

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

**DABĪGO ANGIOTENZĪNA KONVERTĒJOŠO
ENZĪMU INHIBITORU IETEKME UZ KALLIKREĪNA
AKTIVITĀTI IN VITRO**

BAKALaura DARBS

Autors: **Kitija Kaļķe**

Studenta apliecības Nr.: kk19174

Darba vadītājs: profesore Dr. habil. biol. Ruta Muceniece

RĪGA 2022

ANOTĀCIJA

SARS-Cov-2 vīruss, izmantojot angiotenzīna-konvertējošo enzīmu 2 (AKE2) kā receptoru, iekļūst šūnās un izmaina angiotenzīna un bradikinīna sistēmu līdzsvaru. Pacientiem slimības sākumā var parādīties plaušu tūska, kas ir saistīta ar vietēju asinsvadu caurlaidību. Inhibējot kallikreīna aktivitāti varētu samazināt bradikinīna sintēzi, kas samazinātu vīrusa izraisītās plaušu tūskas. Šī pētījuma mērķis ir pētīt dažu dabas vielu ar AKE2 inhibitoru īpašībām spēju inhibēt kallikreīna aktivitāti *in vitro*. Rezultāti parāda, ka florizīns, kvercētīns, rutīns, cianidīna-3O-glikozīds un zaļā tēja inhibē cilvēka plazmas kallikreīna aktivitāti. Visaktīvākais ir florizīns ar IC50 0,37 mg/ml. Dabīgie kallikreīna inhibitori varētu kalpot kā bāzes molekulas jaunu zāļu vielu pret iedzimtu angioneirotisko tūsku meklējumiem vai COVID-19 profilaksei.

Atslēgvārdi: AKE, polifenoli, zaļā tēja, plazmas kallikreīns, *in vitro* metode

ANNOTATION

The SARS-Cov-2 virus, using angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a receptor, enters cells and alters the balance of the angiotensin and bradykinin systems. Patients may develop pulmonary edema at the onset of the disease, which is associated with local vascular permeability. Inhibition of kallikrein activity could reduce bradykinin synthesis, which would reduce viral pulmonary edema. The aim of this study was to investigate the ability of some natural substances with ACE2 inhibitor properties to inhibit kallikrein activity *in vitro*. The results show that phlorizin, quercetin, rutin, cyanidine-3O-glycoside and green tea inhibit human plasma kallikrein activity. The most active is phlorizin with an IC₅₀ of 0.37 mg / ml. Natural kallikrein inhibitors could serve as molecules for the search for new drugs for the treatment of congenital angioedema or COVID-19 prophylaxis.

Keywords: ACE, polyphenols, green tea, plasma kallikrein, *in vitro* method

SATURS

ANOTĀCIJA.....	1
ANNOTATION.....	3
APZĪMĒJUMU SARAKSTS.....	5
IEVADS	6
1. LITERATŪRAS APSKATS	9
1.1. Kallikreīni un plazmas kallikreīna-kinīna sistēma.....	9
1.1.1. Plazmas kallikreīna kinīna sistēmas mijiedarbība ar renīna angiotenzīna aldosterona sistēmu.....	11
1.1.2. Bradikinīns un tā sasaite ar kallikreīna-kinīna sistēmu	13
1.2. Kallikreīna inhibitori	14
1.3. Dabas vielas kā ACE1 un ACE2 inhibitori.....	15
1.4. Dabas vielu spēja inhibēt kallikreīna aktivitāti.....	17
2. MATERIĀLI UN METODES.....	21
2.1. Reaģenti.....	21
2.2. Aparatūra un materiāli	21
2.3. Plazmas kallikreīna inhibitoru skrīninga metode.....	22
2.4. Datu apstrāde un statistiskā analīze.....	24
3. REZULTĀTI	25
3.1. Pētīto savienojumu cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efektu salīdzinājums	32
4. DISKUSIJA.....	35
SECINĀJUMI	42
PATEICĪBAS	43
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	44
DOKUMENTĀRĀ LAPA	52

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- AKE – angiotenzīna konvertējošais enzīms
- AKE1 – angiotenzīna kovertējošais enzīms 1
- AKE2 – angiotenzīna kovertējošais enzīms 2
- ANG II – angiotenzīns II
- BK – bradikinīns
- EC – epikatehīns
- EGC – epigallokatehīns
- EKG – epikatehīna-3-galāts
- EGCG – epigallokatehīna-3-galāts
- FXII – koagulācijas faktors XII
- HMWK – augstas molekulmasas kininogēns
- HAE – iedzimta angioneirotiskā tūska
- MLN4760 – angiotenzīnu konvertējošā enzīma 2 inhibitors
- KKS – plazmas kallikreīna-kinīna sistēma
- KLK – kallikreīnu saistītā proteāze
- KLKB1 – plazmas kallikreīns
- LMWK – zemas molekulmasas kininogēns
- OB – optiskais blīvums
- PPK – Plazmas prekallikreīns
- RAAS – Renīna-angiotenzīna-aldosterona sistēma

IEVADS

COVID-19 pandēmija ir radījusi nepieredzētus draudus cilvēku veselībai visā pasaulē. Bieži sastopamie simptomi ir drudzis un ilgstošs klepus, kā arī pacientiem ar Covid-19 bieži rodas šķidrums uzkrāšanās plaušās, kas noved pie apgrūtinātas elpošanas. Ir gadījumi, kad tas attīstās dzīvībai bīstamā formā, jo plaušas nespēj nodrošināt dzīvībai svarīgos orgānus ar nepieciešamo skābekļa daudzumu. Vīruss SARS-CoV-2, kas izraisa COVID-19, iekļūst plaušu gļotādā, izmantojot angiotenzīna konvertējošo enzīmu 2 (AKE2), kas atrodas uz plaušu šūnu ārējās virsmas (Carvalho et al., 2021). Šī iemesla dēļ šo enzīmu uzskata par vīrusu receptoru. COVID-19 pacientiem slimības sākumā var parādīties plaušu tūska, kas varētu būt saistīta ar vietēju asinsvadu caurlaidības pastiprināšanos, jo AKE2 trūkuma dēļ plaušu endotēlija šūnās tiek aktivizēti bradikinīna receptori B1 un B2 (van de Veerdonk et al., 2020). AKE2 ir nepieciešams, lai inaktivētu des-Arg9 bradikinīnu, kas ir spēcīgs B1 receptora ligands. SARS-CoV-2 vīrusa smailes proteīns RBD, piesaistoties AKE2, samazina AKE2 aktivitāti, tāpēc plaušu vide ir pakļauta bradikinīna iedarbībai (Zamorano Cuervo un Grandvaux, 2020). Veicināta vietējā asinsvadu šķidrums caurlaidība izraisa angioneirotisko tūsku (van de Veerdonk et al., 2020). Tātad receptora B2 bloķēšana un plazmas kallikreīna aktivitātes inhibēšana varētu samazināt COVID-19 agrīnā slimības stadijā novēroto akūta respiratorā distresa sindromu. Pētījumi ar pelēm atklāja, ka AKE2 trūkums izraisa paaugstinātu angiotenzīna II līmeni, kas savukārt paaugstina asinsspiedienu (van de Veerdonk et al., 2020). Tā rezultātā liela uzmanība tiek pievērsta potenciālajai saiknei starp šo hormonu sistēmu un COVID-19 slimības patogēnēzi. Savukārt citi pētījumi ar pelēm ir pierādījuši, ka tieši AKE2 aizsargā pret šķidrums uzkrāšanos plaušās, ko domājams uztur bradikinīns (van de Veerdonk et al., 2020). Pētnieks Van de Veerdonk ar līdzautoriem ierosināja hipotēzi, ka COVID-19 pacientiem novērotais šķidrums pārpalikums plaušās varētu būt tāpēc, ka kinīni netiek neitralizēti AKE2 trūkuma dēļ (van de Veerdonk et al., 2020). Ja šī hipotēze ir pareiza, tas nozīmētu, ka tieša kinīnu receptoru inhibēšana var būt vienīgais veids, kā apturēt šķidrums noplūdi COVID-19 pacientu plaušās slimības sākuma stadijā. Šī hipotēze nav pierādīta, un ir nepieciešams vairāk pētījumu, lai noskaidrotu, vai tā ir klīniski nozīmīga. Ja atrastu šai koncepcijai pierādījumus, tas nozīmētu, ka esošās ārstēšanas metodes un kallikreīna vai bradikinīna inhibitori kā reģistrētās zāles potenciāli varētu palīdzēt pacientiem ar COVID-19, novēršot nepieciešamību pēc mehāniskās

ventilācijas un glābjot daudzas dzīvības. Upsalas Universitātes slimnīcā Zviedrijā tika uzņemti pacienti ar Covid-19, un visiem pacientiem salīdzināja bioķīmiskos parametrus ar klīnisko iznākumu un izdzīvošanu (Lipcsey et al., 2021). Tika pierādīts, ka, jo īpaši kallikreīna-kinīna sistēma, ir spēcīgi aktivizēta un jau licencētie kallikreīna/kinīna inhibitori ir potenciālas zāles kritiski slimu pacientu ar Covid-19 ārstēšanai. Saskaņā ar šī pētījuma rezultātiem, atkārtoti pierādās, ka kallikreīna-kinīna sistēmas inhibīcija varētu būt svarīgs solis, meklējot terapeitiskas alternatīvas Covid-19 ārstēšanai (Lipcsey et al., 2021).

Kallikreīna inhibitori jau pastāv kā medikamenti pret iedzimto angioneirotisko tūsku (HAE), kas ir reta ģenētiska slimība. Cilvēkiem ar iedzimto angioneirotisko tūsku asinīs ir zems proteīna C1-INH līmenis, vai arī šis C1-INH proteīns nedarbojas pareizi (Aaaai.org, 2022). Iedzimtās angioneirotiskās tūskas forma atšķiras no parastās alerģiskās angioneirotiskās tūskas ar to, ka alerģiska angioneirotiskā tūska ir ādas reakcija, kas parasti izpaužas kā nātrene, bet HAE ir potenciāli dzīvībai bīstams traucējums, ko izraisa ģenētisks defekts (Aaaai.org, 2022). Kā galvenos terapijas līdzekļus šīs slimības ārstēšanai izmanto medikamentus, kas ir kallikreīna inhibitori, jo tie darbojas saistoties ar plazmas kallikreīnu un bloķējot tā saistīšanās vietu (Frank, 2018). Šie medikamenti samazina kininogēna pārvēršanos bradikinīnā, un ir pieejami kā injicējams šķīdums (10 mg/ml) vienreizējai lietošanai (Frank, 2018). Cilvēka plazmas kallikreīna inhibitori ekalantīds un ikatibants, kas ir selektīvi bradikinīna-2 receptoru antagonisti, tika novērtēti klīniskajos pētījumos akūtu HAE lēkmju ārstēšanai (Riedl, 2010). Abi medikamenti ir uzrādījuši efektivitāti un uzrādīja, ka tie ir droši lietošanai, lai ārstētu akūtu iedzimto angioneirotisko tūsku (HAE) epizodes (Riedl, 2010). Ekalantīds ir apstiprināts lietošanai Amerikas Savienotajās Valstīs un ikatibants ir apstiprināts lietošanai Eiropā (Riedl, 2010). Ikatibants ir sintētisks dekaeptīds, kura struktūra ir līdzīga bradikinīnam, bet ar piecām neproteīnogēnām aminoskābēm (European Medicines Agency, 2021).

Daudzi pētījumi ir veltīti AKE2 inhibitoru atklāšanai ar domu novērst vīrusa iekļūšanu šūnās. Starp tiem kā AKE2 inhibitori ir meklētas un atklātas arī dabas vielas (Patten et al., 2016). Iepriekšējā LU MF studentes Zanes Birznieces maģistra darbā tika atrasti daži savienojumi ar spēju inhibēt AKE1 un AKE2 aktivitāti (Birzniece, 2021). Tomēr to ietekme uz kallikreīna aktivitāti nav zināma, kas būtu jāizpēta.

Šī pētījuma mērķis ir noskaidrot un salīdzināt dažus iepriekš atrasto dabīgo angiotenzīna konvertējošā enzīma 1 (AKE1) un angiotenzīna konvertējošā enzīma 2 (AKE2) inhibitoru cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas spēju *in vitro*.

Uzdevumi:

1. Noskaidrot sintētisko AKE1 inhibitora kaptoprila un AKE2 inhibitora MLN-4760 kallikreīna inhibīcijas efektu.
2. Pētīt florizīna, rutīna, kvercetinā, cianidīna-3O-glikozīda un zaļās tējas kallikreīna inhibīcijas spēju.
3. Salīdzināt pētīto vielu kallikreīna inhibīcijas efektus un noskaidrot, vai vielām ir selektīvas īpašības.

Pētījums veikts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē Zinātņu mājas farmācijas programmas laboratorijā.

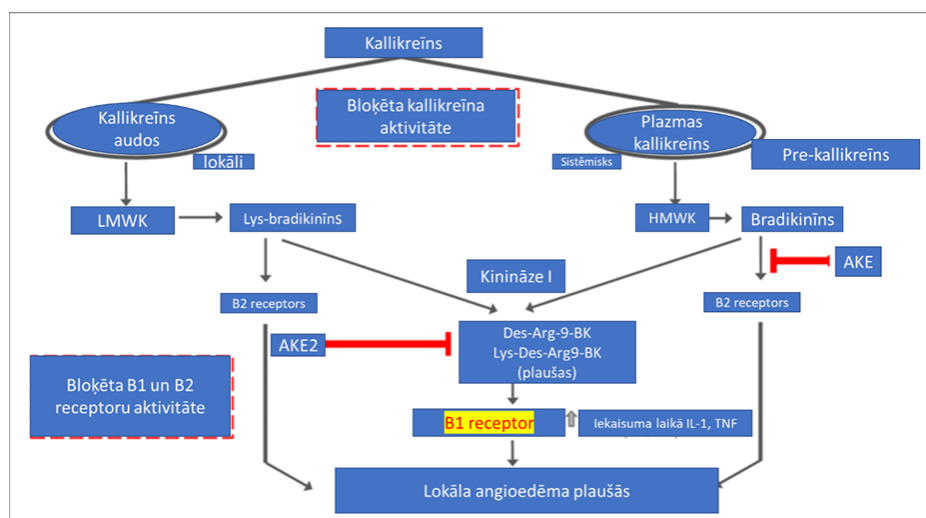
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Kallikreīni un plazmas kallikreīna-kinīna sistēma

Kallikreīni ir proteāžu saime, kas sastāv no 15 serīna proteāzēm ar tripsīnam vai hemotripsīnam līdzīgu aktivitāti (Kalinska et al., 2016). Audu kallikreīnus kodē gēni, kas veido lielāko proteāzes gēnu kopu cilvēka genomā. Visi kallikreīni ir polipeptīdi, kas sastāv no 244–253 aminoskābju atlikumiem, un tiem ir 40% identitāte (Kalinska et al., 2016). Pirmais aprakstītais audu kallikreīns tika nosaukts par KLK1; atlikušos 14 sauc par ar kallikreīnu saistītām proteāzēm (KLK2-KLK15). Kallikreīnu atklāšana aizkuņģa dziedzera ekstraktos aizsākās pagājušā gadsimta 30. gados, kad tika aprakstīta proteāze, kas spēj atbrīvot bradikinīnu (BK) un Lys-bradikinīnu no zemas molmasas kininogēna (Kalinska et al., 2016). Pēc tam termins kallikreīns tika pielāgots, lai aprakstītu šīs divas kallikreīna proteāzes izoformas: plazmas kallikreīnu, kas tiek ražots aizkuņģa dziedzerī un cirkulē asinīs, un audu kallikreīnu, kas producējas dažādos audos. Plazmas un audu kallikreīni atbrīvo vazoaktīvos peptīdus, kas pazīstami kā kinīni jeb visa veida bradikinīni, kas palielina asinsvadu caurlaidību un izraisa asinsvadu gludo muskuļu relaksāciju (van de Veerdonk et al., 2020). Plazmas kallikreīns sašķeļ augstas molekulmasas kininogēnu (HMWK), bet audu kallikreīns apstrādā zemas molekulmasas kininogēnu (LMWK) un iegūst Lys-BK (van de Veerdonk et al., 2020). Šiem kinīniem ir spēcīga asinsvadu caurlaidība un vazodilatācijas spēja, un tie ir jo īpaši jākontrolē, lai novērstu pārmērīgu angioneirotisko tūsku. Interesanti, ka plazmas kallikreīns tika atklāts kā proteāze, ko kodē KLKB1 gēns, kas atrodas 4q34–35 hromosomā. Lai gan tradicionālais nosaukums plazmas kallikreīns (KLKB1) joprojām tiek izmantots, šo enzīmu neuzskata par peptidāžu kallikreīna saimes locekli (Kalinska et al., 2016).

Plazmas prekallikreīns (PPK), serīna proteāzes plazmas kallikreīna zīmogēns, ir vienas ķēdes glikoproteīns, kas ir gēna KLKB1 produkts (Schmaier, 2016). KLKB1 atrodas 4q34-q35 hromosomā. PPK ir vienas ķēdes proteīns ar 619 aminoskābēm. Hepatocītos sintezētais PPK izdalās asinīs, kur tas cirkulē 35–50 mg/L koncentrācijā, galvenokārt kā komplekss ar augstas molekulmasas kininogēnu (HMWK). Asins plazmā pastāv divas PPK formas. Pārvēršana par aktīvo formu tiek panākta, šķeļot peptīdu saiti Arg371-Ile372 uz negatīvi lādētām virsmām, aktivizējot XII faktoru (FXII, Hagemana faktors) ar HMWK kā kofaktoru (Schmaier, 2016).

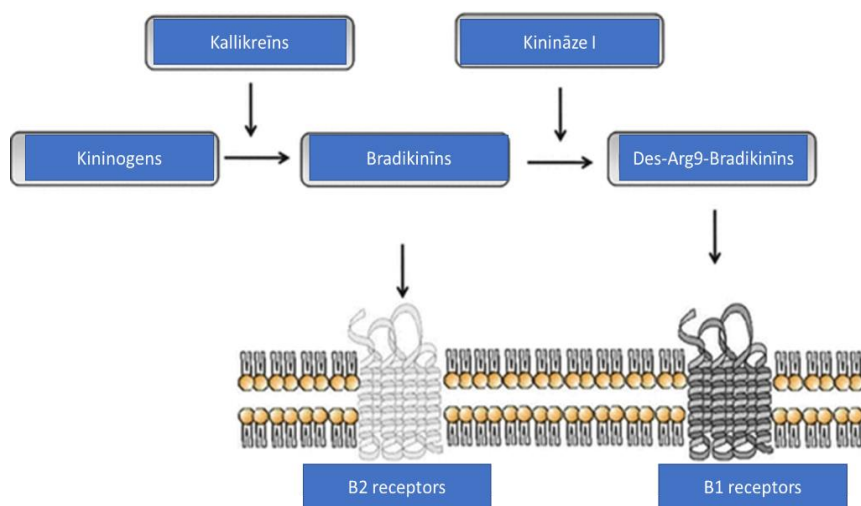
Plazmas kallikreīna-kinīna sistēmai (KKS) ir svarīga loma cilvēka fizioloģijā. KKS ietver koagulācijas faktoru XII (FXII), prekallikreīna kompleksu un augstas molekulas kininogēnu (Bryant and Shariat-Madar, 2009). Plazmas prekallikreīna pārveidošana par kallikreīnu, izmantojot aktivēto FXII un reaģējot uz daudziem dažādiem stimuliem, noved pie bradikinīna (BK) un aktivēta antiangiogēna peptīda veidošanās, un kā zināms bradikinīns ir spēcīgs vazodilatators. Plazmas kallikreīna-kinīna sistēma ir iesaistīta iekaisuma, hipertensijas, endotoksēmijas un koagulopātijas patoģenēzē (Bryant and Shariat-Madar, 2009). Visos šajos patoģiskajos gadījumos tieši BK līmeņa paaugstināšanās ir raksturīgākā iezīme. Pastāv gadījumi, kad nekontrolēta BK ražošana apgrūtina pacientus ar iedzimtu angioneirotisko tūsku un rada draudus dzīvībai, un šādos gadījumos BK nekontrolējami izdalās asins proteīna C1 inhibitora deficīta dēļ (Bryant and Shariat-Madar, 2009). C1 esterāzes inhibitors, komplementa sistēmas klasiskā ceļa regulējošā proteāze, ir galvenais gan kallikreīna, gan aktivētā FXII inhibitors (Schoenfeld et al., 2016). Proti, pacientiem ar C1 inhibitora deficītu un iedzimtu angioneirotisko tūsku, ir nekontrolēts iekaisums, ko izraisa kallikreīna aktivitātes paaugstināšanās un sekojoša BK pārprodukcija un uzkrāšanās, kas ir galvenais angioneirotiskās tūskas starpnieks (Madkhali et al., 2021). Citos gadījumos angiotenzīnu konvertējošā enzīma (AKE) nespēja noārdīt BK noved pie paaugstināta BK līmeņa un tūskas pacientiem, kuri lieto AKE inhibitorus. Tādējādi mehānismi, kas traucē BK atbrīvošanos vai degradāciju, izraisa asinsspiediena disfunkciju. Plazmas kallikreīns (KLKB1) ir enzīms, kas šķeļ Lys-Arg un Arg-Ser saites kininogēnā, lai atbrīvotu bradikinīnu, kuram piemīt ar asins recēšanu, fibrinolīzi, hemostāzi un iekaisuma reakciju saistītas funkcijas (Bryant and Shariat-Madar, 2009).



1.1.att. Kallikreīna-kinīnu ceļa blokāde (van de Veerdonk et al., 2020)

Apzīmējumi: Zemas molmasas kininogens (LMWK), augstas molmasas kallikreīns (HMWK) bradikinīns (B). B1 receptora agonists un B2 receptora agonists, IL-1 interleikīns 1, TNF – tumora nekrozes faktors, AKE – angiotenzīna konvertējošais enzīms.

Divi bradikinīna receptoru apakštipi B1 un B2 ir pierādīti, izmantojot farmakoloģiskas un radioligandu saistīšanas metodes, piemēram, raksturojot dažādu agonistu saistīšanās spējas vai jutību pret receptoru antagonistiem (Leeb-Lundberg et al., 2005). Des-Arg9-BK un des-Arg10-Lys-BK ir dabiskie B1 receptora agonisti, un pēdējais ir spēcīgāks ligands (Lerner et al. 2008). Fenilalanīna aizstāšana des-Arg9-BK 8. pozīcijā ar aminoskābi ar alifātisku sānu ķēdi rada B1 receptora antagonistus (Lerner et al., 2008). No tiem klasiskais antagonists ir des-Arg9- [Leu8] -BK. Dabiskie kinīni ar afinitāti pret B2 receptoriem ir BK un Lys-BK.



1.2. att. Kallikreīna iesaiste bradikinīna sintēzē un saistīšanās pie B2 receptora (Sales and Pesquero 2018)

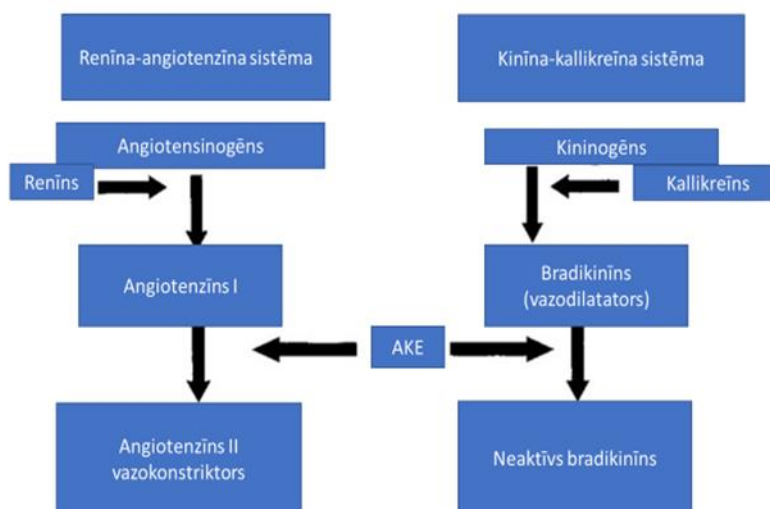
1.1.1. Plazmas kallikreīna kinīna sistēmas mijiedarbība ar renīna angiotenzīna aldosterona sistēmu

Renīna-angiotenzīna-aldosterona sistēma un kallikreīna-kinīna sistēma sastāv no atšķirīgām plazmām un ar membrānu saistītiem proteīniem un receptoriem, kas var tikt aktivizēti, izmantojot proteolītiskās kaskādes (Bekassy et al., 2021). Abas sistēmas tiek pārmērīgi aktivizētas iekaisuma laikā, tām ir spēcīga pro-iekaisuma un protrombotiska iedarbība, kā arī tās palielinās asinsvadu caurlaidību, izraisot tūsku (Bekassy et al., 2021).

Renīna-angiotenzīna-aldosterona sistēma (RAAS) ir hormonu sistēma, kam ir liela nozīme asinsvadu tonusa, asinsspiediena, šķidruma un sāls līdzsvara, šūnu proliferācijas,

fibrozes un iekaisuma kontrolē (Bekassy et al., 2021). Sistēma galvenokārt sastāv no trim hormoniem- renīna, angiotenzīna II un aldosterona (Carey and Padia, 2018).

Plazmas kallikreīna-kinīna sistēma (KKS) ir spējīga neitralizēt renīna-angiotenzīna sistēmas darbību. RAAS regulē vazodilatāciju un vazokonstrikciju, un tika izpētīts, ka angiotenzīna II (Ang II) palielināšanās AKE2 deficīta dēļ izraisa plaušu tūsku, jo angiotenzīns II (Ang II) izraisa vazokonstrikciju (van de Veerdonk et al., 2020). Galvenie enzīmi šajā sistēmā ir AKE1 un AKE2. AKE1 ir ļoti izteikts plaušu asinsvados, ražo Ang II, kam ir spēcīga vazopresējoša iedarbība, un AKE2 ražo heptapeptīdu, ko sauc par Ang 1–7, kas pretēji Ang II ir ar vazodilatējošu un pretiekaisuma iedarbību, kā arī tam piemīt kardioprotektīvas funkcijas (Simões e Silva et al., 2013). AKE1 metabolizē angiotenzīnu I par Ang II, kas paaugstina asinsspiedienu, saistoties un aktivizējot 1. tipa angiotenzīna receptoru. AKE2 metabolizē bradikinīnu, galveno KKS galaproduktu. Kallikreīns pārvērš prorenīnu renīnā. Renīns ir galvenais enzīms angiotenzīna II veidošanā, kas bez asinsspiediena regulācijas regulē arī šķidruma un elektrolītu līdzsvaru (Derckx et al., 1987). Cita AKE izoforma - angiotenzīnu konvertējošais enzīms 2 (AKE2) metabolizē Ang II (vazokonstriktoru, protrombotisku riska faktoru) par angiotenzīnu 1–7 (vazodilatators, antitrombotisks faktors) (van de Veerdonk et al., 2020). Citiem vārdiem sakot AKE2 samazina angiotenzīna II (Ang II) līmeni, tieši ģenerējot Ang 1–7 no Ang II un degradējot Ang I, Ang II prekursoru (Bekassy et al., 2021). Tieši Ang 1–7 inhibē iekaisumu, fibrozi un šūnu proliferāciju (Bekassy et al., 2021).



1.3. att. Renīna-angiotenzīna un kinīna-kallikreīna (van de Veerdonk et al. 2020)

Plazmas kallikreīna-kinīna sistēma modulē RAAS darbību vairākos līmeņos. Gan eksperimenti uz gēnu mērķēšanu pelēm, gan datorsimulācijas virtuālie eksperimenti arī norāda uz plazmas kallikreīna-kinīna sistēmas un renīna-angiotenzīna-aldosterona sistēmas mijiedarbības nozīmi. Pastāv arī citi pētījumi, kur šīs abas sistēmas viena otru ne tikai līdzsvaro, bet arī mijiedarbojas atkarībā no dažādām patoloģijām un to patoģenēzēm (Bekassy et al., 2021).

1.1.2. Bradikinīns un tā sasaite ar kallikreīna-kinīna sistēmu

Plazmas kallikreīna-kinīna sistēma ir viena no galvenajām kontroles sistēmām, kas veicina cirkulāciju, jo tā liek esošajām artērijām ar zemu skābekļa līmeni atvērties plašāk, lai asinis plūstu iekšā (Bryant and Shariat-Madar, 2009).

Bradikinīns (BK) ir vazoaktīvs bioloģiski aktīvs peptīds, kas rodas ar kallikreīna proteāzēm šķeļot kininogēnu (Wong, 2016). Bradikinīna receptoru ligandu inaktivēšanu veic gan AKE1, gan AKE2, taču galvenokārt AKE1 inaktivē bradikinīnu, kas ir galvenais B2R ligands, un interesanti, ka AKE2 neinaktivē bradikinīnu, bet tieši inaktivē Lys des-Arg9-BK un des-Arg9-BK, kas ir spēcīgi B1R ligandi plaušās, kas tieši aizsargā pret plaušu tūsku, īpaši iekaisuma gadījumā (van de Veerdonk et al., 2020).

Bradikinīnu (BK), galveno plazmas KKS efektoru, ražo secīga proteāžu aktivizēšana un peptīdu šķelšanās, kas iegūti no substrāta molekulas - augstas molekulmasas kininogēna (HMWK). Bradikinīns darbojas endokrīnā veidā, izmantojot specifiskus membrānas receptorus, lai normālos apstākļos signalizētu par dažādām fizioloģiskajām reakcijām (Madkhali et al., 2021). Bradikinīns var ietekmēt asinsvadu darbību, ietekmējot gan gludo muskuļu kontraktilitāti, gan endotēlija šūnas. Tas regulē vairākas fizioloģiskas funkcijas: aizsargā plazmas šūnu membrānu un asinsvadu kontraktilitāti, neitralizē tromboksāna vazokonstriktorās īpašības atbrīvojot prostaciklīnu 2 (PGI₂), kas veicina vazodilatāciju; izmantojot PGI₂ arī inhibē trombocītu aktivāciju; neitralizē angiotenzīna II protrombotiskās īpašības, atbrīvojot audu plazminogēna aktivatoru no endotēlija šūnām; un atjauno asins plūsmu pēc lokālas asins recekļu veidošanās (Madkhali et al., 2021). Peles ar asins faktora FXII deficītu skaidri parāda, ka BK ražošana ir atkarīga no FXII atkarīgā ceļa (Iwaki and Castellino, 2006). Proti, kininogēnu, BK prekursoru funkciju zuduma modeļiem ir samazināta angioģenēze un samazināts iekaisums (Madkhali et al., 2021).

Vairāki pētījumi ir skaidri parādījuši, ka BK kalpo kā galvenais C1 inhibitora deficīta simptomu iekaisuma starpnieks. Jaunākie pierādījumi liecina, ka plazmas BK

veidojošās kaskādes nepilnīga kontrole var izraisīt asinsvadu defektus (Madkhali et al. 2021)

1.2. Kallikreīna inhibitori

Kallikreīna inhibitori iedalās fizioloģiskajos un ne-fizioloģiskajos inhibitoros (Masurier et al., 2017). Fizioloģisko inhibitoru piemēri ir metāla joni, piemēram, tika konstatēts, ka Zn^{2+} līmeņa pazemināšanās prostatas vēža audos palielina kallikreīna saistītās proteāzes KLK3 aktivitāti, kas liecina par Zn^{2+} enzīma inhibējošo darbību (Masurier et al., 2017). Kallikreīna aktivitāti inhibē arī endogēno olbaltumvielu inhibitori, piemēram, serpīni (serīna proteāzes inhibitori). Tiek izdalīti kazala inhibitori kuri pieder pie proteāzes inhibitoru grupas, piemēram aizkuņģa dziedzera sekrēcijas tripsīna inhibitors (PSTI). Tas ir no aizkuņģa dziedzera sekrēta izolēts 58 aminoskābju peptīds (Masurier et al., 2017).

Ne-fizioloģiskie inhibitori ir dažādi peptīdi vai proteīni, kas izolēti no mikroorganismiem (leupeptīns, himostatīns), augiem (SBTI, LBTI, BBI, SFTI-1) vai dzīvniekiem (aprotinīns vai BPTI). Un tiem ir spēcīga KLK inhibējošā aktivitāte (Masurier et al., 2017).

Kunitz tipa inhibitori - visizplatītākie kunitz tipa inhibitori ir sojas pupiņu tripsīna inhibitors (SBTI), lima pupiņu tripsīna inhibitors (LBTI) un *Bowman-Birk* inhibitors (BBI), plazmas polipeptīdu inhibitors, kas pazīstams arī kā BPTI (liellopu aizkuņģa dziedzera pamata tripsīna inhibitors) vai aprotinīns, ko lieto terapijā kā antifibrinolītisku līdzekli (Masurier et al., 2017). Nesen tika patentēti arī cikliskie depsi-peptīdi, kas spēj inhibēt KLK7 ($IC_{50} = 0,4-6$ nM) (Masurier et al., 2017). Šiem savienojumiem, kas izolēti no baktērijas *Chondromyces crocatus* ir selektivitātes trūkums, jo tie inhibē arī citas proteāzes, piemēram, himotripsīnu (Masurier et al., 2017). Dabīgie heterocikliskie atvasinājumi kā inhibitori - izokumarīni, kas iegūti no Brazīlijas augs *Paepalanthus bromelioides* Silv., tika identificēti kā konkurētspējīgi KLK5 un KLK7 inhibitori (Masurier et al., 2017). Fukugetīni - flavanona-flavona biflavonoīdu savienojums, kas iegūts no Brazīlijas augs (*Garcinia brasiliensis* Mart.) inhibē vairākus KLK mikromolāras koncentrācijas diapazonā (Masurier et al., 2017).

Bez dabiskajiem peptīdiem ir arī sintētiskie peptīdu atvasinājumi. Tika izstrādāti vairāki analogi un ziņots, ka vairāki šie sintētiskie analogi inhibē KLK. Hlormetilketona peptīdi spēj kovalenti saistīties un inhibēt KLK (Masurier et al., 2017). Kā piemēram, hlormetilketons tika atklāts kā kovalentais inhibitors, kas spējīgs inhibēt KLK1, KLK4

un KLK8 (Masurier et al., 2017) . Citi peptīdi - Borona tipa peptīdi ir izstrādāti kā KLK3 inhibitori (Masurier et al., 2017) . Kā arī eksistē vēl nepeptīdu sintētiskie atvasinājumi, kas inhibē kallikreīna aktivitāti (Masurier et al., 2017).

1.3. Dabas vielas kā AKE1 un AKE2 inhibitori

Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka polifenoliem ir dažādas bioloģiskas un ārstnieciskas īpašības cilvēku slimību kontrolei un ārstēšanai. Šīm vielām piemīt antioksidanta, antiaterosklerozes, antihipertensīva un pretiekaisuma efekti (R et al., 2020). Tomēr bioloģiskās aktivitātes ir atkarīgas no to strukturālajiem aspektiem, piemēram, brīvo –OH aizvietotāju skaita vai atrašanās vietas un glikozilācijas procesa (R et al., 2020). Tādējādi katram savienojumam ir atšķirīgas bioloģiskās aktivitātes, un šīs aktivitātes būtu jāpēta individuāli katram savienojumam balstoties uz tā struktūras īpašībām (R et al., 2020).

Polifenoli ir dabiski augos sastopami mikroelementi. Tie ir iekļauti daudzos uztura bagātinātājos, un tos ir diezgan viegli iekļaut uzturā ar tādiem pārtikas produktiem kā augļiem, dārzeņiem, tējām un dažādām garšvielām. Zināmi vairāk nekā 8000 polifenolu veidu (Pandey and Rizvi, 2009). Visi augu fenola savienojumi rodas no starpprodukta fenilalanīna vai prekursora šikimīnskābes (Pandey and Rizvi, 2009). Galvenokārt tie sastopami konjugētā veidā ar vienu vai vairākiem cukura atlikumiem, kas saistīti ar hidroksilgrupām, lai gan pastāv arī tiešas cukura, piemēram, polisaharīda vai monosaharīda saites ar aromātisko oglekli. Bieža ir arī saistība ar citiem savienojumiem, piemēram, karbonskābēm, organiskajām skābēm, amīniem, lipīdiem un saistība ar citiem fenoliem (Pandey and Rizvi, 2009). Polifenolus var klasificēt dažādās grupās atkarībā no fenola gredzenu skaita un pēc struktūras elementiem, kas saista šos gredzenus vienu ar otru. Galvenās klases ietver fenola skābes, flavonoīdus, stilbēnus un lignānus (Pandey and Rizvi, 2009). Pētījumi liecina, ka polifenoli ir spēcīgi antioksidanti. Veicot antioksidantu lomu, tie novērš šūnu bojāumus, ko izraisa novecošanās, apkārtējā vide un paša cilvēka dzīvesveids (WebMD).

Viens no potenciālajiem pret COVID-19 zāļu terapeitiskajiem mērķiem ir AKE2. AKE2 tika identificēts kā galvenais funkcionālais COVID-19 receptors. AKE2, kas atrodas uz šūnu virsmas, efektīvi saistās ar CoV smailes proteīnu, tādējādi ļaujot vīrusam inficēt organisma epitēlija šūnas (Li et al., 2003). Iepriekšējie pētījumi parāda, ka dažiem flavonoīdiem piemīt AKE1 inhibīcija, kam ir izšķiroša nozīme arteriālā asinsspiediena regulēšanā (Al Shukor et al., 2013). Par flavonoīdu spēju ietekmēt AKE2 aktivitāti

interese radās tieši sakarā ar AKE2 iesaisti vīrusa iekļūšanai šūnā, kas izraisīja plašu AKE2 inhibitoru meklēšanu. No tā izriet apgalvojums, ka flavonoīdi var mijiedarboties arī ar AKE2. Lai gan jau eksistē vairāki sintētiskie AKE1 inhibitori, piemēram, lizinoprils, kaptoprils un enalaprils, un tos plaši izmanto veiksmīgai hipertensijas ārstēšanai, ilglaicīga šo sintētisko inhibitoru lietošana var būt saistīta ar daudzām nevēlamām blakusparādībām, piemēram, pastāvīgu klepu, nieru mazspēju un angioneirotisko tūsku (Al Shukor, 2016). Ir veikti plaši pētījumi, lai meklētu AKE inhibitorus starp dabīgiem produktiem, jo dabas vielām potenciāli varētu būt labāks zāļu profils un mazāk sagaidāmas blakusparādības (Al Shukor, 2016).

Pētot 22 fenola savienojumus ar mērķi noskaidrot, vai tie spēj inhibēt AKE, konstatēja, ka no visiem savienojumiem tanīnskābe uzrādīja visaugstāko aktivitāti (IC₅₀ 230 μM) (Al Shukor et al., 2013). Fenolskābēm un flavonoīdiem iegūtās IC₅₀ vērtības bija robežās no 0,41 līdz 9,3 mM (Al Shukor et al., 2013). Pētījums liecināja, ka fenolkābes un flavonoīdi inhibē AKE, mijiedarbojoties ar cinka jonu, un šo mijiedarbību stabilizē citas mijiedarbības ar aminoskābēm enzīma aktīvajā centrā. Citi savienojumi, piemēram, resveratrols un pirogalols, var inhibēt AKE, mijiedarbojoties ar aminoskābēm aktīvajā vietā, tādējādi bloķējot AKE katalītisko aktivitāti. Rezultātā sešiem flavonoīdiem, kas pārstāv 3 apakšklases (flavonols, flavanols un dihidrohalkons) atrada AKE inhibējošo aktivitāti ar IC₅₀ vērtībām no 0,415 līdz 1,381 mM (Al Shukor et al., 2013). Kvercētīns koncentrācijā 0,075 mM uzrādīja visaugstāko aktivitāti. Rutīns uzrādīja vidēju AKE inhibējošo aktivitāti, bet zemākā AKE inhibējošā aktivitāte tika novērota apigenīnam un floretīnam (Al Shukor, 2016).

Uzmanība tiek pievērsta arī dažādu dabas vielu ekstraktu spējai inhibēt AKE aktivitāti un ir veikti pētījumi ar zaļās un melnās tējas ūdens vai metanola ekstraktiem. Iepriekšējie pētījumi jau ir parādījuši, ka tējas ir bagātas ar polifenoliem, un tieši tiek izceltas zaļā un sarkanā tēja kā vienas no ar polifenoliem bagātākajām tējām (The Nutrition Source, 2019). Tējas polifenoli ir iesaistīti asinsspiediena regulēšanā ar salīdzinoši labu AKE inhibīciju (The Nutrition Source, 2019). Tējas spēja inhibēt AKE *in vitro* ir ļoti atkarīga no tējas veida un tajā esošo savienojumu struktūrām (Dong et al., 2011). Zaļajai tējai polifenoli tiek saglabāti neoksidētā katehīna formā, jo tējas svaigajām lapām polifenoloksidāzes enzīms tiek inaktivēts ar sausu karstumu vai tvaiku (Dong et al., 2011). Turpretim melnā tēja tiek ražota ar plašu polifenolu oksidāciju, kā rezultātā veidojas oksidēti un polimerizēti savienojumi, ko sauc par teorubigīniem un teaflavīniem (Dong et al., 2011). Ievērojama AKE inhibējošā aktivitāte kādā pētījumā tika atrasta miežu stādu metanola ekstraktam un izolētajiem polifenoliem no šī ekstrakta (Ra et al.,

2020). No šiem rezultātiem izsecināja, ka metanola ekstrakts satur augstu AKE inhibitoru līmeni. Jāatzīmē, ka jau iepriekš tika izpētīts, ka metanols ir piemērots šķīdinātājs maksimālai polifenolu ekstrakcijai no dabīgiem avotiem (Ra et al., 2020).

1.4. Dabas vielu spēja inhibēt kallikreīna aktivitāti

Jau gadsimtiem ilgi dažādi ārstniecības augi ir izmantoti, lai ārstētu slimības, kas saistītas ar iekaisumu un tikuši pielietoti kā profilaktiski līdzekļi. Daudz un dažādas dabas vielas ir pētītas kā potenciālie AKE1 un AKE2 inhibitori, bet ņemot vērā kallikreīna sistēmas ciešo saikni ar AKE, domājams, ka šīm vielām varētu būt arī kallikreīna inhibīcijas spēja. Dažādi pētījumi apskata dažas vielas ar potenciālo kallikreīna inhibīcijas spēju. Lai gan ir veikti pētījumi, kuros dažādām dabas vielām ir atrasta spēja inhibēt kallikreīna aktivitāti, to tālākā sasaite un pētīšana pielietošanā pie COVID-19 vai HAE nav veikta.

Tika izpētīts, ka attīrīta melnās tējas ūdens ekstrakta frakcija inhibēja gan kallikreīnu, gan aktivēto FXII (Madkhali et al., 2021). No iegūtajiem rezultātiem tika izsecināts, ka melnās tējas ūdens ekstraktam piemīt pretiekaisuma iedarbība, ko var izskaidrot ar daļēju kallikreīna un aktivētā FXII inhibīciju, kā rezultātā tiek samazināta bradikinīna veidošanās (Madkhali et al., 2021). Pēc tējas patēriņa uz vienu iedzīvotāju visā pasaulē var vilkt paralēles, ka šie secinājumi ir nozīmīgi, jo valstis ar augstu tējas patēriņu ziņo par zemu iedzimtu angioneirotiskās tūskas lēkmju biežumu un smagumu to iedzīvotāju vidū (Statista, 2016 un Madkhali et al., 2021).

Fitoķīmiskajām vielām ir liels pretiekaisuma potenciāls, tostarp modulējot citokīnus un oksidētājus. Melnā tēja līdzīgi kā daudzi citi augi ir bagāta ar dažādiem bioaktīviem savienojumiem. Balstoties uz šo faktu, tika izvirzīta hipotēze, ka ilgstoša melnās tējas lietošana varētu samazināt plazmas kinīnu veidojošo enzīmu aktivitāti sistēmiskajā un plaušu asinsvadu sistēmā neatkarīgi no polifenolu pretiekaisuma iedarbības (Madkhali, 2015). Šī hipotēze tika pārbaudīta pētījumā, kura laikā tika noteikta un raksturota tējas neapstrādātā ūdens ekstrakta un tā galveno bioaktīvo savienojumu inhibējošā iedarbība uz plazmas kinīnu veidojošajiem enzīmiem, kā arī papildus inhibējošai darbībai tika pētīta augu un fitoķīmisko vielu inhibējošā iedarbība potenciāli klīniskam pielietojumam, modulējot kinīnu veidojošos enzīmus vai sintezējot jaunus pret tūskas un pretiekaisuma līdzekļus (Madkhali, 2015). Interesanti, ka tēja efektīvi inhibēja aktivēto FXII un kallikreīnu, bet izolētie galvenie tējas polifenoli neinhibēja šos enzīmus. Rezultātā šis pētījums apstiprināja, ka tēja efektīvi kavē aktivētu

FXII izraisītu šūnu migrāciju un inhibē bradikinīna izdalīšanos no augstas molekulmasas kininogēna, aktivējot FXII mediētu kallikreīna ražošanu (Madkhali, 2015).

Augu sekundārajiem metabolītiem ir būtiska un pat svarīgākā loma dažādos fizioloģiskos procesos. Šie metabolīti var darboties kā antioksidanti, pretinfekcijas līdzekļi, antibakteriāli, pretsēnīšu, vielmaiņas, lipīdu līmeni pazeminoši līdzekļi, kā arī darboties kā vielas ar aizsargājošu funkciju pret sirds un asinsvadu, kuņģa-zarnu trakta un deģeneratīvām slimībām (Bond, 2019). Augiem ir daudz sekundāro metabolītu un fitoķīmisko savienojumu, kas ir ļoti labi izpētīti bioķīmiskās un molekulārās ģenētikas līmenī un tie tiek izmantoti cilvēku veselības aprūpes nozarē, bet ir arī citi mazāk izpētīti mazas molekulmasas proteīni, kas inhibē proteāzes (Bond, 2019). Iepriekš pastāvēja uzskats, ka proteīnu saturošie proteāzes inhibitori galvenokārt ir tikai proteīnu noārdošie fermenti (Bond, 2019). Mūsdienās šis uzskats ir ievērojami mainījies, un šobrīd proteāžu inhibitori tiek uzskatīti par ļoti svarīgām signalizācijas molekulām daudzos bioloģiskos procesos, piemēram, iekaisumos, apoptozē, asins recēšanā un hormonu metabolismā (Srikanth and Chen, 2016). Pēdējos gados proteāžu inhibitori ir plaši pētīti kā terapeitiskie līdzekļi, galvenokārt, lai cīnītos pret dažādiem cilvēku vēža veidiem.

Ņemot vērā augu sekundāro metabolītu nozīmīgumu, tika veikts pētījums, kurā no dažādām augu sugām tika izolēti un raksturoti daudzi proteāzes inhibitori. Proteāzes inhibitori veido lielāko daļu augu atvasinājumu, un tie var būt ļoti efektīvi vīrusu izraisītas infekcijas kontrolē. Pēdējie pētījumi tika veltīti, lai atklātu proteāzes inhibitorus, kas kontrolētu COVID-19 vīrusa izplatību (Mohammadi and Shaghaghi, 2020). Tika izpētīts, ka kurkuma sekundārajam metabolītam kurkumīnam ir vispēcīgākā mijiedarbība ar proteāzes enzīmu COVID-19 molekulās (Mohammadi and Shaghaghi, 2020).

Atsevišķā pētījumā, kurā fokuss netika vērsts uz COVID-19, arī tika atklāti dažādi augu sekundārie metabolīti kā dabiskie proteāzes inhibitori. Proteāzes inhibitori tika izolēti no *Scopolia japonica* (japāņu belladonna) kultivētām šūnām, un tika izpētīts, ka šiem savienojumiem piemīt tripsīna, himotripsīna, kallikreīna, plazmīna un pepsīna inhibējoša iedarbība (Srikanth and Chen, 2016).

Vēl kādā pētījumā tika raksturoti bauhinijas auga kunitz tipa proteāzes inhibitori. Bauhinijas auga sēklas ir bagātas ar serīna un cisteīna proteāzes inhibitoriem (Oliva and Sampaio, 2008). Pētnieki no *Bauhinia bauhinoides* sēklām izolēja *Bauhinia bauhinoides* kallikreīna inhibitoru (BbKI), kas ir 18 kDa proteīns ar līdzīgu primāro struktūru kā citiem kunitz tipa augu inhibitoriem, bet kuram nav disulfīdu tiltu (Srikanth and Chen, 2016). Tika izpētīts, ka *Bauhinia bauhinoides* kallikreīna inhibitors ir spējīgs

inhibēt plazmas kallikreīnu, plazmīnu, liellopu tripsīnu, liellopu himotripsīnu, cūku aizkuņģa dziedzera kallikreīnu un peles plazmas kallikreīnu (Oliva and Sampaio, 2008). No šīs pašas augu sugas tika izolēts vēl viens cilvēka plazmas kallikreīna inhibitors. No *Bauhinia rufa* izolēja inhibitoru, kuru nosauca to par BrTI (*B. rufa* tripsīna inhibitoru) (Srikanth and Chen, 2016). Starp *Bauhinia* inhibitoriem, kas ietekmē plazmas kallikreīna aktivitāti, BbKI ir visefektīgākais inhibitors, ar tā strukturālo līdzību ar bradikinīna secību kininogēnā varētu izskaidrot BbKI selektīvo saistīšanos ar cilvēka plazmas kallikreīnu (Oliva and Sampaio, 2008).

Pētījumā ar garšaugiem arī tika atrasti nozīmīgi atklājumi. Desmit garšaugu ūdens ekstraktiem tika pārbaudīta kallikreīna inhibīcijas spēja. Garšaugi uzrādīja no koncentrācijas atkarīgu gan kallikreīna, gan aktivētā FXII inhibīciju (Madkhali et al., 2021). Tika noskaidrots, ka anīss bija visspēcīgākais kallikreīna inhibitors ar IC50 vērtību aptuveni 26 µg / µL (Madkhali et al., 2021). Melnie pipari, kanēlis, koriandrs, magoņu sēklas un timiāns bija aptuveni piecas reizes mazāk efektīvi nekā anīss (Madkhali, 2015).

Pētījumā no ziedoša augu koka *Terminalia* izolētajiem savienojumiem arī tika atklāti kallikreīna inhibitori (Madkhali et al., 2021). Lai gan šis pētījums tika veikts, lai salīdzinātu no šī koka izolētu savienojumu inhibīcijas spēju ar melnās tējas ekstrakta inhibīcijas spēju, rezultāti bija nozīmīgi. Salīdzināja *Terminalia* auga (*Terminalia arjuna*, *Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula*) ekstraktu un melnās tējas ekstrakta inhibīcijas spēju, jau zinot, ka melnās tējas ekstrakts daļēji inhibē kallikreīnu un aktivēto FXII (Madkhali et al., 2021). *Terminalia* auga ekstrakts uzrādīja bradikinīna efektu modulējošas īpašības un spēju inhibēt aktivēto FXII (Madkhali et al., 2021). *Terminalia arjuna* augļu ekstrakts inhibēja kallikreīnu ar IC50 vērtību $200 \pm 6,6$ µg/µL (Madkhali et al., 2021). No visiem trīs augu ekstraktiem tālāk tika izolēti bioaktīvie savienojumi ar mērķi pārbaudīt to inhibējošo ietekmi uz FXII. No visiem izolētajiem savienojumiem gandrīz nevienam nebija inhibējošas aktivitātes, kas norāda, ka FXII ir ļoti selektīvs reaģentu izvēlē (Madkhali et al., 2021). Vienīgais savienojums, kas uzrādīja inhibīcijas spēju bija arjunglikozīds II, jo tas inhibēja aktivēto XII faktoru ar IC50 vērtību 300 µM. Pie tam tika novērota gandrīz pilnīga FXII aktivitātes inhibīcija (Madkhali et al., 2021). Šī pētījuma rezultāti liek domāt, ka arjunglukozīdu II var uzskatīt par potenciāli noderīgu aktivētā FXII inhibitoru.

Vairāki atklātie augu proteāžu inhibitori tiek tālāk pētīti *in vivo* klīniskajos pētījumos. Par labiem proteāžu inhibitoru avotiem ir atzītas tādas augu kultūras kā pupiņas, kartupeļi, mieži, skvošs, prosa, kvieši, griķi, zemesrieksti, aunazirņi, kukurūza

un ananāsi (Srikanth and Chen, 2016). Dabiskie proteāžu inhibitori atšķiras savā starpā pēc iedarbības koncentrācijas, proteāzes specifiskuma, siltuma stabilitātes, un dažreiz vienā sugā vai audos var būt vairāki proteāžu inhibitori (Srikanth and Chen, 2016).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Reāģenti

1. Plasmas Kallikreīna Inhibitoru skrīninga reāģentu komplekts
(Katalogs #K989-100 (BioVision, Inc., Milpitas, Kalifornija, ASV))
2. Florizīns (Sigma-Aldrich)
3. Kvercetīns (Sigma-Aldrich)
4. Rutīns (Sigma-Aldrich)
5. Cianidīna-3O-glikozīds (Sigma-Aldrich)
6. Kaptoprils (Sigma-Aldrich)
7. MLN-470 (Sigma-Aldrich)
8. Zaļā tēja (“Lipton classic Herbata Zielona”)
9. Dimetilsulfoksīds (DMSO) (Sigma-Aldrich)
10. PBS buferis pH 7,4 (fosfātbuferis ar nātrija hlorīdu) (Sigma-Aldrich)

2.2. Aparatūra un materiāli

- 96-lauciņu mikroplates caurspīdīgas ar plakanu dibenu (Sardstedt AG&Co, Nimbredta, Vācija)
- Automātiskās pipetes ar dažādu tilpumu – 20, 100, 200 un 50 μ l
- Daudzkanālu pipetes ar maksimālo tilpumu līdz 300 μ l
- Šķidrums uzpildes vanniņas (Sardstedt)
- Multikanālu pipetes (Sardstedt)
- Pipešu uzgaļi (Sardstedt)
- Flomāsteri rakstīšanai uz plastmasas (Sardstedt)
- Ependorfa mēģenes (Sardstedt)
- Mēģenes 15 ml un 50 ml (Sardstedt)
- Mikroplašu lasītājs (Tecan microplate reader infinite m200, Tecan group Ltd, Mannedorfa, Šveice)
- Analītiskie svāri Precisa XB 120 A (SERIES 320 XB D99 – D9 – 030),
- Vortex maisītājs (Biosan, Latvija),
- Dators savienots ar mikroplašu lasītāju.

2.3. Plasmas kallikreīna inhibitoru skrīninga metode

Plasmas kallikreīna inhibitoru skrīninga metode ir aprakstīta komplekta ražotāja “BioVision” instrukcijā. “BioVision” plazmas kallikreīna inhibitoru skrīninga metodē izmanto plazmas kallikreīna spēju šķelt sintētisko pNA bāzes peptīdu substrātu, lai atbrīvotu to (tam ir absorbcija pie 405 nm), un to var noteikt, izmantojot mikroplašu lasītāju. Plasmas kallikreīna inhibitoru klātbūtnē šī substrāta šķelšanās tiek samazināta vai pat pilnībā pārtraukta, kā rezultātā samazinās vai pilnībā tiek zaudēta pNA absorbcija. Šī metode tiek izmantota, lai pētītu, raksturotu, vai pārbaudītu iespējamus plazmas kallikreīna inhibitorus.

PK Substrāts-pNA $\xrightarrow{\text{PK}}$ Šķelts substrāts + pNA (OB405 nm)
(OB ir optiskais blīvums.)

PK Substrāts-pNA $\xrightarrow{\text{PK}}$ pNA absorbcijas samazināšanās/zaudēšana (OB405 nm)
+ PK inhibitors

Plasmas kallikreīna inhibitoru skrīninga komplekts jāuzglabā -20°C , tas ir jāsargā no tiešas gaismas. Pirms atvēršanas flakonus ir īsu brīdi jānocentrifugē ar mazu ātrumu.

Plasmas kallikreīna inhibitoru skrīninga komplekts iekļauj šādus reaģentus:

- PK testa buferšķīdumu 25 ml
- Cilvēka PK 1 flakons
- PK Substrāts 1 ml
- PK Inhibitors (1 mU/ μL) 0,1 ml

Pirms darba uzsākšanas :

- PK testa buferšķīdums - pirms lietošanas flakons jāatsilda līdz istabas temperatūrai. Jāuzglabā $+4^{\circ}\text{C}$ vai -20°C temperatūrā.
- PK inhibitors: ja neizmanto uzreiz, tad ir jāalikvotē un jāuzglabā -20°C . Jāizvairās no atkārtotas sasaldēšanas/atkausēšanas. Pirms lietošanas, ja nepieciešams, jāatkausē.
- Cilvēka PK: jāizšķīdina ar 1,1ml PK testa buferšķīduma un jāuzglabā -20°C temperatūrā. Jāizvairās no atkārtotas sasaldēšanas/atkausēšanas.

Darba gaita:

1. Testa komplekts ir jāuzglabā -20°C , aizsargātam no gaismas, tādēļ pirms darba sākuma sākumā ir jāizņem no saldētavas un jāpatur istabas temperatūrā.
2. Ar analītiskajiem svāriem nosver visas vielas, kuras pētīs (florizīnu, rutīnu, kvercetinū, cinanidīna-3O-glikozīdu) un izšķīdina DMSO koncentrācijā 100 mg/ml. Tad ar komplekta buferšķīdumu sagatavo atšķaidījumus – 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml un 0,625 mg/ml. Atšķaidījumu koncentrācijas ir 10x lielākas par tām, kuras būs reakcijā ar enzīmu.
3. Pagatavo zaļo tēju jeb tējas ūdens ekstraktu. Uz 1,6 g zaļās tējas uzlej 8 ml verdoša ūdens, un atstāj uz 30 min ievilkties.
4. Kaptoprila un MLN-4760 šķīdumus sagatavo attiecīgi 10 mM un 50 μM koncentrācijās metodes buferšķīdumā un atšķaida kaptoprilu līdz koncentrācijai 5 un 2,5 mM, bet MLN-4760 līdz 25 un 12,5 μM .
5. PK enzīms tiek izšķīdināts 1,1 ml testa buferšķīdumā. Katrā mikroplates lauciņā iemēra 10 μl PK enzīma šķīduma. Sagatavo 3 paralēlos lauciņus neinhibēta enzīma kontrolei, kuros ir 40 μl buferis un 10 μl enzīma.
6. Reaģentu kontrolei iemēra 50 μl bufera 3 lauciņos.
7. Lauciņos, kas nav reaģentu un enzīma kontroles, iemēra 30 μl bufera, 10 μl enzīma un 10 μl pētāmo vielu un tējas dažādās koncentrācijas.
8. Inkubē istabas temperatūrā 15 minūtes.
9. Sagatavo PK substrāta maisījumu ar aprēķinu, lai katrā lauciņā varētu iemērīt 50 μl PK substrāta maisījuma (40 μl PK testa buferšķīduma; 10 μl PK substrāta). Izšķīdina substrāta maisījumu, intensīvi maisot 5 minūtes. Pievieno 50 μl PK substrāta maisījuma visiem plates lauciņiem. Kārtīgi samaisa.
10. Enzimātiskā reakcija sākas ātri un absorbciju mēra pie 405 nm (OB405) kinētiskajā modelī 1 stundu, uzturot mikroplašu lasītājā 37°C temperatūrā.
11. Ja rēķina enzimātiskās reakcijas ātruma kinētiku, tad izvēlas divus laika punktus t_1 un t_2 , bet, ja mēra pēc fiksēta laika, tad nolasa absorbciju beigu punktā un aprēķina inhibīciju %, salīdzinot ar neinhibēta enzīma kontroli, kuru pieņem par 100% aktivitāti un 0% inhibīciju. Šī pētījuma ietvaros absorbcija tika nolasīts pēc 1h.
12. Reaģentu komplektā pievienotais PK inhibitors ir inhibitora kontrole, kuram IC_{50} ir norādīta $21,7 \pm 3 \mu\text{U}$ ($n = 3$).

2.4. Datu apstrāde un statistiskā analīze

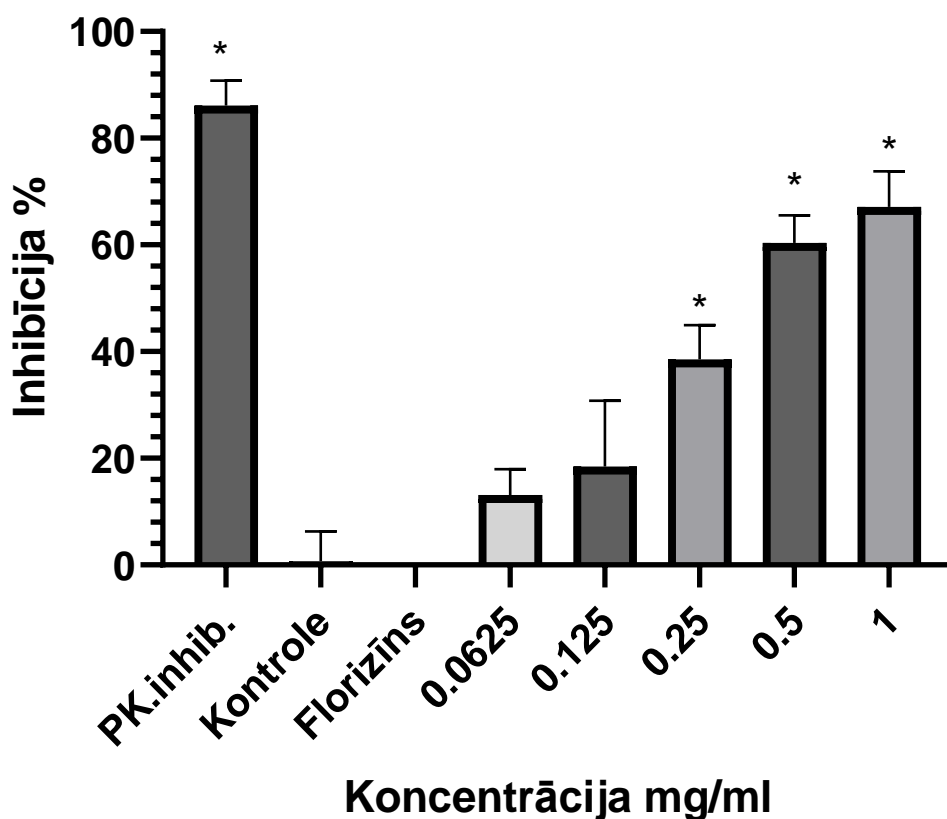
Eksperimenti atkārtoti 3 reizes, un rezultāti aprēķināti kā vidējais ar standartnovirzi (SD). Dati aprēķināti un analizēti ar ANOVA (*one-way analysis of variance*) ar sekojošu Dunnett daudzkārtēju salīdzinājumu testu (*multiple comparison test*) ar GraphPad Prism programmas versiju 8.0 (Graph Pad Software, Inc. San Diego, CA, USA). Statistiskā ticamība starp grupām aprēķināta ar $P \leq 0,05$.

3. REZULTĀTI

Ar cilvēka plazmas kallikreīna inhibitoru skrīninga metodi iegūtie rezultāti norādīja uz to, ka dažādām dabas vielām piemīt spēja inhibēt kallikreīna aktivitāti *in vitro*. Eksperimentā tika mērīts optiskais blīvums pie 405 nm. Šīs metodes pamatā ir aktīvā plazmas kalikreīna spēja šķelt sintētisko pNA bāzes peptīdu substrātu, lai atbrīvotu pNA (OB405 nm), ko pēc tam izmēra, izmantojot mikroplašu lasītāju. Plazmas kallikreīna inhibitoru klātbūtnē šī substrāta šķelšanās tiek samazināta vai pat pārtraukta, kā rezultātā samazinās vai pilnībā tiek zaudēta pNA absorbcija.

Eksperimentā tika pārbaudītas 5 dabas vielas – florizīns, kvercētīns, rutīns, cianidīna-3O-glikozīds un zaļās tējas ūdens ekstrakts, kā arī jau zināmie AKE1 un AKE2 selektīvie inhibitori – kaptoprils un MLN-4760. Florizīna, kvercētīna, rutīna un cianidīna-3O-glikozīda efekts tika testēts piecās koncentrācijās – 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25mg/ml, 0,5 mg/ml un 1 mg/ml. Attēlos attēlots vidējais paraugu cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%) ar standartnovirzi.

Florizīna cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcija *in vitro*. Florizīna efekts uz kallikreīna aktivitāti tika pētīts koncentrācijās no 0,0625 mg/ml līdz 1 mg/ml. Pēc 1 h enzimatiskās reakcijas norises iestājās plato līmenis, un aprēķiniem izmantojām fiksēto absorbcijas beigu mērījumu. PK inhibitoru reagentu komplektā nav atšifrēts, tāpēc attēlā tas parādīts kā pozitīvā references viela bez norādes uz koncentrāciju.

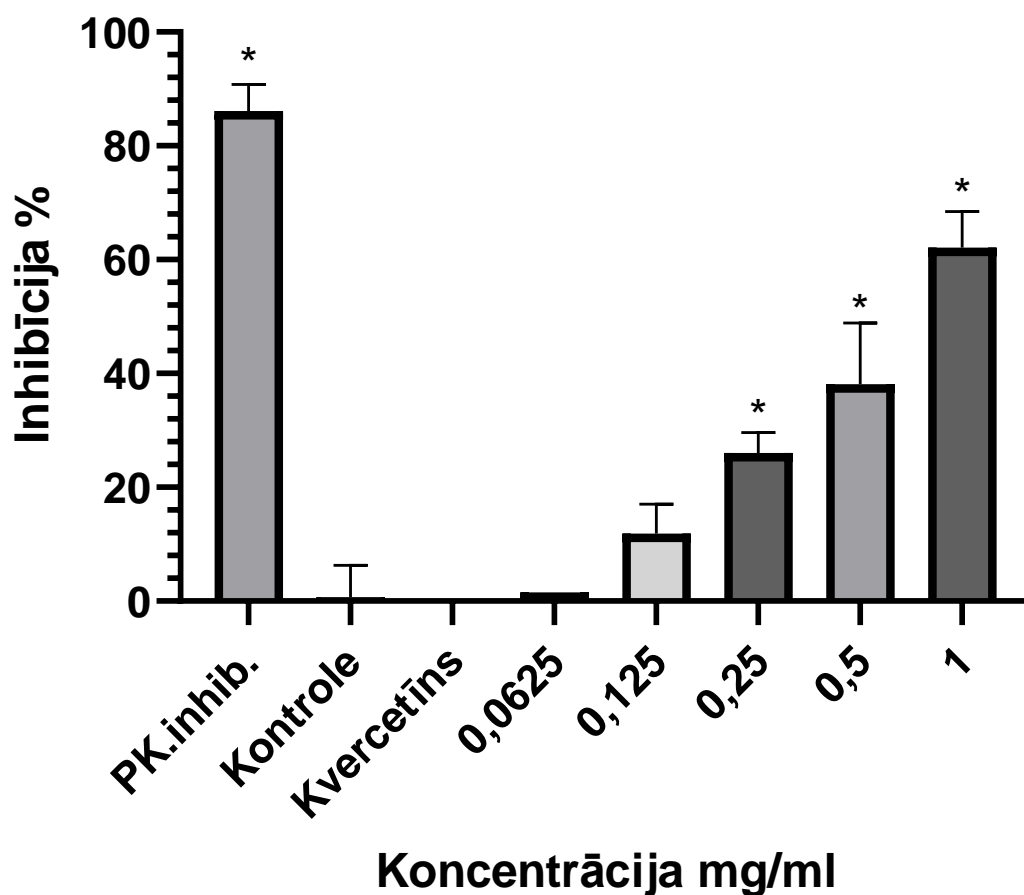


3.4. att. Florizīna cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%)

Rezultāti parādīti kā vidējais ar standartnovirzi.

* $P \leq 0,05$, salīdzinot ar kontroli, kad enzīma inhibīcija ir 0, bet aktivitāte 100%.

Attēlā 3.4. redzams, ka florizīns uzrāda no koncentrācijas atkarīgu kallikreīna inhibīcijas efektu. Diapazonā no 0,25 mg/ml līdz 1 mg/ml inhibīcija ir statistiski nozīmīga, salīdzinot ar enzīma kontroli. Testā izmantotās mazākās koncentrācijas (0,0625 un 0,125 mg/ml) neuzrādīja statistiski ticamu atšķirību. Florizīna sliktās šķīdamības ūdens vidē dēļ nav iespējams izmantot lielākas koncentrācijas.

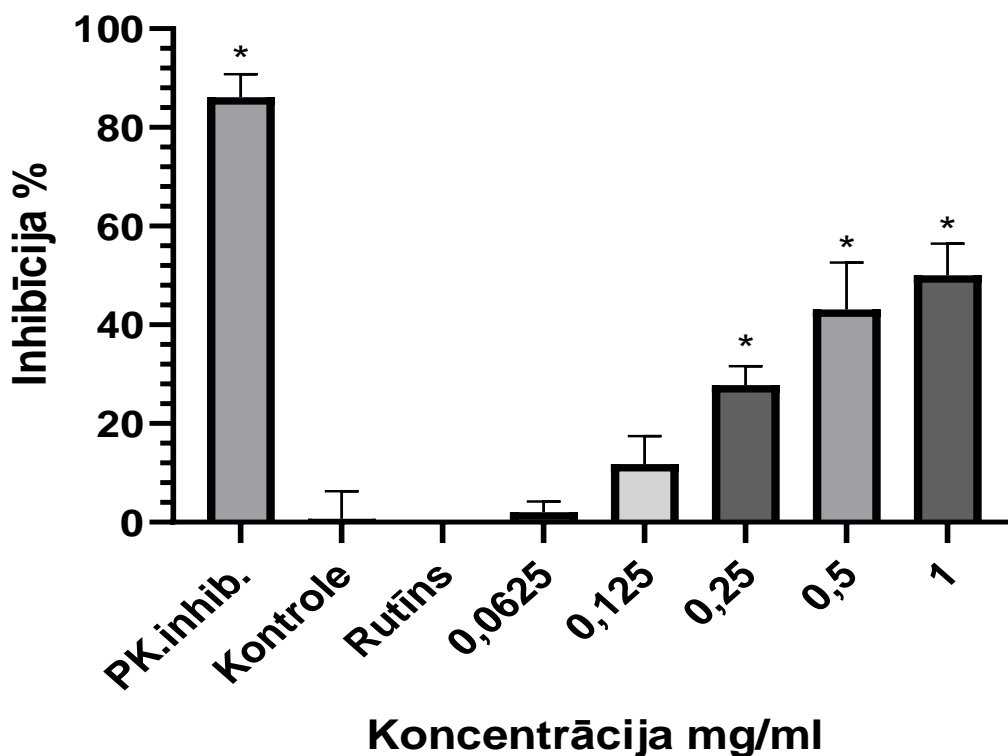


3.5. att. Kvercetīna cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%)

Rezultāti parādīti kā vidējais ar standartnovirzi

* $P \leq 0,05$, salīdzinot ar kontroli, kad enzīma inhibīcija ir 0, bet aktivitāte 100%

Kvercetīna cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcija *in vitro*. Kvercetīna cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcija novērota no koncentrācijas 0,125 mg/ml, tomēr statistiski atšķirīga no enzīma kontroles tā ir koncentrācijas 0,25, 0,5 un 1 mg/ml (skatīt 3.5. attēlu). Līdzīgi kā florizīnam arī kvercetīnam ir slikta šķīdība ūdens vidē un augstākās koncentrācijās par 1 mg/ml izkrīt nogulsnes. Tāpēc 1 mg/ml pieņemām par maksimālo koncentrāciju *in vitro* metodē. PK inhibitors uzrāda lielāku efektu par kvercetīna efektu, bet, nezinot PK inhibitora koncentrāciju, nevaram šo abu vielu efektivitāti salīdzināt.

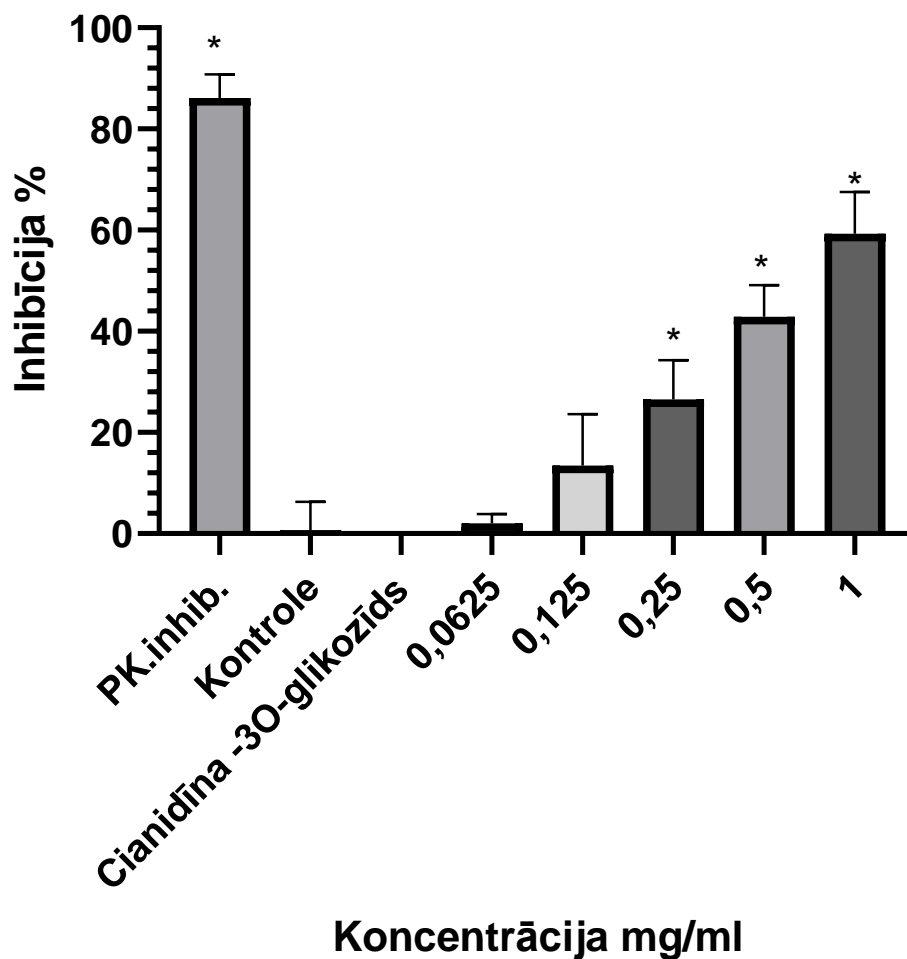


3.6. att. Rutīna cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%)

Rezultāti parādīti kā vidējais ar standartnovirzi

* $P \leq 0,05$, salīdzinot ar kontroli, kad enzīma inhibīcija ir 0, bet aktivitāte 100%

Rutīna cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcija *in vitro*. Attēlā 3.6. redzams, ka rutīns, sākot no koncentrācijas 0,25 mg/ml uzrāda statistiski atšķirīgu no enzīma kontroles kallikreīna aktivitātes inhibīciju. Visaugstāko plazmas kallikreīna inhibīcijas spēju rutīns uzrādīja koncentrācijā 1mg/ml, kas ir testā pētītā visaugstākā koncentrācija. Novērojams, ka koncentrācijai augot palielinājās arī inhibīcijas efekts, bet testā izmantotās mazākās koncentrācijas (0,0625 un 0,125 mg/ml) neuzrādīja statistiski ticamu atšķirību.

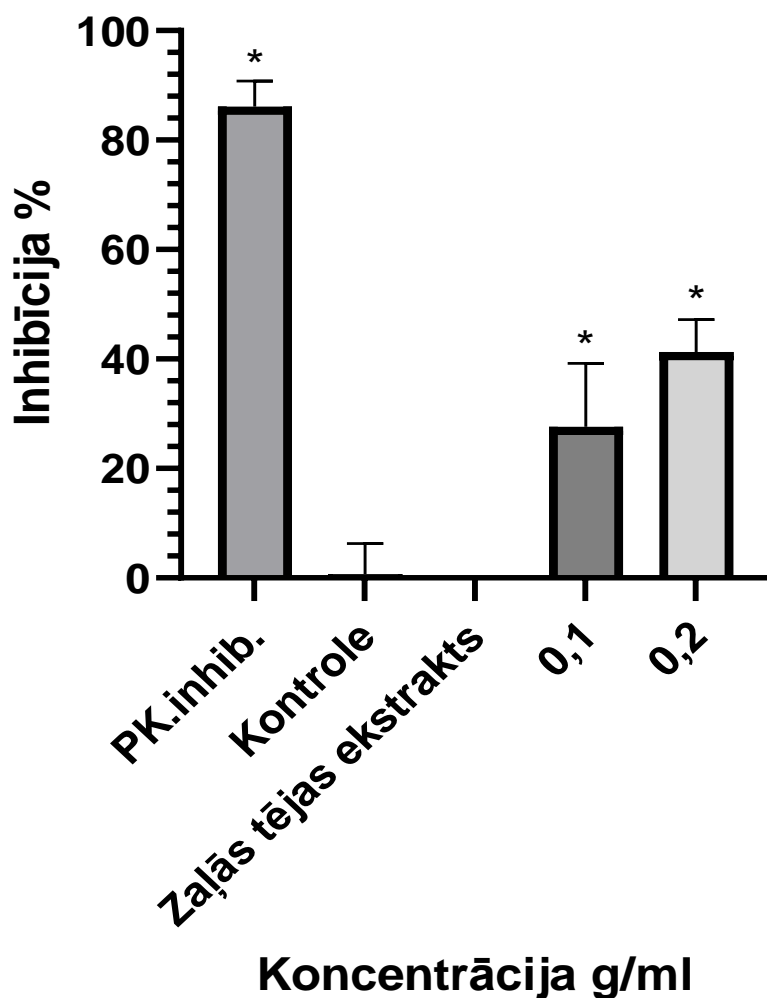


3.7. att. Cianidīna-3O-glikozīda cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%)

Rezultāti parādīti kā vidējais ar standartnovirzi

* $P \leq 0,05$, salīdzinot ar kontroli, kad enzīma inhibīcija ir 0, bet aktivitāte 100%

Cianidīna-3O-glikozīda cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcija *in vitro*. Cianidīna-3O-glikozīds ir antocianīnu grupas pārstāvis. Tas līdzīgi kā augstākminētie polifenoli inhibē kallikreīna aktivitāti. Statistiski ticama atšķirība no neinhibēta enzīma kontroles tika sasniegta koncentrācijās 0,25, 0,5 un 1 mg/ml (skatīt 3.7. attēlu). Pozitīvā kontrole ar PK inhibitoru parāda, ka cianidīna-3O-glikozīds līdzīgu efektu nesasniedz.



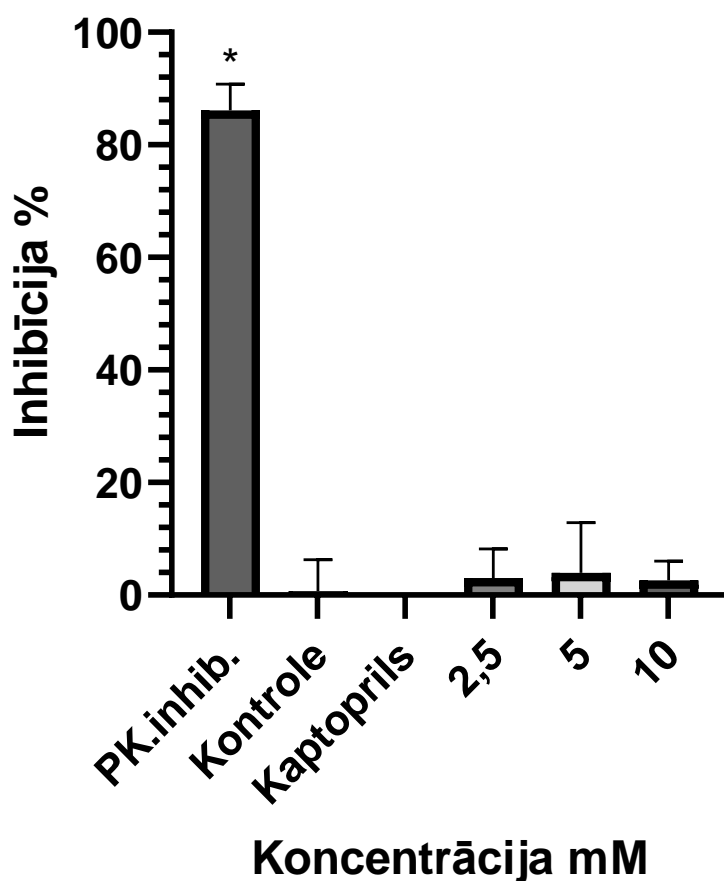
3.8. att. Zaļās tējas ūdens ekstrakta cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%)

Rezultāti parādīti kā vidējais ar standartnovirzi.

* $P \leq 0,05$, salīdzinot ar kontroli, kad enzīma inhibīcija ir 0, bet aktivitāte 100%

Zaļās tējas cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcija *in vitro*. Zaļā tēja jeb tējas ūdens ekstrakts metodē ir no sākotnējās koncentrācijas 2 g/ml 10x atšķaidījies un augstākā koncentrācija reakcijas vidē ir 0,2 g/ml. Tā uzrāda apmēram 40% kallikreīna inhibīciju. Statistiski ticams efekts zaļajai tējai ir arī koncentrācijā 0,1 g/ml. Pozitīvā PK inhibitora kontrole visos eksperimentos ir vienāda un uzrāda apmēram 80% inhibīciju. (skatīt 3.8. attēlu)

Angiotenzīna konvertējošo enzīmu sintētisko inhibitoru cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcija *in vitro*. Kaptoprils ir selektīvs ACE1 inhibitors, bet MLN-4760 selektīvs ACE2 inhibitors.

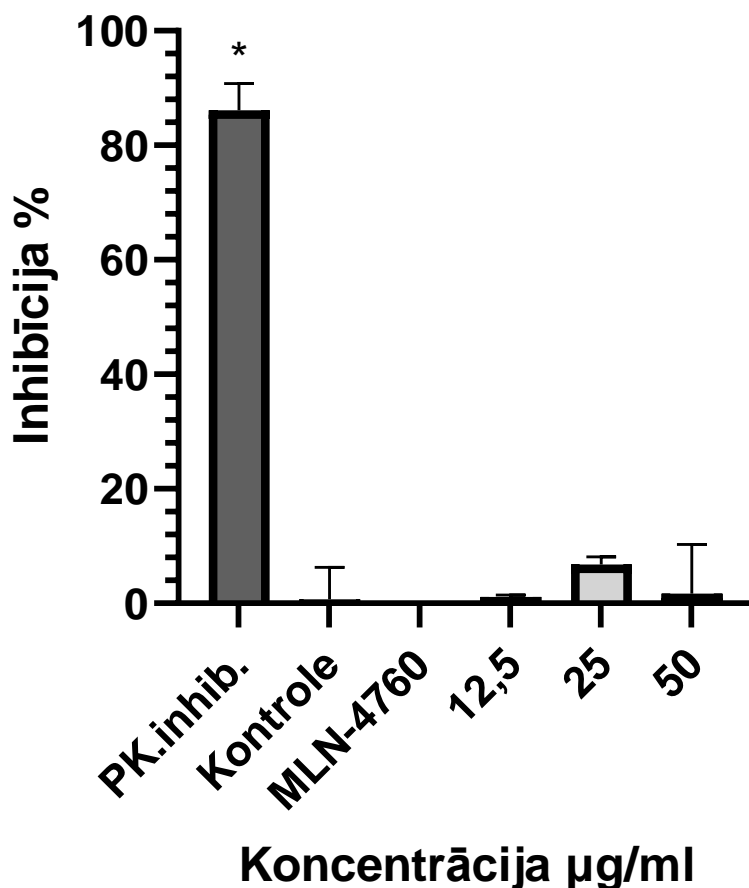


3.9. att. Kaptoprila cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%)

Rezultāti parādīti kā vidējais ar standartnovirzi

* $P \leq 0,05$, salīdzinot ar kontroli, kad enzīma inhibīcija ir 0, bet aktivitāte 100%

Rezultāti parāda, ka kaptoprils neinhibē plazmas kallikreīna aktīviāti nevienā testā izmantotajā koncentrācijā (skatīt 3.9. attēlu). Tas apliecina, ka kaptoprilam nav konstatēta duāla abu enzīmu ACE1 un kallikreīna inhibīcijas spēja.



3.10. att. MLN-4760 cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efekts (%)

Rezultāti parādīti kā vidējais ar standartnovirzi

* $P \leq 0,05$, salīdzinot ar kontroli, kad enzīma inhibīcija ir 0, bet aktivitāte 100%

MLN-4760 ir specifisks un selektīvs AKE2 inhibitors. Rezultāti rāda, ka tas šajā koncentrāciju intervālā kallikreīna aktivitāti neinhibē. (skatīt 3.10. attēlu)

3.1. Pētīto savienojumu cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas efektu salīdzinājums

Tabulā 3.1. salīdzināti vielu efekti to maksimālajās pētījumā izmantotajās koncentrācijās un, kas iepriekš ir parādīti individuālu vielu efektus atspoguļojošajos attēlos. Lai efektus varētu salīdzināt, kaptoprila un MLN-4760 molārās koncentrācijas ir pārrēķinātas mērvienībās mg/ml.

Polifenolu, zaļās tējas ekstrakta un AKE inhibitoru cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas spēja, %

Viola	Koncentrācija	Cilvēka plazmas kallikreīna vidējā inhibīcijas spēja %
Florizīns	1 mg/ml	67,1
Kvercetīns	1 mg/ml	62,2
Rutīns	1 mg/ml	50,1
Cianidīna-3O-glikozīds	1 mg/ml	59,3
Zaļās tējas ūdens ekstrakts	200mg/ml	41,3
Kaptoprils	2,17 mg/ml	Nav atrasta
MLN-4760	0,021 mg/ml	Nav atrasta

No tabulas 3.1. datiem redzams, ka aktīvākais kallikreīna inhibitors ir florizīns, tomēr citu polifenolu efekti ir tuvu un līdzīgi. Kvercetīns ir rutīna aglikons, bet izrāda lielāku efektu nekā glikozīda rutīns. Zaļās tējas polifenolu saturu mēs šajā eksperimentā nezinām, bet redzam, ka no tējas ar ūdeni izekstrahētais aktīvo vielu kopums ir mazāk aktīvs kallikreīna aktivitātes inhibētājs kā individuāli polifenoli. Sintētiskie AKE inhibitori plazmas kallikreīna aktivitāti neietekmē.

Pētāmajiem savienojumiem aprēķinājām kallikreīna inhibīcijas efektivitāti, izsakot to kā IC50 koncentrāciju.

Pētīto vielu cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas IC50

Viola	IC50 mg/ml
Florizīns	0,3729
Kvercetīns	0,6863
Rutīns	0,7960
Cianidīna-3-O-glikozīds	0,6698
Zaļās tējas ūdens ekstrakts	171, 6

IC50 ir kvantitatīvs rādītājs, kas norāda, cik daudz konkrētas inhibējošās vielas ir nepieciešams, lai *in vitro* par 50% inhibētu noteiktu bioloģisko procesu vai bioloģisko komponentu. Florizīns uzrādīja vismazāko IC50 koncentrāciju (0,3729 mg/ml), bet pārējie polifenoli uzrādīja savstarpēji līdzīgu IC50 koncentrāciju (skatīt 3.2.tabulā). Pēc IC50 koncentrācijas aprēķiniem izrādās, ka rutīns ir no šiem polifenoliem neaktīvākais kallikreīna inhibitors. Kaptoprilam un MLN-4760 IC50 nevar aprēķināt, jo netika atrasts kallikreīna aktivitāti inhibējošs efekts.

4. DISKUSIJA

Šī darba ietvaros pētījām piecu dažādu jau iepriekš atrasto dabīgo AKE1 un AKE2 inhibitoru un divu sintētisko AKE1 un AKE2 inhibitoru cilvēka plazmas kallikreīna inhibīcijas spēju *in vitro*. Šim pētījumam mēs izvēlējāmies tos polifenolus, kuriem gan pēc literatūras datiem, gan iepriekšējiem LU MF farmācijas laboratorijā veiktajiem pētījumiem bija atrasta AKE1 un AKE2 inhibīcijas spēja, bet nebija izpētīta to ietekme uz cilvēka plazmas kallikreīna aktivitāti (Birzniece, 2021).

COVID-19 pandēmijas rezultātā radās jauni nepieredzēti draudi cilvēku veselībai visā pasaulē, un pacientiem ar šo vīrusu bieži radās šķidruma uzkrāšanās plaušās, kas apgrūtina elpošanu vai lielus draudus dzīvībai. Tika izpētīts, ka vīruss SARS-CoV-2 iekļūst plaušu gļotādā, izmantojot AKE2, kas atrodas uz plaušu šūnu ārējās virsmas (Carvalho et al., 2021), un šī iemesla dēļ šo enzīmu uzskata par vīrusu receptoru. Pētnieki sāka vērst uzmanību COVID-19 sasaistei ar RAAS hormonu sistēmu un tās mijiedarbībai ar asinsvadu sistēmas un iekaisuma modulēšanu, izpētot, ka AKE2 trūkums izraisa paaugstinātu angiotenzīna II līmeni, kas savukārt paaugstina asinsspiedienu (Coto et al., 2021). Līdz ar šiem pētījumiem otrai nozīmīgajai AKE1 un AKE2 lomai kallikreīna-kinīna sistēmas regulēšanā netika pievērsta pastiprināta uzmanība, līdz pētnieks van de Veerdonk ar līdzautoriem sāka pētīt kallikreīna-kinīna sistēmas nozīmīgumu SARS vai COVID-19 patogēnēzē un ierosināja hipotēzi, ka viss sākas ar AKE2 un tā lomu kallikreīna-kinīna sistēmā. Tika izvirzīta hipotēze, ka COVID-19 pacientiem novērotais šķidruma pārpalikums plaušās varētu būt tāpēc, ka kinīni netiek neitralizēti AKE2 trūkuma dēļ (van de Veerdonk et al., 2020). Ja šī hipotēze izrādītos pareiza, tas nozīmētu, ka tieša kinīnu receptoru inhibēšana var būt vienīgais veids, kā apturēt šķidruma noplūdi COVID-19 pacientu plaušās slimības sākuma stadijā. Lai atrastu potenciālos kinīnu receptoru inhibitorus, datu bāzēs tika meklēti pētījumi, kuros jau iepriekš bija pierādīts, ka dažādām dabas vielām piemīt AKE1 un AKE2 inhibīcijas spēja *in vitro*, par šo tēmu ir rakstīti un publicēti daudzi literatūras apskati un pētījumi (Carvalho et al., 2021). Par flavonoīdu spēju ietekmēt AKE2 aktivitāti interese radās tieši sakarā ar AKE2 iesaisti vīrusa iekļūšanai šūnā, kas izraisīja plašu AKE2 inhibitoru meklēšanu, un arī iepriekšējā farmācijas maģistra darbā) tika pētīta dabas vielu ietekme uz AKE1 un AKE2 aktivitāti (Birzniece, 2021).

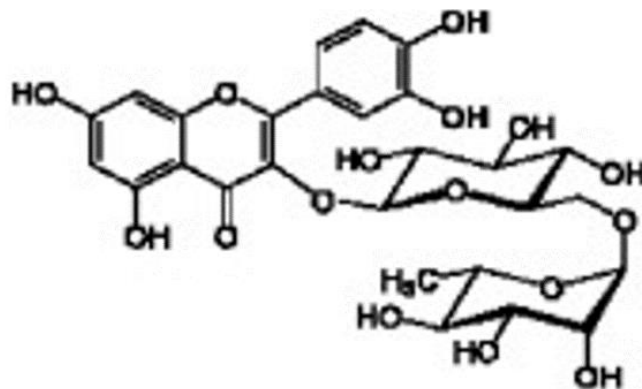
Iepriekš ir veikti daži pētījumi, kuros nejauši vai tieši tika atrastas dažādas dabas vielas kā kallikreīna inhibitori, bet to tālākā izpēte nav veikta, un dažas no tām vielām arī nav tikušas pētītas kā AKE inhibitori. Piemēram, tika izpētīts, ka attīrīta melnās tējas

ūdens ekstrakta frakcija spēj inhibēt gan kallikreīnu, gan aktivēto FXII, kas ir daļa no plazmas kallikreīna-kinīna sistēmas (KKS), un tādējādi tiek samazināta bradikinīna veidošanās (Madkhali et al., 2021).

Mūsu pētījumā izmantotās dabas vielas ir polifenoli, sīkāk klasificēti kā flavonoīdi. Polifenolus klasificē, pēc to fenola gredzenu skaitu, un struktūras elementiem, kas šos gredzenus saista (Pandey and Rizvi, 2009). Polifenoli tiek iedalīti četrās klasēs; fenolskābes, flavonoīdi, stilbēni un lignāni, bet arī katra polifenolu kalse dalās apakšklasēs. Flavanoīdus pamatojoties uz heterocikla veida atšķirībām var iedalīt sešās apakšklasēs: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antociānīni un izoflavoni (Pandey and Rizvi, 2009). No mūsu eksperimentos izmantotajām vielām rutīns un kvercētīns ir flavonoli, cianidīna-3O-glikozīds ir antociānīns, zaļajā tējā lielākā polifenolu daļa arī ir flavonoli, kurus parasti sauc par katehīniem, bet zaļā tēja satur arī citas klases polifenolus, piemēram, flavanolus, flavandiolus, flavonoīdus un fenolskābes, kā arī florizīns, kas ir dihidrohalkons. Rutīns, florizīns, kvercētīns un cianidīna-3O-glikozīds ir jau iepriekš pierādīti kā AKE 1 un AKE2 inhibitori, tomēr to spēja ietekmēt kallikreīnu konkrētajām vielām nav pietiekoši izpētīta.

Rutīns, ko sauc arī par soforīnu, rutozīdu vai kvercētīna-3-rutinoīdu, ir polifenola flavonoīds (Ganeshpurkar and Saluja, 2017). Dzīvie organismi paši nespēj sintezēt rutīnu, tāpēc to var uzņemt tikai ar augu izcelsmes produktiem, piemēram, ar griķiem, sīpoliem, apelsīniem, citroniem, vīnogām u.c. Rutīnam ir pierādīta neiroprotektīva ietekme uz smadzeņu išēmiju (Pu et al., 2007). Tam arī piemīt pretkrampju darbība, un tiek apgalvots, ka tas ir drošs lietošanai pacientiem ar epilepsiju. Rutīnam piemīt arī pretsāpju, pretdiabēta, antihiperholesterīna iedarbība, ka arī daudzas citas farmakoloģiskās aktivitātes (Ganeshpurkar and Saluja, 2017). Rutīns tiek uzskatīts par ļoti labu antioksidantu, jo tas spēj saistīt brīvos radikāļus un metāla jonus (Ganeshpurkar and Saluja, 2017). Tādējādi to var izmantot arī kā pretiekaisuma līdzekli, jo tas saistās ar brīvajiem radikāļiem, un novērš iekaisuma citokīnu transkripcijas faktoru indukciju. Ņemot vērā šīs īpašības, rutīns potenciāli varētu būt efektīvs hronisku iekaisuma slimību ārstēšanas palīg līdzeklis. Rutīns potenciāli arī varētu būt efektīvs līdzeklis pie aterosklerozes ārstēšanas, jo tas kavē lipīdu peroksidāciju, kas ir viens no riska faktoriem dažādu sirds un asinsvadu slimību gadījumos (Ganeshpurkar and Saluja, 2017). Ķīmiski rutīns ir glikozīds, kam ar disaharīdu rutinozi (α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glikopiranoze) ir piesaistīts flavonola aglikons kvercētīns OH-3 (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavons) (Ganeshpurkar and Saluja, 2017) (skatīt 4.11 attēlu). Jau iepriekš tika izpētīts, ka rutīns spēj inhibēt

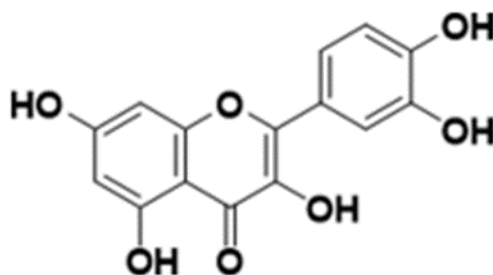
AKE 1 un AKE2 (Guerrero et al., 2012). Tas tika identificēts kā viens no trim savienojumiem, glicirizīna, rutīna un feoforbīda A, ar augstu saistīšanās afinitāti ar AKE2 enzīmu (Agrawal et al., 2021). Tika izpētīts, ka rutīnam piemīt spēja inhibēt Mpro, kas ir SARS-CoV-2 vīrusa galvenā proteāze, kam ir svarīga loma daudzu vīrusu proteīnu nobriešanā. Šis pētījums liecināja, ka rutīns ir potenciāls līdzeklis pretvīrusu klīniskajos pētījumos (Agrawal et al., 2021).



4.11. att. **Rutīna struktūrformula** (Fitzpatrick and Woldemariam, 2017)

Kvercetīns ir viens no visizplatītākajiem flavonoīdiem augu valstī un tiek klasificēts kā flavonols, kuram piemīt spēja inhibēt dažādus enzīmus (Mohos et al., 2019). Kvercetīns ir augu pigments, tas ir atrodams daudzos augos un pārtikas produktos, piemēram, sarkanvīnā, sīpolos, zaļajā tējā, ābolos un ogās (Webmd.com, 2019). Kvercetīns bez tā piemītošajām farmakoloģiskajām īpašībām vēl ir svarīgs ar to, ka tam ir salīdzinoši augstāka biopieejamība nekā citām fitoķīmiskajām vielām (Salehi et al., 2020). Kvercetīnam piemīt pretdiabēta, pretiekaisuma, antioksidantu, pretmikrobu, pretartēta un brūču dzīšanas iedarbība, un arī tiek veikti pētījumi, kuru rezultāti liecina par kvercetīna pretvēža aktivitāti pret dažādām vēža šūnu līnijām (Salehi et al., 2020). Iepriekšējos pētījumos arī tika izpētīts, ka kvercetīnam piemīt spēja inhibēt AKE enzīmus (Guerrero et al., 2012). Kvercetīnam piemītošā plašā spektra pretmikrobu īpašība varētu būt potenciāla pielietošanai dažādu infekciju baktēriju slimību profilaksē un ārstēšanā, un šī terapija varētu būt kā alternatīva antibiotiku lietošanai (Yang et al., 2020). Kvercetīns inhibē ne tikai AKE, bet arī citohroma P450 enzīmus (Mohos et al., 2020), olbaltumvielu kināzes C (PKC) aktivitāti, tādējādi uzlabojot nieru stāvokli pie hiperglikēmijas (Salehi et al., 2020). Kvercetīnam ir OH grupa, kas pievienota 3., 5., 7., 3' un 4' pozīcijās (skatīt 4.12. attēlu). Kvercetīns ir aglikons, kam nav pievienota cukura, aglikons spēj konjugēties ar glikozi, ksilozi vai rutinozi, kas saistās ar kādu no kvercetīna hidroksilgrupām, tādējādi radot dažādas

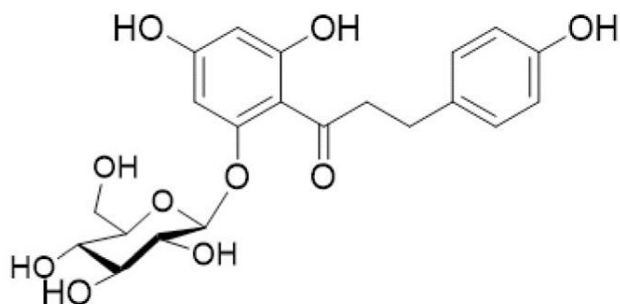
kvercetiņa glikozīdu formas (Salehi et al., 2020). Kvercetiņš glikozīdu veido, pievienojot glikozilgrupu (piemēram, glikozi) kā vienu no OH grupas aizstājēju (Li et al., 2016). Krāsas pigmentu ziedos, dārzeņos un augļos galvenokārt dod kvercetiņa-3-O-glikozīds, un arī uzturā kvercetiņš galvenokārt atrodams kā glikozīdi nevis kā aglikons (Salehi et al., 2020). Pētnieki pieļauj, ka kvercetiņš spētu kļūt par jaunu medikamentu, kas potenciāli spētu novērst un ārstēt dažādas slimības. Tā spēcīgajai antioksidanta, pretiekaisuma un pretaudzēju iedarbībai ir lielas izredzes klīniskā pielietojumā.



4.12. att. **Kvercetiņa struktūrformula** (Salehi et al., 2020)

Florizīns ir dihidrohalkons, dabiski sastopams flavonoīds, kas sastāv no glikozes daļas un diviem aromātiskiem gredzeniem. Tas ir floretiņa fenola glikozīds, jo florizīna aglikons ir floretiņš (Londzin et al., 2018). Florizīns ir dabisks produkts, ko iespējams uzņemt ar uzturu. Tas ir atrodams vairāku augļu koku mizā, saknēs un lapās, galvenokārt ābelēs. Florizīna galvenā farmakoloģiskā funkcija ir izraisīt nieru glikozūriju un bloķēt zarnu glikozes uzsūkšanos (Ehrenkranz et al., 2005). Florizīns ir SGLT1 un SGLT2 inhibitors, jo tas konkurē ar D-glikozi par saistīšanos ar nesēju. Tieši šī darbība samazina glikozes transportēšanu nierēs, pazeminot glikozes daudzumu asinīs (Tian et al., 2021; Ehrenkranz et al., 2005). SGLT1 un SGLT2 ir transportieri nieru kanāliņos, caur kuriem glikoze tiek uzņemta atpakaļ asinīs (Wright, 2021). Florizīnam piemīt antihiperglikēmiskas, antioksidantu, pretiekaisuma, hepatoprotektīvas, pretvēža, antibakteriālas un kardioprotektīvas īpašības (Tian et al., 2021). Florizīns ir arī ticis pētīts kā potenciāls terapeitiskais līdzeklis 2. tipa cukura diabēta ārstēšanai, tomēr tā efektivitāte neapstiprinājās, un tas tika aizstāts ar selektīvākiem un potenciāli labākiem sintētiskajiem analogiem, piemēram, empagliflozīnu, kanagliflozīnu un dapagliflozīnu (Rossetti et al., 1987). Florizīns nekļuva par zālēm diabēta ārstēšanā, jo lietojot iekšķīgi tas gandrīz pilnībā tiek pārveidots par floretiņu, iedarbojoties uz hidrolītiskajiem enzīmiem tievajās zarnās (Chao and Henry, 2010). Cilvēki lieto florizīnu drudža, malārijas, diabēta un citu

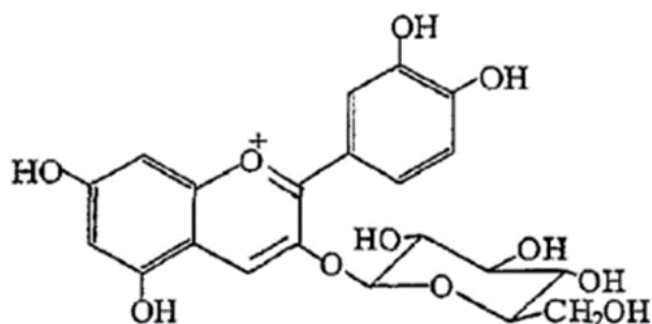
slimību ārstēšanai, taču nav daudz un kvalitatīvu labu zinātnisku pierādījumu par efektivitāti (Li et al., 2016). Tika veikts pētījums, kurā pārbaudīja polifenola taukskābju esterus kā serīna proteāzes inhibitorus, un šajā pētījumā florizīna esteri uzrādīja inhibējošu iedarbību uz urokināzi (IC₅₀ ~ 33 μM) un trombīnu (IC₅₀ = 65–75 μM) (Viskupicova et al., 2012). Interesanti, ka plazmas kallikreīns ir labs pro-urokināzes, urokināzes neaktīvās zīmogēna formas, aktivators.



4.13. att. Florizīna struktūrformula (Tian et al., 2021)

Cianidīna-3O-glikozīds ir antocianīns (Olivas-Aguirre et al., 2016). Antocianīni kalpo kā pigmenti, kas veicina ziedu un augļu krāsojumus, dodot augļiem sarkanu nokrāsu, bet interesanti, ka tā saturs avenēs un zemenēs ir salīdzinoši zems (Olivas-Aguirre et al., 2016). No tā izriet, ka ogas un augļi, it īpaši sarkanās krāsas augļi, piemēram, sarkanie apelsīni ir dabisks un lielisks cianidīna-3O-glikozīda avots. Tikai daži cianidīna-3O-glikozīda metabolīti ir parādījuši potenciālu farmakoloģisko aktivitāti, lai gan vairāk nekā 20 metabolītu veidu ir identificēti (Tan et al., 2019). Protokatehīnskābe, floriglucinaldehīds, vanilīnskābe, ferulīnskābe un to atvasinājumi ir galvenie bioaktīvie metabolīti ar antioksidantu un pretiekaisuma īpašībām *in vivo* un *in vitro*. *In vitro* pētījumos tika atklāts, ka tieši protokatehīnskābei piemīt antioksidanta un pretiekaisuma iedarbība, floriglucinaldehīdam piemīt pretiekaisuma aktivitāte un vanilīnskābei un ferulīnskābei piemīt antioksidanta un pretiekaisuma aktivitāte (Tan et al., 2019). Bez antioksidantu un pretiekaisuma efektiem cianidīna-3O-glikozīdam piemīt kuņģi aizsargājoša un antitrombotiska īpašība, un tas dod ieguvumu sirds un asinsvadu veselībai (Olivas-Aguirre et al., 2016). Kā raksturīgi antocianīniem cianidīna-3O-glikozīda ķīmiskais skelets sastāv no benzopirāna serdes, kas iekļauj benzoilgredzenu un pirāna gredzenu, fenola gredzenu, kas pievienots tam un cukura daļas. (skatīt 4.14. attēlu) Antocianīni spēcīgo antioksidantu un pretiekaisuma īpašību dēļ potenciāli varētu dot lielus ieguvumus kā alternatīva terapija pie hroniskiem traucējumiem, piemēram, sirds un asinsvadu slimībām, pie taukainās aknas un

iekaisīgas zarnu slimības, kā arī tiem piemīt pietiekama biopieejamība (Tan et al., 2019). Veikti pētījumi, kuros pārbaudīja cianidīna-3O-glikozīda enzīmu inhibīcijas efektus. Atklāja, ka tas ir spējīgs inhibēt AKE, CNS enzīmus, piemēram, tirozināzi, enzīmus, kas saistīti ar 2. tipa diabētu, piemēram, α -glikozidāzi un dipeptidilpeptidāzi-4 (Cásedas et al., 2019), bet tā inhibīcijas efekts uz kallikreīna aktivitāti nav iepriekš pētīts.



4.14. att. Cianidīna-3o-glikozīda sturktūrformula

Zaļās tējas labie ieguvumi cilvēka veselībai jau iepriekš literatūras apskatā ir minēti, tomēr svarīgi atsevišķi iztirzāt šīs tējas fenolu būtību. Tējas fenola savienojumi zināmi arī kā katehīni. Tējā atrodami četri galvenie katehīni- epikatehīns (EC), epigallokatehīns (EGC), epikatehīna-3-galāts (EKG) un epigallokatehīna-3-galāts (EGCG) (Lambert et al., 2007). EGCG jeb epigallokatehīna-3-galāts ir visizplatītākais un galvenais katehīns zaļajā tējā un tas ir visplašāk pētītais tējas katehīns, jo sastāda aptuveni 50–80% no kopējā zaļajā tējā esošā katehīna daudzuma (Musial et al., 2020). Dažādi pētījumi liecina, ka EGCG ir atbildīgs par lielāko daļu farmakoloģisko aktivitāšu zaļajā tējā (Cásedas et al., 2019). Tējas polifenoliem piemīt antioksidantu aktivitāte, vēža šūnu augšanas inhibīcija, pretiekaisuma darbība un specifisku enzīmu inhibīcijas spēja. Pētījumos atklāts, ka EGCG kavē C hepatīta vīrusa iekļūšanu šūnās un kancerogēnēzi (Lambert et al., 2007). Pētījumi liecina, ka tējas polifenoli ir spējīgi palīdzēt ārstēt dažādus patoloģiskus veselības stāvokļus, tajā skaitā aterosklerozi, augstu holesterīna līmeni, vēzi tajā skaitā, urīnpūšļa vēzi, krūts vēzi, olnīcu vēzi, barības vada vēzi, plaušu vēzi, aizkuņģa dziedzera vēzi, prostatas vēzi, ādas vēzi un kuņģa vēzi (Lambert et al., 2007). Domājams, ka tējas polifenoli varētu būt arī noderīgi iekaisuma slimību ārstēšanā.

Mūsu pētījumā izvēlētās vielas iepriekš tika atklātas kā spējīgas inhibēt AKE, bet neatradām literatūras avotos aprakstītu visu eksperimentā izmantoto dabas vielu spēju inhibēt kallikreīnu *in vitro*. Iepriekš bija izpētīta melnās tējas ekstrakta kallikreīna

inhibīcijas spēja, tādēļ šajā pētījumā pētījām zaļās tējas kallikreīna inhibīcijas efektu.

Papildinot datus ar Zanes Birznieces maģistra darbā publicētajiem datiem (Birzniece, 2021), ieguvām salīdzinošu polifenolu proteāžu AKE1, AKE2 un kallikreīna inhibīcijas ainu (4.3. tabula).

4.3. tabula

Pētīto vielu AKE1, AKE2 un cilvēka plazmas kallikreīna aktivitātes inhibīcijas efekti

Vielā (konc. 1 mg/ml vai cita)	AKE1 inhibīcija, %	AKE2 inhibīcija, %	Plazmas kallikreīna inhibīcija, %
Florizīns	28,9	79,1	67,1
Kvercetīns	21,2	32,5	62,2
Rutīns	43,1	58,9	50,1
Cianidīna-3O-glikozīds	12,6	29,8	59,3
Kaptoprils (2 mg/ml)	50	-	-
MLN-4760 (0,02 mg/ml)	-	50	-
Zaļā tēja 0,2 g/ml	Nav pētīts	Nav pētīts	41,3

Kopīgajā ar līdzautoriem ziņojumā LU 80.Starptautiskajā zinātniskajā konferencē (Namniece et al., 2022) parādījām, ka polifenoliem nav izteikts proteāžu inhibīcijas specifiskums, tomēr ir novērojama selektivitāte, ja salīdzina IC50 vai inhibīcijas %. Piemēram, florizīnam ir augstākā AKE2 un plazmas kallikreīna inhibīcijas spēja, salīdzinot inhibīcijas efektus, bet kvercetīns ir izteikti spēcīgāks kallikreīna inhibitors, salīdzinot ar tā AKE1 un AKE2 inhibējošo efektu. Rutīns visvairāk inhibē AKE2 aktivitāti, tad seko plazmas kallikreīna inhibējošais efekts un visbeidzot AKE1. Interesanti, ka cianidīna-3O-glikozīds, kas neuzrādīja AKE1 un AKE2 inhibīcijas ievērojamu efektu, 1 mg/ml koncentrācijā plazmas kallikreīna efektu inhibē 59,3%. Kaptoprils un MLN-4760 izrādīja selektivitāti pret AKE izoformām. Minētajā LU konferencē ziņojām par polifenolu proteāžu AKE1, AKE2, plazmas kallikreīna un arī elastāzes inhibīcijas spēju (Namniece et al., 2022).

Šajā darbā iegūtie rezultāti parāda, ka florizīns, kvercetīns, rutīns, cianidīna-3O-glikozīds un zaļā tēja inhibē cilvēka plazmas kallikreīna aktivitāti. Visaktīvākais ir florizīns ar IC50 0,37 mg/ml. Dabīgie kallikreīna inhibitori varētu kalpot kā bāzes molekulas jaunu zāļu vielu pret iedzimtu angioneirotisko tūsku meklējumiem un dizainam vai COVID-19 profilaksei.

SECINĀJUMI

1. Florizīns, kvercetīns, rutīns, cianidīna-3O-glikozīds un zaļās tējas ūdens ekstrakts inhibē cilvēka plazmas kallikreīna aktivitāti *in vitro*. Florizīnam 1 mg/ml koncentrācijā ir vislielākā kallikreīna inhibīcijas spēja (67,1%).
2. Polifenoli uzrāda savstarpēji līdzīgu kallikreīna inhibīcijas IC50 koncentrāciju – florizīns 0,37 mg/ml, kvercetīns 0,69 mg/ml, rutīns 0,80 mg/ml, cianidīna-3O-glikozīds 0,67 mg/ml. Pēc IC50 koncentrācijas aprēķiniem rutīns ir no šiem polifenoliem neaktīvākais kallikreīna inhibitors.
3. Zaļās tējas ūdens ekstrakts koncentrācijā 200 mg/ml uzrāda nelielu kallikreīna inhibīcijas spēju (41,3%) ar IC50 171,6 mg/ml salīdzinot ar pārējām eksperimentā izmatotajām vielām.
4. Selektīvie sintētiskie AKE1 un AKE2 inhibitori kaptoprils un MLN-4760 neinhibē kallikreīna aktivitāti.
5. Dabīgie kallikreīna inhibitori varētu kalpot kā bāzes molekulas jaunu sintētisko analoģu sintēzei ar mērķi radīt zāļu vielas pret iedzimtu angioneirotisko tūsku vai zāles ar duālu AKE2 un kallikreīna inhibīcijas efektu COVID-19 profilaksei.

PATEICĪBAS

Lielu paldies vēlos izteikt savai darba vadītājai Dr. hab. biol., prof. Rutai Muceniecei par palīdzību bakalaura darba izstrādē, par atbalstu, motivēšanu, padomu un konsultāciju sniegšanu, par iespēju izstrādāt šo darbu laboratorijā un materiālu nodrošināšanu.

Pateicība LU MF projektam “Biomarķieru un dabas vielu izpēte akūtu un hronisku slimību diagnostikai un personalizētai ārstēšanai” par finansējumu.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **Aaaai.org. (2022). Understanding Hereditary Angioedema | AAAAI.** Pieejams: <https://www.aaaai.org/tools-for-the-public/conditions-library/allergies/understanding-hereditary-angioedema>
2. **Agrawal, P.K., Agrawal, C. and Blunden, G. (2021).** Rutin: A Potential Antiviral for Repurposing as a SARS-CoV-2 Main Protease (Mpro) Inhibitor. *Natural Product Communications* 16(4), p. 1934578X21991723. Pieejams: <https://doi.org/10.1177/1934578X21991723>.
3. **Al Shukor, N. et al. (2013).** Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Effects by Plant Phenolic Compounds: A Study of Structure Activity Relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(48), pp. 11832–11839. Pieejams: <https://doi.org/10.1021/jf404641v>.
4. **Al Shukor, N. (2016).** Impact of phenolic compounds on ACE and CCK signaling to reduce blood pressure and food intake.
5. **Bekassy, Z., Lopatko Fagerström, I., Bader, M. and Karpman, D. (2021).** Crosstalk between the renin–angiotensin, complement and kallikrein–kinin systems in inflammation. *Nature Reviews Immunology*. doi:10.1038/s41577-021-00634-8.
6. **Birzniece, Z. (2021).** FLAVONOĪDU, METFORMĪNA UN VACCINIUM SPP. OGU IZSPIEDU EKSTRAKTU ANGIOTENZĪNA KONVERTĒJOŠO ENZĪMU INHIBĪCIJA IN VITRO. *MAGISTRA DARBS*. Pieejams: https://dspace.lu.lv/dspace/bitstream/handle/7/26406/308-41490-Linkevica_Marija_ml13084.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
7. **Bond, J.S. (2019).** Proteases: History, discovery, and roles in health and disease. *The Journal of biological chemistry* 294(5), pp. 1643–1651. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30710012>.
8. **Bryant, J.W. and Shariat-Madar, Z. (2009).** Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* 7(3), pp. 234–250. Pieejams: doi: 10.2174/187152509789105444.

- 9. Carey, R.M. and Padia, S.H. (2018).** Physiology and Regulation of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System. *Textbook of Nephro-Endocrinology* , pp. 1–25. Pieejams: doi: 10.1016/B978-0-12-803247-3.00001-5.
- 10. Carvalho, P.R. de, Sirois, P. and Fernandes, P.D. (2021).** The role of kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in COVID-19 infection. *Peptides* 135, p. 170428. Pieejams: doi: 10.1016/j.peptides.2020.170428.
- 11. Cásedas, G., Les, F., González-Burgos, E., Gómez-Serranillos, M.P., Smith, C. and López, V. (2019).** Cyanidin-3-O-glucoside inhibits different enzymes involved in central nervous system pathologies and type-2 diabetes. *South African Journal of Botany* 120, pp. 241–246. Pieejams: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629918309384>.
- 12. Chao, E.C. and Henry, R.R. (2010).** SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews Drug Discovery* 9(7), pp. 551–559. Pieejams: <https://doi.org/10.1038/nrd3180>.
- 13. Coto, E., Avanzas, P. and Gómez, J. (2021).** The Renin–Angiotensin–Aldosterone System and Coronavirus Disease 2019. *European Cardiology Review* 16. Pieejams: <https://www.ecrjournal.com/articleindex/ecr.2020.30> [Accessed: 2 May 2022].
- 14. Derkx, F.H., Schalekamp, M.P. and Schalekamp, M.A. (1987).** Two-step prorenin-renin conversion. Isolation of an intermediary form of activated prorenin. *Journal of Biological Chemistry* 262(6), pp. 2472–2477. Pieejams: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61528-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61528-5).
- 15. Dong, J., Xu, X., Liang, Y., Head, R. and Bennett, L. (2011).** Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by polyphenols from tea (*Camellia sinensis*) and links to processing method. *Food & Function* 2(6), pp. 310–319. Pieejams: <http://dx.doi.org/10.1039/C1FO10023H>.
- 16. Ehrenkranz, J.R.L., Lewis, N.G., Ronald Kahn, C. and Roth, J. (2005).** Phlorizin: a review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 21(1), pp. 31–38. Pieejams: <https://doi.org/10.1002/dmrr.532>.

- 17. European Medicines Agency (EMA) (2021).** Icatibant Accord - European Medicines Agency. [online] European Medicines Agency. Pieejams:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/icatibant-accord>
- 18. Fitzpatrick, L.R. and Woldemariam, T. (2017).** Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. Elsevier. Pieejams:
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12404-7>.
- 19. Frank, M.M. (2018).** Hereditary Angioedema Medication: Blood Products, Androgens and Androgen Derivatives, C1-Inhibitor Concentrates, Kallikrein Inhibitors, Bradykinin Receptor Antagonists, Antifibrinolytic Agents. Pieejams:
<https://emedicine.medscape.com/article/135604-medication>
- 20. Ganeshpurkar, A. and Saluja, A.K. (2017).** The Pharmacological Potential of Rutin. Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society 25(2), pp. 149–164. Pieejams:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28344465>.
- 21. Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G. and Muguerza, B. (2012).** Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. PloS one 7(11), pp. e49493–e49493. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23185345>.
- 22. Iwaki, T. and Castellino, F.J. (2006).** Plasma levels of bradykinin are suppressed in factor XII-deficient mice. Thrombosis and haemostasis 95(6), pp. 1003–1010. Pieejams: doi: 10.1160/TH06-03-0128.
- 23. Kalinska, M., Meyer-Hoffert, U., Kantyka, T. and Potempa, J. (2016).** Kallikreins - The melting pot of activity and function. Biochimie 122, pp. 270–282. Pieejams: doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.023.
- 24. Lambert, J.D., Sang, S. and Yang, C.S. (2007).** Biotransformation of Green Tea Polyphenols and the Biological Activities of Those Metabolites. Molecular Pharmaceutics 4(6), pp. 819–825. Pieejams: <https://doi.org/10.1021/mp700075m>.
- 25. Leeb-Lundberg, L.M.F., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D.J. and Zuraw, B.L. (2005).** International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological

- consequences. *Pharmacological Reviews*, 57(1), pp.27–77.
Pieejams:doi:10.1124/pr.57.1.2.
- 26. Lerner, U.H., Persson, E. and Lundberg, P. (2008).** Kinins and Neuro-osteogenic Factors. *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set 2*, pp. 1025–1057. Pieejams: doi: 10.1016/B978-0-12-373884-4.00063-X.
- 27. Li, W. et al. (2003).** Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426(6965), pp. 450–454. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14647384>.
- 28. Li, Y. et al. (2016).** Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* 8(3), p. 167. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26999194>.
- 29. Lipcsey, M., Persson, B., Eriksson, O., Blom, A.M., Fromell, K., Hultström, M., Huber-Lang, M., Ekdahl, K.N., Frithiof, R. and Nilsson, B. (2021).** The Outcome of Critically Ill COVID-19 Patients Is Linked to Thromboinflammation Dominated by the Kallikrein/Kinin System. *Frontiers in Immunology*, 12. Pieejams: doi:10.3389/fimmu.2021.627579.
- 30. Londzin, P., Siudak, S., Cegiela, U., Pytlik, M., Janas, A., Waligóra, A. and Folwarczna, J. (2018).** Phloridzin, an Apple Polyphenol, Exerted Unfavorable Effects on Bone and Muscle in an Experimental Model of Type 2 Diabetes in Rats. *Nutrients* 10(11), p. 1701. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30405066>.
- 31. Madkhali, H., Tarawneh, A., Ali, Z., Le, H. V, Cutler, S.J., Khan, I.A. and Shariat-Madar, Z. (2021).** Identification of Human Kinin-Forming Enzyme Inhibitors from Medicinal Herbs. *Molecules* 26(14). Pieejams: doi: 10.3390/molecules26144126.
- 32. Madkhali, H.A. (2015).** Screening of natural products for their effect on kallikrein-kinin system: Potential implications in the treatment of hereditary angioedema. *ProQuest Dissertations and Theses* , p. 120. Pieejams: <https://search.proquest.com/dissertations-theses/screening-natural-products-their-effect-on/docview/1733644690/se-2?accountid=178282>.

- 33. Masurier, N., Arama, D.P., El Amri, C. and Lisowski, V. (2017).** Inhibitors of kallikrein-related peptidases: An overview. *Medicinal Research Reviews*, 38(2), pp.655–683. doi:10.1002/med.21451.
- 34. Mohammadi, N. and shaghghi (2020).** Inhibitory Effect of Eight Secondary Metabolites from Conventional Medicinal Plants on COVID_19 Virus Protease by Molecular Docking Analysis. *ChemRxiv*. Pieejams: doi:10.26434/chemrxiv.11987475.v1.
- 35. Mohos, V. et al. (2019).** Inhibitory Effects of Quercetin and Its Human and Microbial Metabolites on Xanthine Oxidase Enzyme. *International journal of molecular sciences* 20(11), p. 2681. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31159151>.
- 36. Mohos, V. et al. (2020).** Inhibitory Effects of Quercetin and Its Main Methyl, Sulfate, and Glucuronic Acid Conjugates on Cytochrome P450 Enzymes, and on OATP, BCRP and MRP2 Transporters. *Nutrients* 12(8), p. 2306. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32751996>.
- 37. Muchtaridi, M., Fauzi, M., Khairul Ikram, N.K., Mohd Gazzali, A. and Wahab, H.A. (2020).** Natural Flavonoids as Potential Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitors for Anti-SARS-CoV-2. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25(17), p. 3980. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32882868>.
- 38. Musial, C., Kuban-Jankowska, A. and Gorska-Ponikowska, M. (2020).** Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *International journal of molecular sciences* 21(5), p. 1744. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143309>.
- 39. Namniece, J., Rembergs, R., Jēkabsons, K., Birzniece, Z., Kaļķe, K., Vavutkina, L.K. and Muceniece, R. (2022).** Polyphenols as Protease Inhibitors: Focus on Angiotensin Converting Enzymes 1 and 2, Plasma Kallikrein and Neutrophil Elastase Activity in Vitro. Pieejams: <https://medicina.lsmuni.lt/abstracts-of-the-international-scientific-conference-on-medicine-organized-within-the-frame-of-the-80th-international-scientific-conference-of-the-university-of-latvia/>.
- 40. Oliva, M.L.V. and Sampaio, U.M. (2008).** Bauhinia Kunitz-type proteinase inhibitors: structural characteristics and biological properties. *Biological chemistry* 389(8), pp. 1007–1013. Pieejams: doi: 10.1515/BC.2008.119.

- 41. Olivas-Aguirre, F.J. et al. (2016).** Cyanidin-3-O-glucoside: Physical-Chemistry, Foodomics and Health Effects. *Molecules* 21(9). Pieejams: doi: 10.3390/molecules21091264.
- 42. Pandey, K.B. and Rizvi, S.I. (2009).** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2(5), pp. 270–278. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716914>.
- 43. Patten, G.S., Abeywardena, M.Y. and Bennett, L.E. (2016).** Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme, Angiotensin II Receptor Blocking, and Blood Pressure Lowering Bioactivity across Plant Families. *Critical reviews in food science and nutrition* 56(2), pp. 181–214. Pieejams: doi: 10.1080/10408398.2011.651176.
- 44. Pu, F., Mishima, K., Irie, K., Motohashi, K., Tanaka, Y., Orito, K., Egawa, T., Kitamura, Y., Egashira, N., Iwasaki, K. and Fujiwara, M. (2007).** Neuroprotective Effects of Quercetin and Rutin on Spatial Memory Impairment in an 8-Arm Radial Maze Task and Neuronal Death Induced by Repeated Cerebral Ischemia in Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 104(4), pp.329–334. Pieejams: doi:10.1254/jphs.fp0070247.
- 45. Ra, J.E. et al. (2020).** Evaluation of antihypertensive polyphenols of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings via their effects on angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition. *Applied Biological Chemistry* 63(1). Pieejams: <https://doi.org/10.1186/s13765-020-00519-9>.
- 46. Riedl, M. (2010).** Hereditary angioedema therapy: kallikrein inhibition and bradykinin receptor antagonism. *The World Allergy Organization journal* 3(9 Suppl), pp. S34-8. Pieejams: doi: 10.1097/WOX.0b013e3181f20dbc.
- 47. Rossetti, L., Smith, D., Shulman, G.I., Papachristou, D. and DeFronzo, R.A. (1987).** Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *The Journal of clinical investigation* 79(5), pp. 1510–1515. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3571496>.
- 48. Salehi, B. et al. (2020).** Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega* 5(20), pp. 11849–11872. Pieejams: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01818>.

- 49. Sales, V. and Pesquero, J.B. (2018).** Bradykinin Receptors. In: Choi, S. ed. Encyclopedia of Signaling Molecules. Cham: Springer International Publishing, pp. 566–572. Pieejams: https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_232.
- 50. Schmaier, A.H. (2016).** A Novel Antithrombotic Mechanism Mediated by the Receptors of the Kallikrein/Kinin and Renin-Angiotensin Systems. *Frontiers in medicine* 3, p. 61. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27965959>.
- 51. Schoenfeld, A.-K., Lahrson, E. and Alban, S. (2016).** Regulation of Complement and Contact System Activation via C1 Inhibitor Potentiation and Factor XIIa Activity Modulation by Sulfated Glycans - Structure-Activity Relationships. *PloS one* 11(10), pp. e0165493–e0165493. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27783665>.
- 52. Simões e Silva, A.C., Silveira, K.D., Ferreira, A.J. and Teixeira, M.M. (2013).** ACE2, angiotensin-(1-7) and Mas receptor axis in inflammation and fibrosis. *British journal of pharmacology* 169(3), pp. 477–492. Pieejams: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23488800>.
- 53. Statista. (2016).** Tea consumption per capita worldwide by country, 2016 | Statista. Pieejams: <https://www.statista.com/statistics/507950/global-per-capita-tea-consumption-by-country/>.
- 54. Srikanth, S. and Chen, Z. (2016).** Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology* 7. Pieejams: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2016.00470>.
- 55. Tan, J., Li, Y., Hou, D.X. and Wu, S. (2019).** The effects and mechanisms of cyanidin-3-glucoside and its phenolic metabolites in maintaining intestinal integrity. *Antioxidants* 8(10), pp. 1–16. Pieejams: doi: 10.3390/antiox8100479.
- 56. The Nutrition Source. (2019).** Tea. Pieejams: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/food-features/tea/>.
- 57. Tian, L., Cao, J., Zhao, T., Liu, Y., Khan, A. and Cheng, G. (2021).** The bioavailability, extraction, biosynthesis and distribution of natural dihydrochalcone: Phloridzin. *International Journal of Molecular Sciences* 22(2), pp. 1–15. Pieejams: doi: 10.3390/ijms22020962.

- 58. van de Veerdonk, F.L., Netea, M.G., van Deuren, M., van der Meer, J.W., de Mast, Q., Brüggemann, R.J. and van der Hoeven, H. (2020).** Kallikrein-kinin blockade in patients with COVID-19 to prevent acute respiratory distress syndrome. *eLife* 9. Pieejams: doi: 10.7554/eLife.57555.
- 59. Vilela Oliva, M.L. and Sampaio, M.U. (2008).** Bauhinia Kunitz-type proteinase inhibitors: Structural characteristics and biological properties. *Biological Chemistry* 389(8), pp. 1007–1013. Pieejams: doi: 10.1515/BC.2008.119.
- 60. Viskupicova, J., Danihelova, M., Majekova, M., Liptaj, T. and Sturdik, E. (2012).** Polyphenol fatty acid esters as serine protease inhibitors: a quantum-chemical QSAR analysis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 27(6), pp. 800–809. Pieejams: <https://doi.org/10.3109/14756366.2010.616860>.
- 61. Yang, D., Wang, T., Long, M. and Li, P. (2020).** Quercetin: Its Main Pharmacological Activity and Potential Application in Clinical Medicine. Quiles, J. L. ed. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020, p. 8825387. Pieejams: <https://doi.org/10.1155/2020/8825387>.
- 62. WebMD Editorial Contributors.** Healthy Foods High in Polyphenols. Pieejams: <https://www.webmd.com/diet/foods-high-in-polyphenols>.
- 63. Wong, M.K.S. (2016).** Bradykinin. *Handbook of Hormones* , pp. 274-e30C-4. Pieejams: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128010280001823>
- 64. Webmd.com. (2019).** Quercetin: Uses, Side Effects, Interactions, Dosage, and Warning. Pieejams: <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-294/quercetin>.
- 65. Wright, E.M. (2021).** SGLT2 Inhibitors: Physiology and Pharmacology. *Kidney360*, Vol. 2(Issue 12), p.10.34067/KID.0002772021. Pieejams: doi:10.34067/kid.0002772021.
- 66. Zamorano Cuervo, N. and Grandvaux, N. (2020).** ACE2: Evidence of role as entry receptor for SARS-CoV-2 and implications in comorbidities. *eLife*, 9. doi:10.7554/elife.61390.

DOKUMENTĀRĀ LAPA

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs

“DABĪGO ANGIOTENZĪNA KONVERTĒJOŠO ENZĪMU INHIBITORU IETEKME UZ KALLIKREĪNA AKTIVITĀTI IN VITRO”

izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

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

Autors/e: Kitija Kaļķe _____
(vārds, uzvārds) (paraksts) (datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs/a: prof. Dr. habil. biol. Ruta _____
(amats, vārds, uzvārds, grāds) (paraksts) (datums)

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

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____
(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____
(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas „Farmācija” Bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____2022., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____
(paraksts)