JB, Grisham MB, Fukuto J, Feelisch M. 2000. The Chemical Biology of Nitric Oxide. Balancing Nitric Oxide with Oxidative and Nitrosative Stress. In: Mayer B, editor. *Nitric Oxide*: Springer Berlin Heidelberg. p 7-29.
262. Wojewodzka M, Gradzka I, Buraczewska I, Brzoska K, Sochanowicz B, Goncharova R, Kuzhir T, Szumiel I. 2009. Dihydropyridines decrease X-ray-induced DNA base damage in mammalian cells. *Mutat Res* 671:45-51.
263. Wu L, Iwai M, Li Z, Li JM, Mogi M, Horiuchi M. 2006. Nifedipine inhibited angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression:

- involvement of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase and nuclear factor kappa B-inducing kinase. *J Hypertens* 24:123-130.
264. Xiao J, Kai G. 2012. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr* 52:85-101.
  265. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228.
  266. Zand RS, Jenkins DJ, Diamandis EP. 2000. Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat* 62:35-49.
  267. Zhang HM, Zhao L, Li H, Xu H, Chen WW, Tao L. 2014. Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid. *Cancer Biol Med* 11:92-100.
  268. Zhang L, Lin G, Chang Q, Zuo Z. 2005. Role of intestinal first-pass metabolism of baicalein in its absorption process. *Pharm Res* 22:1050-1058.
  269. Zhang S, Ling B, Qu F, Sun X. 2012. Investigation on the interaction between luteolin and calf thymus DNA by spectroscopic techniques. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 97:521-525.
  270. Zhang S, Sun X, Jing Z, Qu F. 2011. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 82:213-216.
  271. Zhao WX, Wang L, Yang JL, Li LZ, Xu WM, Li T. 2014. Caffeic acid phenethyl ester attenuates pro-inflammatory and fibrogenic phenotypes of LPS-stimulated hepatic stellate cells through the inhibition of NF-kappaB signaling. *Int J Mol Med* 33:687-694.
  272. Zhou P, Li LP, Luo SQ, Jiang HD, Zeng S. 2008. Intestinal absorption of luteolin from peanut hull extract is more efficient than that from individual pure luteolin. *J Agric Food Chem* 56:296-300.
  273. Zhu Y, Silverman RB. 2008. Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), Heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s). *Biochemistry* 47:2231-2243.
  274. Zhu J, Wang CG, Xu YG. 2011. Lycopene attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by reducing oxidative stress. *Pharm Biol* 49:1144-1149.
  275. Zhu XQ, Zhao BJ, Cheng JP. 2000. Mechanisms of the oxidations of NAD(P)H model Hantzsch 1,4-dihydropyridines by nitric oxide and its donor N-methyl-N-nitrosotoluene-p-sulfonamide. *J Org Chem* 65:8158-8163.

## 9. PIELIKUMI

*Pielikums Nr. 9.1*

**Dati par dabas vielu ietekmi uz NO<sup>•</sup> līmeni LPS inducētā akūtā iekaisuma apstākļos žurku audos**

Viela	VID + S.E.M., ng/g audu	Skaitis, n	Vienvirziena ANOVA		Newman- Keuls pēctests, p
			F(df)	p	
<b>Smadzeņu garoza</b>					
Kontrole	52,57 ± 2,22	n= 35	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	182,60 ± 7,66	n= 30			-
Resveratrols 50mg/kg	84,33 ± 12,04	n= 9	59,04	<0,0001 (3;78)	*>0,05
Resveratrols 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	379,60 ± 71,76	n= 8			#<0,001
Ellagskābe 50 mg/kg	56,24 ± 7,11	n= 8	75,45	<0,0001 (3;79)	*>0,05
Ellagskābe 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	255,70 ± 35,27	n= 10			#<0,001
Kvercetinā 50 mg/kg	63,69 ± 9,44	n= 12	79,52	<0,0001 (3;84)	*>0,05
Kvercetinā 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	186,80 ± 23,12	n= 11			#>0,05
Kemferols 50 mg/kg	50,22 ± 4,65	n= 12	93,19	<0,0001 (3;79)	*>0,05
Kemferols 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	209,50 ± 39,37	n= 6			#>0,05
Luteolīns 50 mg/kg	41,41 ± 7,83	n= 14	63,03	<0,0001 (3;84)	*>0,05
Luteolīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	222,10 ± 42,95	n= 9			#<0,05
Indol- 3- karbinols, 50 mg/kg	51,00 ± 4,81	n=18	126,20	<0,0001 (3;91)	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	229,10 ± 20,79	n=12			#<0,001
Likopēns 50 mg/kg	45,20 ± 7,51	n= 15	68,60	<0,0001	*>0,05

Likopēns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	186,50 ± 30,28	n= 11	(3;87)		#>0,05
Miricetīns 50 mg/kg	58,51 ± 4,13	n= 9	94,80	<0,0001	*>0,05
Miricetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	206,50 ± 49,15	n= 4	(3;74)		#>0,05
Baikaleīns 50 mg/kg	61,14 ± 15,21	n= 5	53,08	<0,0001	*>0,05
Baikaleīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	179,00 ± 61,66	n= 5	(3;71)		#>0,05
Kafijskābes esteris 50 mg/kg	31,28 ± 6,62	n= 5	115,50	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	143,70 ± 15,27	n= 6	(3;72)		#<0,01
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	175,80 ± 23,32	n= 6	137,20	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	240 ± 57,88	n= 6	(2;68)		#<0,001
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	118,50 ± 27,61	n= 8	96,16	<0,0001	#<0,001
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	193,40 ± 30,32	n= 8	(2;70)		#>0,05
<b>Smadzenītes</b>					
Kontrole	23,31 ± 1,14	n= 23	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	189,00 ± 18,37	n= 21			-
Resveratrols 50mg/kg	26,31 ± 4,25	n= 8	22,52	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	349,70 ± 89,59	n= 9	(3;57)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	24,88 ± 3,25	n= 8	27,20	<0,0001	*>0,05

Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	221,90 ± 47,49	n= 10	(3;58)		#>0,05
Kvercetīns 50mg/kg	36,69 ± 7,53,	n= 6	39,97	<0,0001	*>0,05
Kvercetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	218,30 ±34,95	n= 4	(3;50)		#>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	16,90 ± 2,79	n= 9	49,75	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	200,10 ± 20,00	n= 12	(3;61)		#>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg	21,17 ± 4,54	n= 6	39,03	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	135,70 ± 18,80	n= 6	(3;52)		#<0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	155,00 ± 23,13	n= 6	46,84	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	240 ± 75,39	n= 6	30,20	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	106,10 ± 27,92	n= 8	39,67	<0,0001	#<0,01
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	163 ± 24,99	n= 7	46,12	<0,0001	#>0,05
<b>Akna</b>					
Kontrole	54,12 ± 4,49	n= 48	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	1346,00 ± 83,20	n= 57			-
Resveratrols 50mg/kg	128,60 ± 36,93	n= 9	85,31(3 ;119)	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg,	2662± 446,50	n= 9			#<0,001

LPS 10mg/kg					
Ellagskābe 50mg/kg	76,35 ± 12,48	n= 8	85,91 (3;119)	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	2095,00 ± 292,50	n= 10			#<0,001
Kvercetīns 50mg/kg	93,23 ± 16,39	n= 12	51,75 (3;127)	<0,0001	*>0,05
Kvercetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	2193,00 ± 471,60	n= 14			#<0,001
Kemferols 50mg/kg	73,18 ± 14,24	n= 12	83,50 (3;119)	<0,0001	*>0,05
Kemferols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1488,00 ± 296,5	n= 6			#>0,05
Luteolīns 50mg/kg	33,49 ± 11,58	n= 12	83,85(3 ;122)	<0,0001	*>0,05
Luteolīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1636,00 ± 272,90	n= 9			#>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	48,21 ± 6,35	n= 18	105,20 (3;131)	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1793,00 ± 194,60	n= 12			#<0,01
Likopēns 50mg/kg	33,92 ± 5,42	n= 13	85,33 (3;123)	<0,0001	*>0,05
Likopēns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1636,00 ± 272,90	n= 9			#>0,05
Miricetīns 50mg/kg	35,72 ± 3,56	n= 9	80,79 (3;114)	<0,0001	*>0,05
Miricetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1008,00 ± 209,00	n= 4			#>0,05
Baikaleīns 50mg/kg	17,40 ± 5,21	n= 5	60,90 (3;111)	<0,0001	*>0,05
Baikaleīns 50mg/kg, LPS	1327,00 ±	n= 5			#>0,05

10mg/kg	589,10				
Kafijskābes esteris 50mg/kg	53,80 ± 12,29	n= 6	83,74 (3;113)	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1686,00 ± 190,50	n= 6			#>0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	1532 ± 123,50	n= 6	112,20 (2;108)	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	1792,00 ± 458,20	n= 6	94,20 (2;108)	<0,0001	#<0,05
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	882,40 ± 215,50	n= 8	97,01 (2;110)	<0,0001	#<0,05
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	1586 ± 332,60	n= 8	94,42 (2;110)	<0,0001	#<0,05
<b>Sirds</b>					
Kontrole	2,48 ± 0,80	n= 56	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	268,70 ± 20,21	n= 51			-
Resveratrols 50mg/kg	3,40 ± 1,40	n= 9	77,35	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	507,30 ± 96,17	n= 9	(3;121)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	2,51 ± 1,28	n= 8	70,31	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	372,6 ± 70,32	n= 10	(3;121)		#<0,01
Kvercetīns 50mg/kg	16,77 ± 6,22	n= 6	72,34	<0,0001	*>0,05
Kvercetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	250,20 ± 36,59	n= 5	(3;114)		#>0,05
Luteolīns 50mg/kg	0,00 ± 0,00	n= 5	69,43	<0,0001	*>0,05
Luteolīns 50mg/kg,	179,8 ± 43,56	n= 4	(3;112)		#>0,05



LPS 10mg/kg					
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	3,48 ± 1,93	n= 9	90,37 (3;124)	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	358,70 ± 35,40	n= 12			#<0,01
Likopēns 50mg/kg	1,14 ± 0,77	n= 10	79,81 (3;119)	<0,0001	*>0,05
Likopēns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	238,20 ± 19,65	n= 6			#>0,05
Miricetīns 50mg/kg	0,22 ± 0,22	n= 10	76,58 (3;117)	<0,0001	*>0,05
Miricetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	242,80 ± 47,95	n= 4			#>0,05
Baikaleīns 50mg/kg	0,00 ± 0,00	n= 6	70,63 (3;112)	<0,0001	*>0,05
Baikaleīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	121,3 ± 32,09	n= 3			#<0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg	2,03 ± 1,30	n= 6	74,78 (3;115)	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	254,80 ± 28,28	n= 6			#>0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	290,30 ± 45,65	n= 6	101,30 (2;110)	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	429,30 ± 89,11	n= 6	103,10 (2;110)	<0,0001	#<0,001
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	181,10 ± 51,96	n= 8	89,74 (2;112)	<0,0001	#<0,05
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	318,30 ± 44,91	n= 8	104,40 (2;112)	<0,0001	#>0,05
<b>Niere</b>					

Kontrole	9,37 ± 1,18	n= 46	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	333,50 ± 16,10	n= 41			-
Resveratrols 50mg/kg	8,51 ± 1,46	n= 9	85,83	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	653,80 ± 137,80	n= 9	(3;101)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	8,51 ± 2,40	n= 8	117,60	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	505,00 ± 81,74	n= 10	(3;101)		#<0,001
Kvercetinš 50mg/kg	39,38 ± 13,32	n= 6	167,20	<0,0001	*>0,05
Kvercetinš 50mg/kg, LPS 10mg/kg	301,60 ± 38,14	n= 5	(3;94)		#>0,05
Kemferols 50mg/kg	6,12 ± 2,89	n= 5	143,70	<0,0001	*>0,05
Kemferols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	387,30 ± 73,21	n= 6	(3;94)		#>0,05
Luteolīns 50mg/kg	4,42 ± 2,00	n= 5	164,20	<0,0001	*>0,05
Luteolīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	262,50 ± 48,45	n= 4	(3;92)		#>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	6,40 ± 1,42	n= 9	176,50	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	435,70 ± 41,95	n= 12	(3;104)		#<0,001
Likopēns 50mg/kg	13,16 ± 6,15	n= 10	194,30	<0,0001	*>0,05
Likopēns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	332,00 ± 27,40	n= 6	(3;99)		#>0,05
Miricetins 50mg/kg	9,04 ± 1,74	n= 10	187,30	<0,0001	*>0,05
Miricetins 50mg/kg, LPS 10mg/kg	337,00 ± 46,27	n= 4	(3;97)		#>0,05
Baikaleīns 50mg/kg	4,68 ± 1,57	n= 6	168,50	<0,0001	*>0,05
Baikaleīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	162,30 ± 44,91	n= 3	(3;92)		#<0,001

Kafijskābes esteris 50mg/kg	0,00 ± 0,00	n= 6	177,90 (3;95)	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	352,80 ± 38,54	n= 6			#>0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	304,80 ± 40,00	n= 6	226,30 (2;90)	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	519,50 ± 111,60	n= 6	168,10 (2;90)	<0,0001	#<0,001
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	224,60 ± 63,35	n= 8	162,60 (2;92)	<0,0001	#<0,01
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	408,60 ± 62,53	n= 8	193,70 (2;92)	<0,0001	#<0,05
<b>Seklinieki</b>					
Kontrole	14,26 ± 1,48	n= 40	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	67,02 ± 5,04	n= 42			-
Resveratrols 50mg/kg	11,49 ± 2,53	n= 7	37,40	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	129,70 ± 29,24	n= 9	(3;94)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	6,83 ± 1,41	n= 7	53,65	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	109,10 ± 14,10	n= 9	(3;94)		#<0,001
Kvercetīns 50mg/kg	23,13 ± 2,63	n= 4	41,86	<0,0001	*>0,05
Kvercetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	95,00 ± 12,08	n= 5	(3;87)		#<0,05
Indol- 3- karbinols,	13,71 ± 6,26	n= 8	42,86	<0,0001	*>0,05

50mg/kg			(3;97)		
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	116 ± 19,55	n= 11			#<0,001
Kafijskābes esteris 50mg/kg	6,96 ± 3,20	n= 5	39,40 (3;89)	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	63,00 ± 8,51	n= 6			#>0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	71,67 ± 18,44	n= 6	47,74 (2;86)	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	88,20 ± 22,34	n= 5	51,27 (2;85)	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	46,71 ± 9,05	n= 7	50,35 (2;87)	<0,0001	#<0,05
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	74,00 ± 12,39	n= 7	53,11 (2;87)	<0,0001	#>0,05
<b>Asinis</b>					
Kontrole	61,87 ± 3,20	n= 52	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	377 ± 21,74	n= 54			-
Resveratrols 50mg/kg	53,48 ± 7,62	n= 9	86,14	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	569,60 ± 79,33	n= 9	(3;120)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	49,73 ± 5,68	n= 8	86,11	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	472,40 ± 51,55	n= 10	(3;120)		#<0,05

Kvercetīns 50mg/kg	88,50 ± 12,13	n= 4	72,24	<0,0001	*>0,05
Kvercetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	380,60 ± 58,68	n= 5	(3;111)		#>0,05
Kemferols 50mg/kg	68,02 ± 19,19	n= 5	69,12	<0,0001	*>0,05
Kemferols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	509,70 ± 112,50	n= 6	(3;113)		#<0,05
Luteolīns 50mg/kg	43,88 ± 13,01	n= 5	73,52	<0,0001	*>0,05
Luteolīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	253,30 ± 43,63	n= 4	(3;111)		#<0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	32,34 ± 3,69	n= 9	103,40	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	615,10 ± 61,44	n= 12	(3;123)		#<0,001
Likopēns 50mg/kg	42,74 ± 3,90	n= 8	85,33	<0,0001	*>0,05
Likopēns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	461,00 ± 53,37	n= 6	(3;116)		#>0,05
Miricetīns 50mg/kg	52,84 ± 6,91	n= 10	87,68	<0,0001	*>0,05
Miricetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	542,80 ± 84,40	n= 4	(3;116)		#<0,01
Baikaleīns 50mg/kg	44,58 ± 8,68	n= 6	75,30	<0,0001	*>0,05
Baikaleīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	261,30 ± 27,85	n= 3	(3;111)		#>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg	35,85 ± 8,61	n= 6	80,44	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	452,50 ± 60,96	n= 6	(3;114)		#>0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	324,80 ± 66,08	n= 6	97,22	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols	462,30 ± 83,09	n= 6	128,80	<0,0001	#>0,05

50mg/kg, kvercētīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg			(2;109)		
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercētīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	249,30 ± 36,54	n= 8	100,80 (2;111)	<0,0001	#<0,01
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	555,00 ± 95,82	n= 8	101,30 (2;111)	<0,0001	#<0,001
<b>Plaušas</b>					
Kontrole	63,52 ± 3,16	n= 50	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	829,60 ± 53,52	n= 56			-
Resveratrols 50mg/kg	82,73 ± 15,85	n= 9	61,26	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1445,00 ± 324,50	n= 9	(3;120)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	66,91 ± 10,98	n= 8	78,85	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	959,00 ± 98,52	n= 10	(3;120)		#>0,05
Kvercētīns 50mg/kg	132 ± 29,50	n= 6	69,66	<0,0001	*>0,05
Kvercētīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	732,40 ± 55,96	n= 5	(3;113)		#>0,05
Kemferols 50mg/kg	85,90 ± 20,29	n= 5	67,16	<0,0001	*>0,05
Kemferols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	695,00 ± 124,20	n= 5	(3;112)		#>0,05
Luteolīns 50mg/kg	75,06 ± 6,85	n= 5	68,73	<0,0001	*>0,05
Luteolīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	846,80 ± 135,70	n= 4	(3;111)		#>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	47,39 ± 4,21	n= 8	79,52 (3;122)	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS	1234,00 ± 157,30	n= 12			#<0,001

10mg/kg					
Likopēns 50mg/kg	58,08 ± 7,46	n= 10	80,48	<0,0001	*>0,05
Likopēns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	901,70 ± 54,19	n= 6	(3;118)		#>0,05
Miricetīns 50mg/kg	55,29 ± 6,28	n= 10	74,22	<0,0001	*>0,05
Miricetīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	824,80 ± 170,10	n= 4	(3;116)		#>0,05
Baikaleīns 50mg/kg	45,40 ± 6,30	n= 6	69,84	<0,0001	*>0,05
Baikaleīns 50mg/kg, LPS 10mg/kg	702,7 ± 26,82	n= 3	(3;111)		#>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg	38,12 ± 8,28	n= 5	71,72	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	841,70 ± 85,36	n= 6	(3;113)		#>0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	718,00 ± 161,80	n= 6	89,71	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetīns 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	940,50 ± 297,60	n= 6	(2;109)		#>0,05
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	468,60 ± 83,60	n= 8	93,13	<0,0001	#<0,01
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	827,50 ± 141,90	n= 8	91,59	<0,0001	#>0,05
<b>Liesa</b>					
Kontrole	39,79 ± 2,48	n= 33	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	1104 ± 56,81	n= 29			-
Resveratrols 50mg/kg	96,35 ± 16,76	n= 6	45,89	<0,0001	*>0,05

Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	2488,00 ± 575,90	n= 9	(3;73)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	39,55 ± 5,12	n= 8	38,85	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	2046,00 ± 515,30	n= 10	(3;76)		#<0,001
Kvercetinš 50mg/kg	175,80 ± 60,17	n= 6	149,30	<0,0001	*>0,05
Kvercetinš 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1177,00 ± 139,30	n= 5	(3;69)		#>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	37,59 ± 6,07	n= 9	143,20 (3;79)	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	1220,00 ± 122,90	n= 12			#>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg	33,70 ± 7,01	n= 6	157,4 (3;70)	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	880,20 ± 98,09	n= 6			#<0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetinš 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	1177,00 ± 140,20	n= 6	199,10 (2;65)	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetinš 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	1410,00 ± 285,20	n= 6	138,80 (2;65)	<0,0001	#<0,05
Indol- 3- karbinols 50 mg/kg, kvercetinš 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	965,00 ± 245,30	n= 8	104,80 (2;67)	<0,0001	#>0,05
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	1271,00 ± 179,60	n= 8	160,60 (2;67)	<0,0001	#>0,05



Šķērsvītrotā muskulatūra					
Kontrole	14,52 ± 1,22	n= 39	-	-	-
LPS iekaisuma grupa	122,30 ± 8,16	n= 43			-
Resveratrols 50mg/kg	14,89 ± 4,54	n= 8	41,64	<0,0001	*>0,05
Resveratrols 50mg/kg, LPS 10mg/kg	238,30 ± 60,01	n= 9	(3;95)		#<0,001
Ellagskābe 50mg/kg	14,11 ± 1,74	n= 8	68,02	<0,0001	*>0,05
Ellagskābe 50mg/kg, LPS 10mg/kg	189,00 ± 28,05	n= 9	(3;95)		#<0,001
Kvercetinš 50mg/kg	34,92 ± 7,61	n= 6	59,39	<0,0001	*>0,05
Kvercetinš 50mg/kg, LPS 10mg/kg	154,80 ± 28,03	n= 5	(3;89)		#>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg	10,39 ± 5,06	n= 9	84,44	<0,0001	*>0,05
Indol- 3- karbinols, 50mg/kg, LPS 10mg/kg	181,90 ± 16,70	n= 12	(3;99)		#<0,001
Kafijskābes esteris 50mg/kg	12,20 ± 1,05	n= 6	64,97	<0,0001	*>0,05
Kafijskābes esteris 50mg/kg, LPS 10mg/kg	148,30 ± 21,07	n= 6	(3;90)		#>0,05
Indol- 3- karbinols 25 mg/kg, kvercetinš 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg	141,80 ± 31,09	n= 6	74,55	<0,0001	#>0,05
Indol- 3- karbinols 50mg/kg, kvercetinš 25 mg/kg, LPS 10 mg/kg	178,00 ± 25,64	n= 6	90,15	<0,0001	#<0,01
Indol- 3- karbinols 50	77,88 ± 19,69	n= 8	71,81	<0,0001	#<0,01

mg/kg, kvercetīns 50 mg/kg, LPS 10 mg/kg			(2;87)		
Luteolīns 30 mg/kg, baikaleīns 30 mg/kg, LPS 10 mg/kg	151,60 ± 22,02	n= 8	82,46 (2;87)	<0,0001	#>0,05

\*pret kontroles grupu, #pret LPS iekaisuma grupu

**Dati par 1,4- DHP ietekmi uz glikozes līmeni STZ inducētā 1TCD apstākļos  
žurkās**

Viela	VID + S.E.M., mmol/l	Skaitis, n	Vienvirziena ANOVA		Newman- Keuls pēctests, p
			F(df)	p	
<b>Glikozes līmenis asinīs pēc ēšanas</b>					
Kontrole	7,06 ± 0,30	n= 5	-	-	-
STZ	33,46 ± 3,05	n= 9			-
AV-153-Na 0,5mg/kg	6,36 ± 0,23	n= 5	18,74	<0,0001	*>0,05
AV-153-Na 0,5mg/kg, STZ 50mg/kg	27,00 ± 3,34	n= 10	(3;25)		#>0,05
Miricetīns 50mg/kg	6,10 ± 0,52	n= 5	22,29	<0,0001	*>0,05
Miricetīns 50mg/kg, STZ 50mg/kg	34,22 ± 3,57	n= 10	(3;25)		#>0,05
AV-153-Na 0,5mg/kg, miricetīns 50mg/kg	6,22 ± 0,32	n= 5	30,21	<0,0001	*>0,05
AV-153-Na 0,5mg/kg, miricetīns 50mg/kg, STZ 10mg/kg	34,45 ± 2,75	n= 10	(3;25)		#>0,05
Metkarbatons 0,5mg/kg	5,93 ± 0,38	n= 4	23,62	<0,0001	*>0,05
Metkarbatons 0,5mg/kg, STZ 50mg/kg	29,41 ± 2,96	n= 8	(3;22)		#>0,05
Metkarbatons 0,05mg/kg	5,53 ± 0,18	n= 4	23,94	<0,0001	*>0,05
Metkarbatons	29,58 ± 2,99	n= 8	(3;22)		#>0,05

0,05mg/kg, STZ 50mg/kg					
Etkarbatons 0,5mg/kg	5,98 ± 0,22	n= 4	20,81	<0,0001	*>0,05
Etkarbatons 0,5mg/kg, STZ 50mg/kg	30,19 ± 3,48	n= 8	(3;22)		#>0,05
Etkarbatons 0,05mg/kg	5,10 ± 0,32	n= 3	20,18	<0,0001	*>0,05
Etkarbatons 0,05mg/kg, STZ 50mg/kg	28,83 ± 3,32	n= 7	(3;20)		#>0,05
J-9-125 0,5mg/kg	6,00 ± 0,09	n= 4	25,09	<0,0001	*>0,05
J-9-125 0,5mg/kg, STZ 50mg/kg	33,39 ± 3,19	n= 8	(3;22)		#>0,05
J-9-125 0,05mg/kg	6,68 ± 0,33	n= 4	32,29	<0,0001	*>0,05
J-9-125 0,05mg/kg, STZ 50mg/kg	34,04 ± 2,28	n= 8	(3;22)		#>0,05
Glutapirons 0,5mg/kg	5,78 ± 0,37	n= 4	24,33	<0,0001	*>0,05
Glutapirons 0,5mg/kg, STZ 50mg/kg	33,05 ± 3,28	n= 8	(3;22)		#>0,05
Glutapirons 0,5mg/kg	6,53 ± 0,29	n= 4	31,18	<0,0001	*>0,05
Glutapirons 0,5mg/kg, STZ 50mg/kg	33,53 ± 2,36	n= 8	(3;22)		#>0,05

\*pret kontroles grupu, #pret LPS iekaisuma grupu.

## Dati par 1,4- DHP spēju pasargāt DNS molekulas integritāti

Viela, koncentrācija	VID + S.E.M., SF/AF, pt	Skaitis, n	Nepāra t- tests, pret negatīvo kontroli (NK), p
<b>AV- 153- Na</b>			
Kontrole	1,48 ± 0,12	3	0,0452
NK	0,62 ± 0,27	3	-
5 μM	0,38 ± 0,28	3	>0,05
10 μM	0,35 ± 0,18	3	>0,05
25 μM	0,61 ± 0,14	3	>0,05
50 μM	0,37 ± 0,16	3	>0,05
100 μM	0,39 ± 0,07	3	>0,05
<b>J- 4- 96</b>			
K	0,56 ± 0,02	3	0,0022
NK	0,29 ± 0,03	3	-
5 μM	0,18 ± 0,08	3	>0,05
10 μM	0,16 ± 0,08	3	>0,05
25 μM	0,19 ± 0,07	3	>0,05
50 μM	0,23 ± 0,09	3	>0,05
100 μM	0,17 ± 0,09	3	>0,05
<b>J- 3- 131- Na</b>			
K	1,20 ± 0,20	3	0,0093
NK	0,18 ± 0,08	3	-
5 μM	0,19 ± 0,09	3	>0,05
10 μM	0,12 ± 0,10	3	>0,05
25 μM	0,25 ± 0,11	3	>0,05
50 μM	0,16 ± 0,13	3	>0,05
100 μM	0,29 ± 0,13	3	>0,05
<b>J- 8- 120</b>			
K	0,89 ± 0,04	3	0,0322
NK	0,26 ± 0,19	3	-

	5 $\mu$ M	0,20 $\pm$ 0,13	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,21 $\pm$ 0,13	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,26 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,24 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,22 $\pm$ 0,13	3	>0,05
<b>J- 7- 53</b>				
	K	0,61 $\pm$ 0,07	3	0,0251
	NK	0,30 $\pm$ 0,05	3	-
	5 $\mu$ M	0,24 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,33 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,20 $\pm$ 0,11	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,25 $\pm$ 0,18	3	>0,05
<b>J- 3- 186</b>				
	K	0,75 $\pm$ 0,03	3	0,0005
	NK	0,17 $\pm$ 0,05	3	-
	5 $\mu$ M	0,18 $\pm$ 0,07	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,16 $\pm$ 0,06	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,17 $\pm$ 0,03	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,11 $\pm$ 0,06	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,10 $\pm$ 0,03	3	>0,05
<b>AV- 154- Na</b>				
	K	1,11 $\pm$ 0,19	3	>0,05
	NK	0,49 $\pm$ 0,23	3	-
	5 $\mu$ M	0,32 $\pm$ 0,03	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,27 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,30 $\pm$ 0,10	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,17 $\pm$ 0,05	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,17 $\pm$ 0,04	3	>0,05
<b>AV- 153- K</b>				
	K	4,12 $\pm$ 2,93	3	>0,05
	NK	0,32 $\pm$ 0,15	3	-

	5 $\mu$ M	0,35 $\pm$ 0,02	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,27 $\pm$ 0,13	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,45 $\pm$ 0,20	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,30 $\pm$ 0,12	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,67 $\pm$ 0,02	2	>0,05
<b>AV- 153- Li</b>				
	K	2,36 $\pm$ 1,45	3	>0,05
	NK	0,16 $\pm$ 0,16	3	-
	5 $\mu$ M	0,34 $\pm$ 0,12	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,39 $\pm$ 0,13	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,38 $\pm$ 0,17	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,13	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,28 $\pm$ 0,20	2	>0,05
<b>PP- 544- NH4</b>				
	K	0,87 $\pm$ 0,05	3	>0,05
	NK	0,48 $\pm$ 0,15	3	-
	5 $\mu$ M	0,33 $\pm$ 0,11	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,34 $\pm$ 0,18	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,29 $\pm$ 0,13	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,33 $\pm$ 0,22	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,49 $\pm$ 0,15	3	>0,05
<b>B- 5- Na</b>				
	K	0,62 $\pm$ 0,07	3	>0,05
	NK	0,39 $\pm$ 0,11	3	-
	5 $\mu$ M	0,23 $\pm$ 0,10	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,32 $\pm$ 0,04	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,11	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,13 $\pm$ 0,08	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,15 $\pm$ 0,05	3	>0,05
<b>Tauropirons</b>				
	K	0,53 $\pm$ 0,04	3	>0,05
	NK	0,32 $\pm$ 0,10	3	-

	5 $\mu$ M	0,24 $\pm$ 0,04	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,28 $\pm$ 0,01	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,23 $\pm$ 0,04	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,07 $\pm$ 0,05	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,18 $\pm$ 0,10	3	>0,05
<b>Metkarbatons</b>				
	K	1,25 $\pm$ 0,22	3	0,0155
	NK	0,34 $\pm$ 0,02	3	-
	5 $\mu$ M	0,18 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,20 $\pm$ 0,06	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,15 $\pm$ 0,07	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,14 $\pm$ 0,07	3	0,0435
	100 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,01	3	0,0032
<b>Karbatons</b>				
	K	1,05 $\pm$ 0,12	3	0,0165
	NK	0,37 $\pm$ 0,12	3	-
	5 $\mu$ M	0,23 $\pm$ 0,01	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,15 $\pm$ 0,06	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,07 $\pm$ 0,05	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,10	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,18 $\pm$ 0,03	3	>0,05
<b>Alapirons</b>				
	K	0,62 $\pm$ 0,02	3	0,0039
	NK	0,13 $\pm$ 0,08	3	-
	5 $\mu$ M	0,30 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,25 $\pm$ 0,05	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,23 $\pm$ 0,04	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,20 $\pm$ 0,06	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,21 $\pm$ 0,09	3	>0,05
<b>Glutapirons</b>				
	K	0,58 $\pm$ 0,50	3	0,03
	NK	0,29 $\pm$ 0,07	3	-



	5 $\mu$ M	0,40 $\pm$ 0,07	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,17 $\pm$ 0,07	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,24 $\pm$ 0,13	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,19 $\pm$ 0,10	3	>0,05
	100 $\mu$ M	0,10 $\pm$ 0,08	3	>0,05
<b>Cerebrokrasts</b>				
	K	1,16 $\pm$ 0,24	4	0,0137
	NK	0,26 $\pm$ 0,11	4	-
	5 $\mu$ M	0,70 $\pm$ 0,13	4	0,0387
	10 $\mu$ M	0,50 $\pm$ 0,15	4	>0,05
	25 $\mu$ M	0,61 $\pm$ 0,11	4	>0,05
	50 $\mu$ M	0,69 $\pm$ 0,07	4	0,0154
	100 $\mu$ M	0,56 $\pm$ 0,05	4	0,0470
<b>Etaftorons</b>				
	K	0,88 $\pm$ 0,35	3	>0,05
	NK	0,21 $\pm$ 0,04	3	-
	5 $\mu$ M	0,64 $\pm$ 0,32	3	>0,05
	10 $\mu$ M	0,55 $\pm$ 0,21	3	>0,05
	25 $\mu$ M	0,42 $\pm$ 0,09	3	>0,05
	50 $\mu$ M	0,41 $\pm$ 0,06	3	0,0419
	100 $\mu$ M	0,35 $\pm$ 0,04	3	>0,05
<b>Fenoftorons</b>				
	K	1,52 $\pm$ 0,32	5	0,0084
	NK	0,38 $\pm$ 0,10	5	-
	5 $\mu$ M	0,56 $\pm$ 0,06	5	>0,05
	10 $\mu$ M	0,38 $\pm$ 0,10	5	>0,05
	25 $\mu$ M	0,69 $\pm$ 0,14	5	>0,05
	50 $\mu$ M	0,71 $\pm$ 0,18	5	>0,05
	100 $\mu$ M	0,66 $\pm$ 0,10	5	>0,05

## Dati par 1,4- DHP spēju neitralizēt hidroksilradikāli

Viela, 1mM	VID + S.E.M., %	Skaitis, n	Nepāra t-tests, pret DMPO, p
DMPO	100,00 ± 0,56	n= 41	-
PP-150-Na	77,58 ± 3,80	n= 6	<0,0001
PP-501	95,00 ± 2,02	n= 6	= 0,0044
PP-607	96,94 ± 0,44	n= 4	>0,05
J-3-186	102,84 ± 0,38	n= 5	>0,05
J-4-92	100,00 ± 0,57	n= 5	>0,05
J-3-191	98,21 ± 0,37	n= 8	>0,05
J-7-53	100,55 ± 0,57	n= 5	>0,05
J-6-93	96,38 ± 0,63	n= 6	= 0,0213
J-8-120	104,57 ± 0,75	n= 6	= 0,0044
J-6-138	89,89 ± 0,86	n= 5	<0,0001
Karbatons	102,73 ± 0,94	n= 5	>0,05
Metkarbatons	36,94 ± 2,59	n= 5	<0,0001
Etkarbatons	97,66 ± 0,66	n= 5	>0,05
Propkarbatons	85,82 ± 1,86	n= 5	<0,0001
Glutapirons	102,02 ± 0,97	n= 4	>0,05
AV-153-Na	100,17 ± 0,62	n= 6	>0,05
AV-153-Li	101,00 ± 1,63	n= 6	>0,05
AV-153-K	101,30 ± 2,46	n= 6	>0,05
AV-154-Na	102,18 ± 0,47	n= 5	>0,05
Metkarbatons 500 μM	83,61 ± 1,65	n= 6	<0,0001
Metkarbatons 100 μM	100,98 ± 0,39	n= 5	>0,05
Metkarbatons 50 μM	100,86 ± 0,49	n= 4	>0,05

**Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja dzīvnieku izmantošanai  
izmēģinājumos**



3.pielikums  
procedūrai KR.10.7.068  
versija 02  
lpp.1 no 1

**PĀRTIKAS UN VETERINĀRĀ DIENESTA  
ATĻAUJA Nr. 51  
DZĪVNIEKU IZMANTOŠANAI IZMĒĢINĀJUMĀ**

Atļaujas saņēmējs

**Latvijas Organiskās Sintēzes institūts Bioloģijas fakultāte**

**PVD Reģ.nr. 051902**

*(Izmēģinājumu dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra nr.)*

**Leontīne Antonoviča PVD atļaujas nr.2**

*Par izmēģinājumu atbildīgā persona (vārds, uzvārds, PVD atļaujas nr.)*

Izmēģinājuma nosaukums

***„Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas diabētisko dzīvnieku audos dažādu  
farmakoloģisko preparātu ietekmē”***

Izmēģinājumā izmantotajiem dzīvniekiem

**300 žurkas**  
*(suga un skaits)*

Izmēģinājumu norises vieta

**Kronvalda Bulvāris 4, 8 telpa, Rīga**  
*(faktiskā adrese)*

Atļaujas darbības laiks no

**03.04.2012.g.**  
*(dd. mm. gggg.)*

līdz

**01.04.2013.g.**  
*(dd. mm. gggg.)*

Ģenerāldirektors

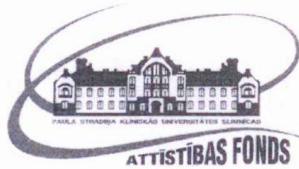
M. Balodis

Z.V.



ED-2 (04.01.2008)

**PSKUS Attīstības biedrības Klīniskās izpētes ētikas komitejas atļauja klīniskā  
pētījuma veikšanai**



**Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas  
Attīstības biedrības  
KLĪNISKĀS IZPĒTES ĒTIKAS KOMITEJA**

**Darbojas saskaņā ar SHK LKP noteikumiem  
ATZINUMS Nr.190314-8L**

- 1. Pētījuma nosaukums: Efektīvu diabētiskās nefropātijas ārstēšanas līdzekļu izpēte projekta „Jaunas starpnozaru grupas izveide efektīvu diabētiskās nefropātijas ārstēšanas līdzekļu meklējumiem” ietvaros**
- 2. Vadošā pētnieka vārds, uzvārds, centra nosaukums un adrese:**
  - 2.1. **Prof. Nikolajs Sjakste** – Organiskās sintēzes institūts Bioķīmijas grupa, Kronvalda bulv. 4, Rīga, Latvijas universitātes Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas grupa Miera iela 3, Salaspilī, Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca Pilsuņu ielā 13, Rīgā, LV -1002, Latvija;
- 3. Izskatītie un apstiprinātie dokumenti:**
  - 3.1. Pētījuma projekta apraksts
  - 3.2. Pētnieku pieredzes un kvalifikācijas apraksts (CV)
  - 3.3. Pacienta informācija par pētījumu un pacienta informētā piekrišana
- 4. Ētikas komitejas atzinums - pozitīvs**
- 5. Ētikas komitejas locekļi, kuri piedalījās balsošanā:**

Pēteris Stradiņš – kardiķirurgs	Daina Biseniece – ķīmiķe
Dainis Krieviņš – asinsvadu ķirurgs	Pēteris Ersts - jurists
Biruta Kupča - psihiatrs	Inga Vīgante – filologs
Valdis Pīrāgs - endokrinologs	Santa Purviņa – farmakologs
Andrejs Ērglis – kardiologs	
- 6. Ētikas komitejas sēdes datums: 2014.gada 19.martā.**

**Ētikas komitejas priekšsēdētājs:**



**Centrālās medicīnas ētikas komitejas atļauja klīniskā pētījuma veikšanai**

## Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālrunis: 67876182 • Fakss: 67876071 • E-pasts: vsm@vsm.gov.lv

Rīgā

10.07.2013. Nr.01-29.1/3

Valsts sabiedrības ar ierobežotu atbildību  
„Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca”  
Internās medicīnas klīnikas  
vadītājam V.Pīrāgam

*Atzinums Nr.01-29.1/3 par pieteikuma  
projektu „LatDiane: Latvijas diabētiskās  
nefropātijas pētījums”*

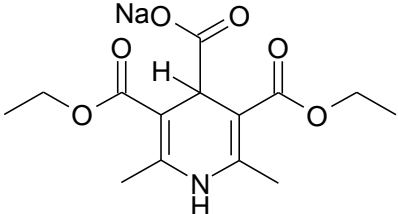
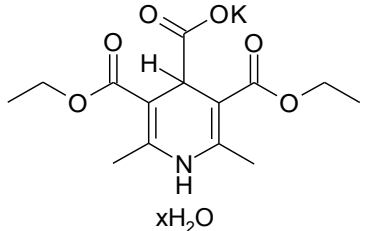
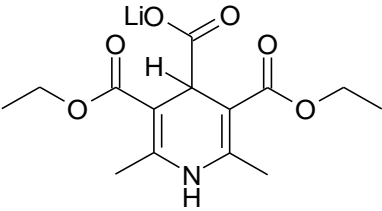
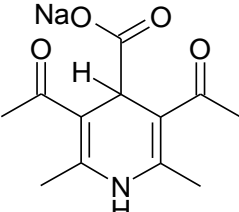
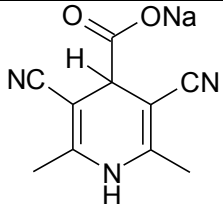
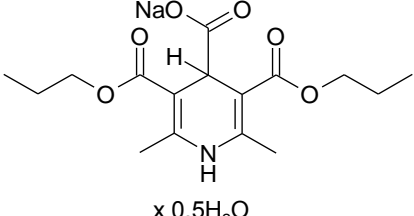
Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2013.gada 10.jūlija izskatīja valsts sabiedrības ar ierobežotu atbildību „Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca” Internās medicīnas klīnikas iesniegto pieteikuma projektu „LatDiane: Latvijas diabētiskās nefropātijas pētījums”.

Pamatojoties uz Centrālās medicīnas ētikas komitejas 2013.gada 10.jūlija sēdes protokola Nr.3 punktu 3, tiek izsniegts atzinums, ka valsts sabiedrības ar ierobežotu atbildību „Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca” Internās medicīnas klīnikas pieteikuma projekts „LatDiane: Latvijas diabētiskās nefropātijas pētījums” nav pretrunā ar bioētikas normām.

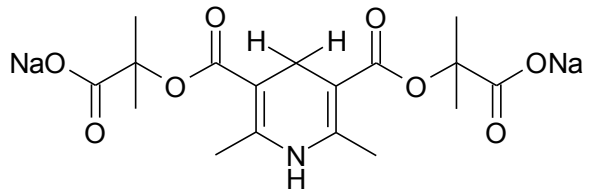
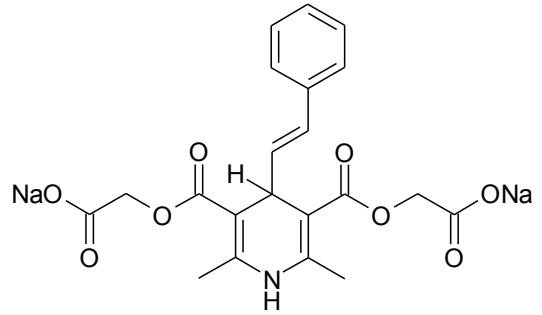
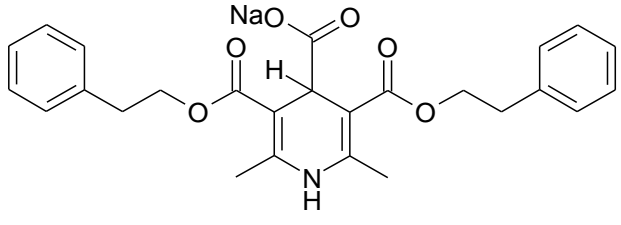
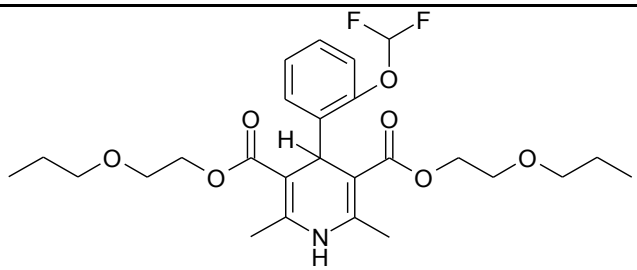
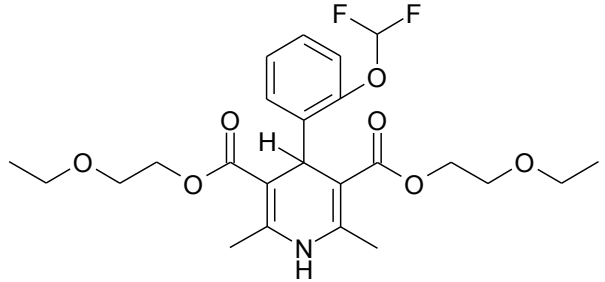
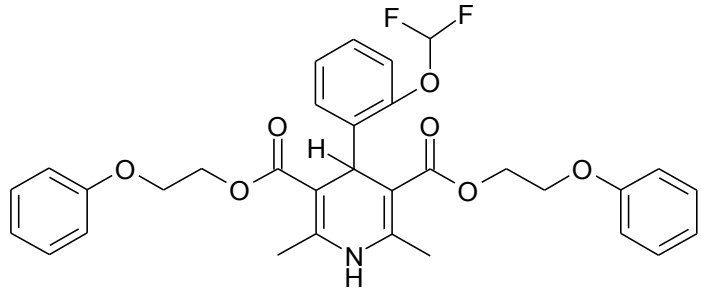
Centrālās medicīnas ētikas  
komitejas priekšsēdētājs

R.Mucipš

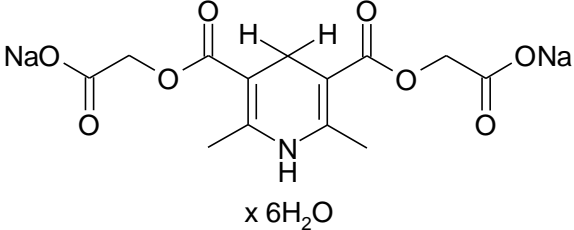
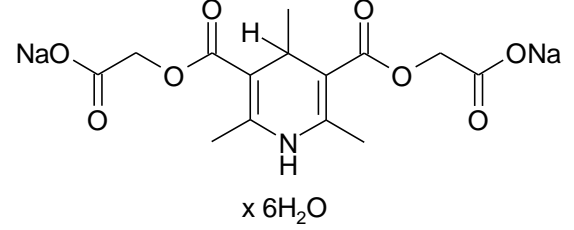
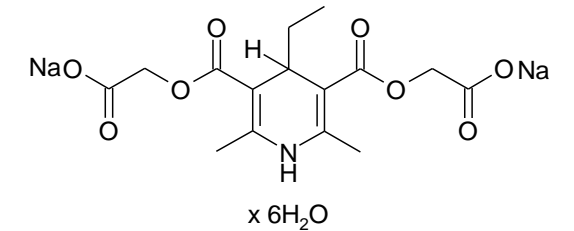
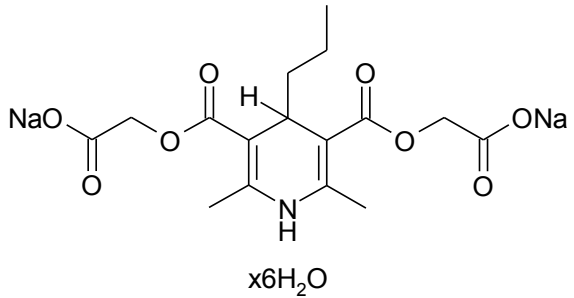
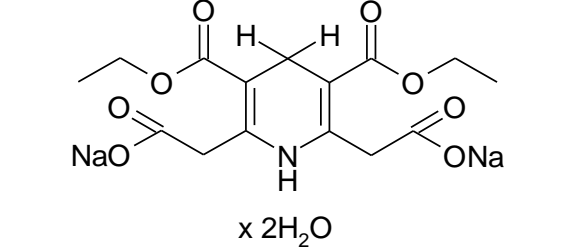
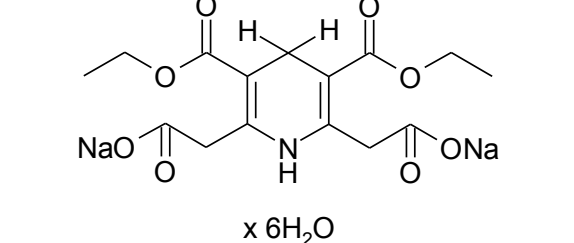
**Darbā izmantoto 1,4-DHP atvasinājumu struktūrformulas un molekulārais  
svars**

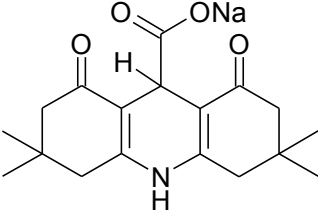
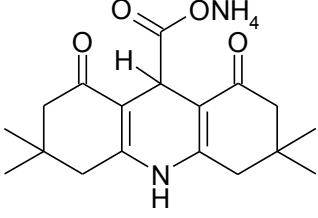
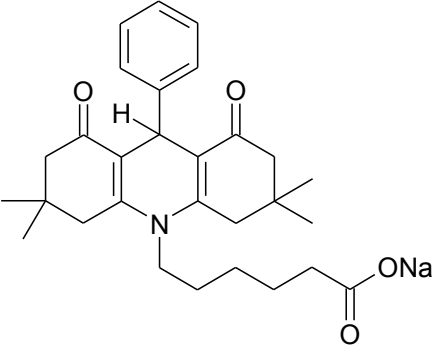
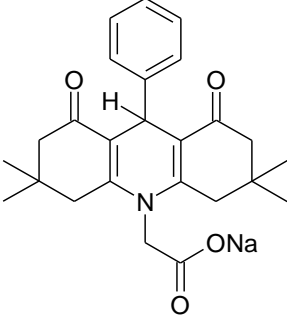
Vielas nosaukums	Formula	Mol.sv.
AV-153-Na		319,3
AV-153-K		353,4
AV-153-Li		303,2
AV-154-Na		259,2
PP-607 (J-3-183)		225,19
J- 4- 96		356,3

J-7-53		291,24
Glutapirons	<p>x 5H<sub>2</sub>O</p>	542,50
Alapirons		390,36
Tauopirons		426,42
J-3-186	<p>9H<sub>2</sub>O</p>	547,43
J-3-191		509,43

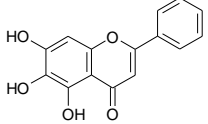
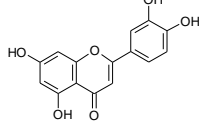
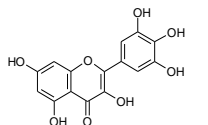
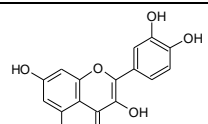
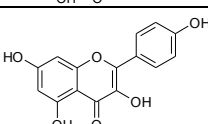
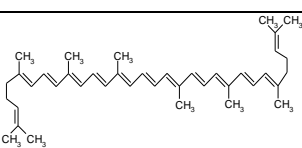
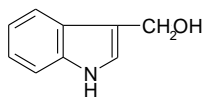
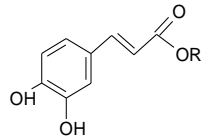
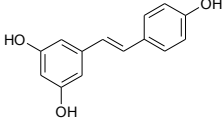
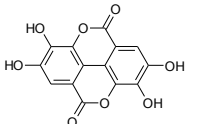
J-4-92	 <p style="text-align: center;">x5H<sub>2</sub>O</p>	503,41
J-9-125	 <p style="text-align: center;">x6H<sub>2</sub>O</p>	567,50
J-8-120	 <p style="text-align: center;">x H<sub>2</sub>O</p>	489,5
Cerebrokrasts		511,56
Etaftorons		483,50
Fenoftorons		579,60



Karbonats		465,3
Metkarbatons		479,34
Etkarbonats		493,37
Propkarbatons		507,40
J- 3- 131- Na		421,30
PP-501		493,43

J-6-138	 <p style="text-align: center;">x H<sub>2</sub>O x C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH</p>	403,46
J-6-93 (PP-544-NH <sub>4</sub> )		334,42
PP-150-Na		485,59
B- 5- Na		429,5

## Darbā izmantoto dabas vielu struktūrformulas un molekulārais svars

Vielas nosaukums	Formula	Molekulārais svars
Baikaleīns		270,24
Luteolīns		286,24
Miricetīns		318,24
Kvercetinīns		338,27
Kemferols		286,24
Likopēns		536,87
Indol-3-karbinols		147,17
Kafijskābes esteris		284,31
Resveratrols		228,24
Ellagskābe		302,19