

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOĻĢIJAS FAKULTĀTE



Kristīne Ošiņa

**1,4-DIHIDROPIRIDĪNA ATVASINĀJUMU IETEKME UZ DNS
REPARĀCIJAS UN PROTEOLĪZES ENZĪMU EKSPRESIJU
CUKURA DIABĒTA MODELĪ UN DNS DIVPAVEDIENU
PĀRRĀVUMU LĪMENI *IN VITRO***

Promocijas darbs bioloģijas doktora grāda iegūšanai molekulārās bioloģijas
apakšnozarē

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

Rīga, 2019

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas laboratorijā, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Medicīnas bioķīmijas katedrā un *Gustave Roussy* institūtā, Villejuif, Francijā laika posmā no 2014. gada līdz 2019. gadam.



Izglītības un zinātnes
ministrija

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) un valsts pētījumu programmas „Biomedicīna sabiedrības veselībai (BIOMEDICINE)” atbalstu.

Darbs sastāv no ievada, četrām nodaļām, secinājumiem, pētījuma rezultātu atspoguļojošo publikāciju un ziņojumu saraksta, pateicībām, literatūras saraksta, 29 pielikumiem.

Darba forma: disertācija bioloģijas nozarē, molekulārās bioloģijas apakšnozarē.

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

Darba recenzenti:

- 1) **Baiba Jansone**, Dr. med., prof., Latvijas Universitāte;
- 2) **Šimons Svirskis**, Dr. med., vadošais pētnieks, Rīgas Stradiņa Universitāte;
- 3) **Alexander Ishchenko**, Ph.D., Research Director, French National Centre for Scientific Research (CNRS), Francija.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2019. gada 4. jūlijā plkst. 14.00 Latvijas Universitātes Bioloģijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē, Rīgā, Jelgavas ielā 1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes

priekšsēdētājs: _____ / Dr. biol. Kaspars Tārs /

sekretāre: _____ / Daina Eze /

© Latvijas Universitāte, 2019

© *Kristīne Ošiņa*, 2019

KOPSAVILKUMS

1,4-dihidropiridīni (1,4-DHP) ir organiskie savienojumi, kuru pamatā ir piridīna gredzens. 1,4-DHP atvasinājumiem ir novērotas gan antioksidatīvas, gan DNS reparāciju veicinošas aktivitātes, kam varētu būt perspektīvas medicīnā. Pirmā tipa cukura diabēta un tā komplikāciju attīstība ir saistīta ar oksidatīvā stresa izraisītiem šūnu bojājumiem. Tie veicina DNS vienpavediena un divpavedienu pārrāvumu veidošanos, kā arī ietekmē proteasomālo degradāciju. Arī HIV-1 Tat proteīns šūnās rada DNS bojājumus.

Šī **darba mērķis** bija noskaidrot 1,4-DHP atvasinājumu ietekmi uz DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu ekspresiju žurkās cukura diabēta modeļsistēmā un DNS divpavedienu pārrāvumu līmeni ar Tat proteīnu transficētos B-limfocītos.

Darbā tika noteikta 1,4-DHP atvasinājumu – metkarbatona, etkarbatona, J-9-125, glutapirona, AV-153-Na un AV-153-Ca – ietekme dažādos žurku orgānos streptozotocīna (STZ) inducēta 1. tipa cukura diabēta modelī uz PARP1 un H2AX proteīnu un gēnu ekspresiju, kā arī *Xdh* gēna un vairāku proteasomas subvienību gēnu (*Psm3*, *Psm6*, *Psm5* un *Psm6*) ekspresiju. Aloksāna inducēta 1. tipa diabēta modelī minēto gēnu ekspresija tika noteikta abu AV-153 sāļu klātbūtnē. Papildus tam tika analizēta AV-153-Na, AV-153-Ca, AV-153-Mg, AV-153-K, metkarbatona, J-9-125, glutapirona un PP-544-Na ietekme uz DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos B-limfocītos, kas ir transficēti ar Tat proteīnu.

Iegūtie dati liecina, ka vairumam analizēto 1,4-DHP atvasinājumu ir stimulējoša ietekme uz *Parp1*, *Xdh* un proteasomālo gēnu ekspresiju diabētisku žurku nierēs. Žurku asinīs etkarbatons un glutapirons samazina diabēta paaugstināto *Parp1*, *H2ax* un *Xdh* gēnu ekspresiju. Proteasomu gēnu ekspresiju diabētisku žurku asinīs, kas ir palielināta tikai *Psm3* gēna gadījumā, samazina etkarbatons, bet palielina AV-153-Na. Aknās diabēta izraisīšana samazina *H2ax* un *Psm3* gēnu ekspresijas līmeņus, bet AV-153-Na un AV-153-Ca uzrāda stimulējošu ietekmi uz *Parp1*, *H2ax* un daļu no proteasomu subvienību gēnu ekspresiju. PARP1 proteīna ekspresija STZ diabēta modelī ir paaugstināta nierēs, sirdī un nervos; AV-153-Na to normalizē. Šķeltā PARP1 ekspresija ir palielināta visos pētītajos orgānos; etkarbatons to lielākoties pazemina, bet metkarbatons ir efektīvs sirds audos. Proteīna γ H2AX ekspresija diabēta modelī ir palielināta sirdī. AV-153-Na to samazina, bet etkarbatons palielina gan sirdī, gan nierēs.

Visi analizētie 1,4-DHP atvasinājumi samazina γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu procentuālo daudzumu pēc Tat proteīna transfekcijas.

Var secināt, ka 1,4-DHP atvasinājumi spēj modulēt DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu gēnu un proteīnu ekspresiju žurkās cukura diabēta modelī, uzrādot atšķirīgu ietekmi dažādos orgānos un iespējamu terapeitisku efektu. Turklāt šie savienojumi pasargā DNS molekulu no Tat proteīna izraisītiem bojājumiem *in vitro*.

Atslēgvārdi: 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi, cukura diabēts, DNS reparācija, proteolīze, Tat proteīns

ABSTRACT

1,4-dihydropyridines (1,4-DHPs) are pyridine ring-based organic compounds. 1,4-DHPs possess both antioxidative and DNA repair promoting properties, that could be perspective in medicine. Development of type 1 *diabetes mellitus* and its complications is related to oxidative stress-induced cell damage. It causes formation of single-strand and double-strand DNA breaks and stimulates proteasomal degradation. HIV-1 Tat protein is also involved in formation of DNA breaks.

The aim of the work was to determine the effect of 1,4-DHP derivatives on expression of DNA repair and proteolysis enzymes in diabetic model rats and on DNA double-strand break level in Tat transfected B-lymphocytes.

We determined the effect of 1,4-DHP derivatives – metcarbatone, etcarbatone, J-9-125, glutapyrone, AV-153-Na and AV-153-Ca – in different organs of rats in streptozotocin (STZ) model of type 1 diabetes on PARP1 and H2AX protein and gene expression, as well as *Xdh* gene and several proteasomal gene (*Psm3*, *Psm6*, *Psm5* un *Psmc6*) expression levels. In alloxan model of type 1 diabetes, we determined the expression of selected genes in presence of both AV-153 salts. Additionally, we analysed the effect of AV-153-Na, AV-153-Ca, AV-153-Mg, AV-153-K, metcarbatone, J-9-125, glutapyrone and PP-544-Na on formation of DNA double-strand breaks in B-lymphocytes transfected with Tat protein.

According to our results, most of the analysed 1,4-DHP derivatives stimulate the expression of *Parp1*, *Xdh* and proteasomal genes in diabetic rat kidneys. In blood of the rats, etcarbatone and glutapyrone lowered the expression of *Parp1*, *H2ax* and *Xdh* genes that was increased by diabetes. In blood of diabetic rats, proteasomal gene expression, which was increased only for *Psm3* gene, was lowered by etcarbatone, but increased by AV-153-Na. In liver, induction of diabetes lowered the expression of *H2ax* and *Psm3*, but AV-153-Na and AV-153-Ca stimulated the expression of *Parp1*, *H2ax* and some of the proteasomal genes. In STZ model of diabetes, the expression of PARP1 protein was increased in kidneys, heart and nerves; AV-153-Na normalised it. The expression of cleaved PARP1 protein was increased in all analysed organs of diabetic rats; etcarbatone mostly lowered it, but metcarbatone was effective in heart tissues. The expression of γ H2AX protein was increased in heart of diabetic rats. AV-153-Na lowered it, but etcarbatone – increased the expression of this protein both in heart and kidneys. All analysed 1,4-DHP derivatives lowered the percentage of B-lymphocytes exhibiting γ H2AX foci after transfection with Tat protein.

We conclude that 1,4-DHP derivatives can modulate the expression of genes and proteins of DNA repair and proteolysis enzymes in diabetic model rats with different effect in various organs, indicating possible therapeutic effect. Furthermore, these compounds protect DNA from Tat protein induced damage *in vitro*.

Keywords: 1,4-dihydropyridine derivatives, *diabetes mellitus*, DNA repair, proteolysis, Tat protein

SATURS

Saīsinājumi	8
Ievads.....	10
1. Literatūras apskats	12
1.1. 1,4-dihidropiridīni.....	12
1.1.1. 1,4-dihidropiridīnu raksturojums	12
1.1.2. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi bez Ca ²⁺ kanālu antagonistu aktivitātes	14
1.2. DNS reparācija.....	15
1.3. Poli(ADP-ribozes) polimerāze 1	16
1.3.1. Poli(ADP-ribozes) polimerāzes 1 raksturojums	16
1.3.2. Poli(ADP-ribozes) polimerāzes 1 loma patoloģijās.....	19
1.4. H2A histonu dzimtas pārstāvis X	20
1.4.1. H2AX loma organismā	20
1.4.2. H2AX iesaiste slimību patoģenēzē	22
1.5. Ksantīna oksidoreduktāze	23
1.5.1. Ksantīna oksidoreduktāzes funkcijas organismā	23
1.5.2. Ksantīna oksidoreduktāze slimību gaitā	25
1.6. Proteasomu vadīta proteolīze.....	26
1.6.1. Ubikvitīna-proteasomu sistēma	26
1.6.2. 26S proteasomas gēni	28
1.6.3. Imunoproteasomas	28
1.6.4. Ubikvitīna-proteasomu sistēmas saistība ar slimībām.....	29
1.7. Cukura diabēts	30
1.7.1. Cukura diabēta raksturojums un klasifikācija.....	30
1.7.2. Pirmā tipa cukura diabēts.....	32
1.7.3. Otrā tipa cukura diabēts	33
1.7.4. Cukura diabēta komplikācijas.....	34
1.8. DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu loma cukura diabēta patoģenēzē	35
1.8.1. Poli(ADP-ribozes) polimerāzes aktivitāte cukura diabēta laikā	35
1.8.2. Histona H2AX iesaiste cukura diabēta norisē	36
1.8.3. Ksantīna oksidoreduktāzes loma cukura diabēta gadījumā	36
1.8.4. Proteolīzes enzīmu nozīme cukura diabēta gadījumā.....	37
1.9. Pirmā tipa cukura diabēta dzīvnieku modeļsistēmas	39
1.9.1. Streptozotocīna modelis.....	39

1.9.2. Aloksāna modelis.....	41
1.10. Tat proteīns.....	43
2. Materiāli un metodes	45
2.1. Izmantotās vielas	45
2.2. Eksperimentā izmantotie dzīvnieki.....	47
2.3. Eksperimenta dizains	48
2.3.1. Streptozotocīna modelis.....	48
2.3.2. Aloksāna modelis.....	49
2.4. RNS izdalīšana un cDNS sintēze.....	50
2.5. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija	50
2.6. Imūnhistoķīmija	51
2.7. B-limfocītu apstrāde ar Tat proteīnu un 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem.....	52
2.8. Datu statistiskā apstrāde	53
3. Rezultāti.....	54
3.1. DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu ekspresijas izmaiņas žurkās 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē cukura diabēta modeļos	54
3.1.1. <i>Parp1</i> gēna ekspresija	54
3.1.2. PARP1 proteīna ekspresija	56
3.1.3. Šķeltā PARP1 proteīna ekspresija	57
3.1.4. <i>H2ax</i> gēna ekspresija	59
3.1.5. γ H2AX proteīna ekspresija.....	61
3.1.6. <i>Xdh</i> gēna ekspresija.....	62
3.1.7. <i>Psm3</i> gēna ekspresija	64
3.1.8. <i>Psm6</i> gēna ekspresija	66
3.1.9. <i>Psm5</i> gēna ekspresija	69
3.1.10. <i>Psm6</i> gēna ekspresija	71
3.2. B-limfocītu transfekcija ar Tat proteīnu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu klātbūtnē..	73
4. Diskusija	76
4.1. Streptozotocīna un aloksāna izraisīts 1. tipa cukura diabēts.....	76
4.2. <i>Parp1</i> un <i>H2ax</i> gēnu un to proteīnu ekspresijas izmaiņas inducēta cukura diabēta modelī 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē	77
4.2.1. Karbatonīdu ietekme uz <i>Parp1</i> un <i>H2ax</i> gēnu un to proteīnu ekspresiju	79
4.2.2. Glutapirona ietekme uz <i>Parp1</i> un <i>H2ax</i> gēnu ekspresiju	80
4.2.3. AV-153 sāļu ietekme uz <i>Parp1</i> un <i>H2ax</i> gēnu un to proteīnu ekspresiju	80

4.3. <i>Xdh</i> gēna ekspresijas izmaiņas inducēta cukura diabēta modelī 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē	81
4.4. Proteasomu gēnu ekspresijas izmaiņas 1. tipa cukura diabēta un 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē	83
4.5. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekme uz Tat proteīna izraisītiem DNS bojājumiem	86
4.6. Noslēguma piezīmes	88
5. Secinājumi	89
6. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes.....	91
7. Pētījuma rezultātu publikācijas un ziņojumi.....	92
8. Pateicības	94
9. Izmantotā literatūra	95
Pielikumi.....	114

SAĪSINĀJUMI

1,4-DHP	1,4-dihidropiridīni
1TCD	1. tipa cukura diabēts
2TCD	2. tipa cukura diabēts
AGE	paātrinātās glikozilēšanas gala produkti (<i>advanced glycation end-products</i>)
ADP	adenozīna difosfāts
AIF	apoptozi-inducējošais faktors
ATP	adenozīna trifosfāts
Ca ²⁺	kalcija jons
CD	cukura diabēts
cDNS	komplementārā (<i>complementary</i>) dezoksiribonukleīnskābe
c-PARP1	šķeltā poli(ADP-ribozes) polimerāze (<i>cleaved poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>)
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
E1	ubikvitīnu aktivējošais enzīms
E2	ubikvitīnu konjugējošais enzīms
eNOS	endoteliālā slāpekļa oksīda sintāze
Fe ²⁺	dzelzs jons
GAPDH	glicerāldehīda 3-fosfāta dehidrogenāze
GLUT2	glikozes transportētājproteīns 2 (<i>glucose transporter 2</i>)
GSH	glutations
HD	spirālveida domēns (<i>helical domain</i>)
HIV-1	cilvēka imūndeficīta vīruss 1 (<i>human immunodeficiency virus 1</i>)
HLA	cilvēka leikocītu antigēns (<i>human leukocyte antigen</i>)
H2AX	histona H2A variants X
H ₂ O ₂	ūdeņraža peroksīds
iNOS	inducējamā slāpekļa oksīda sintāze
LOSI	Latvijas Organiskās sintēzes institūts
MGO	metilglioksāls
mRNS	matricas ribonukleīnskābe
Na ⁺	nātrijs jons
NAD	nikotīnamīda adenīna dinukleotīds
NAD ⁺	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda oksidētā forma
NADH	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda reducētā forma
NADPH	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāts
NCBI	Nacionālais Biotehnoloģijas informācijas centrs (<i>National Center for Biotechnology Information</i> , ASV; www.ncbi.nlm.nih.gov)
NF-κB	kodola faktors kappā B (<i>nuclear factor kappa B</i>)
NO [•]	slāpekļa oksīds

O-GlcNAc	O-saistītais N-acetilglikozamīns
O-GlcNAcāze	O-saistītā N-acetilglikozamīna-selektīvā N-acetil-β-D-glikozaminidāze
OH [•]	hidroksilradikālis
ONOO ⁻	peroksinitrīts
O ₂ ⁻	superoksīda anjons
p	statistiskā ticamība
PARilēšana	poli(ADP-ribozil)ēšana
PARP	poli(ADP-ribozes) polimerāze
PSMA3	proteasomas alfa tipa 3. subvienība
PSMA6	proteasomas alfa tipa 6. subvienība
PSMB5	proteasomas beta tipa 5. subvienība
PSMC6	19S regulatorā kompleksa AAA-ATPāzes subvienība Rpt4
RNS	ribonukleīnskābe
ROS	reaktīvie skābekļa radikāļi (<i>reactive oxygen species</i>)
RV	relatīvās vienības
SD	standartnovirze (<i>standard deviation</i>)
STZ	streptozotocīns
Tat	vīrusu replikācijas trans-aktivators
TBS	Tris bufera sāls
UPS	ubikvitīna-proteasomu sistēma
XDH	ksantīna dehidrogenāze (<i>xanthine dehydrogenase</i>)
XO	ksantīna oksidāze (<i>xanthine oxidase</i>)
XOR	ksantīna oksidoreduktāze (<i>xanthine oxidoreductase</i>)
Zn1–3	cinka pirksti 1–3
γH2AX	fosforilētais histona H2A variants X

IEVADS

1,4-dihidropiridīni (1,4-DHP) ir organiskie savienojumi, kuru pamatā ir piridīna gredzens. Latvijas Organiskās sintēzes institūtā ir sintezēti 1,4-DHP atvasinājumi, kuriem nepiemīt klasiskā Ca^{2+} kanālu agonistu/antagonistu aktivitāte. Tiem var novērot gan antioksidatīvas, gan DNS reparāciju veicinošas aktivitātes (Ryabokon *et al.*, 2005). Šai 1,4-DHP atvasinājumu grupai varētu piemist DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu ekspresiju modificējošas īpašības, kas būtu nozīmīgas tādas patoloģijas kā cukura diabēts gadījumā. Pirmā tipa cukura diabēts sākas ar β -šūnu nāvi un tam seko komplikācijas, kas skar dažādus orgānus – acis, sirdi, nieres un citus. Viena no izplatītākajām mikrovaskulārajām komplikācijām 1. tipa cukura diabēta pacientiem ir diabētiskā nefropātija, kas veidojas ~ 30 % gadījumu (Gross *et al.*, 2005).

Cukura diabēta attīstības gaitā palielinātā glikozes koncentrācija veicina ūdeņraža peroksīda, superoksīda anjonu un peroksinitrīta veidošanos, kas ir cēlonis DNS bojājumiem. Tie savukārt aktivē poli(ADP-ribozes) polimerāzi 1 (PARP1) un pastiprina poli(ADP-ribozil)ēšanu, tādējādi izmainot gan endoteliālā ATP daudzumu, gan piridīna nukleotīdu līmeni, tai skaitā nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāta līmeni (Garcia-Soriano *et al.*, 2001). Kaut arī PARP1 ir iesaistīta DNS bojājumu reparācijā, tās pārmērīga aktivizēšana var izraisīt patoloģiskas izmaiņas organismā, tostarp veicināt diabētisko komplikāciju attīstību (Obrosova *et al.*, 2004a).

Pirmā tipa cukura diabēta gadījumā pacientiem limfocītos oksidatīvā stresa dēļ palielinās fosforilētā histona H2A varianta X (H2AX) daudzums, kas norāda uz aktīvu DNS divpavedienu pārrāvumu reparāciju (Giovannini *et al.*, 2014). Viens no reaktīvo skābekļa radikāļu avotiem diabēta laikā ir ksantīna oksidoreduktāze, kas purīnu degradācijas noslēdzošajos soļos katalizē hipoksantīna oksidāciju par ksantīnu un ksantīna oksidāciju par urīnskābi (Chung *et al.*, 1997). Diabēta laikā šajā reakcijā pastiprināti veidojas superoksīda radikālis (Matsumoto *et al.*, 2003).

Augstam glikozes līmenim ir tiešs bioloģisks efekts uz proteasomu funkcijām. Sākotnēji tās tiek pastiprinātas, nodrošinot īslaicīgu aizsardzību pret oksidatīvo stresu, bet ilgstoša diabēta stāvokļa dēļ proteasomu funkcijas tiek traucētas un var novērot bojātu proteīnu uzkrāšanos šūnās (Li *et al.*, 2017).

Arī citu slimību izraisītāji ir saistīti ar oksidatīvā stresa radītiem bojājumiem, piemēram, HIV-1, kur viens no oksidatīvā stresa avotiem ir vīrusu replikācijas trans-aktivators (Tat) proteīns (Price *et al.*, 2005). Tat proteīns izraisa DNS bojājumus un genoma nestabilitāti, turklāt tas var iekļūt tādos šūnu tipos, ko neskar HIV infekcija, piemēram, B-limfocītos, kas ir imesls B limfomu attīstībai HIV pacientiem (El-Amine *et al.*, 2018).

Šī pētījuma rezultāti sniedz informāciju par 1,4-DHP atvasinājumu ietekmi uz gēnu un proteīnu ekspresiju, kas ir saistīti ar DNS reparāciju un proteasomālo degradāciju cukura diabēta modelī, kā arī DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos B-limfocītos, kuri ir transficēti ar Tat proteīnu.

Promocijas darba eksperimentālā daļa ir izstrādāta Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas laboratorijā un Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Medicīnas bioķīmijas katedrā. Pētījuma *in vitro* eksperimenti ir veikti *Gustave Roussy* institūtā, Villejuif, Francijā.

Darba mērķis

Noskaidrot 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmi uz DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu ekspresiju žurkās cukura diabēta modelī un DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos B-limfocītos ar transficētu Tat proteīnu.

Darba uzdevumi

1. Izpētīt 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu – metkarbatona, etkarbatona, J-9-125, glutapirona, AV-153-Na un AV-153-Ca – ietekmi žurku orgānos cukura diabēta modelī uz *Parp1* gēna, kā arī PARP1 un šķeltā PARP1 proteīna ekspresiju.
2. Noteikt 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu – metkarbatona, etkarbatona, J-9-125, glutapirona, AV-153-Na un AV-153-Ca – ietekmi žurku orgānos cukura diabēta modelī uz *H2ax* gēna un fosforilētā H2AX proteīna ekspresiju.
3. Izpētīt 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu – metkarbatona, etkarbatona, J-9-125, glutapirona, AV-153-Na un AV-153-Ca – ietekmi žurku orgānos cukura diabēta modelī uz *Xdh* gēna ekspresiju.
4. Noteikt 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu – metkarbatona, etkarbatona, J-9-125, glutapirona, AV-153-Na un AV-153-Ca – ietekmi žurku orgānos cukura diabēta modelī uz *Psm3*, *Psm6*, *Psm5* un *Psmc6* gēnu ekspresiju.
5. Izpētīt 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu – AV-153-Na, AV-153-Ca, AV-153-Mg, AV-153-K, metkarbatona, J-9-125, glutapirona un PP-544-Na – ietekmi uz DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos B-limfocītos, kas ir transficēti ar Tat proteīnu.

Darba hipotēze

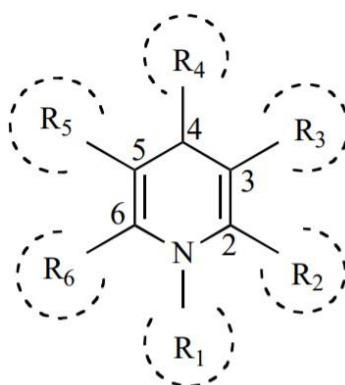
1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem ir modulējošs efekts uz DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu gēnu un proteīnu ekspresiju cukura diabēta modelī un DNS molekulu pasargājoša ietekme pret Tat proteīna izraisītiem bojājumiem.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. 1,4-dihidropiridīni

1.1.1. 1,4-dihidropiridīnu raksturojums

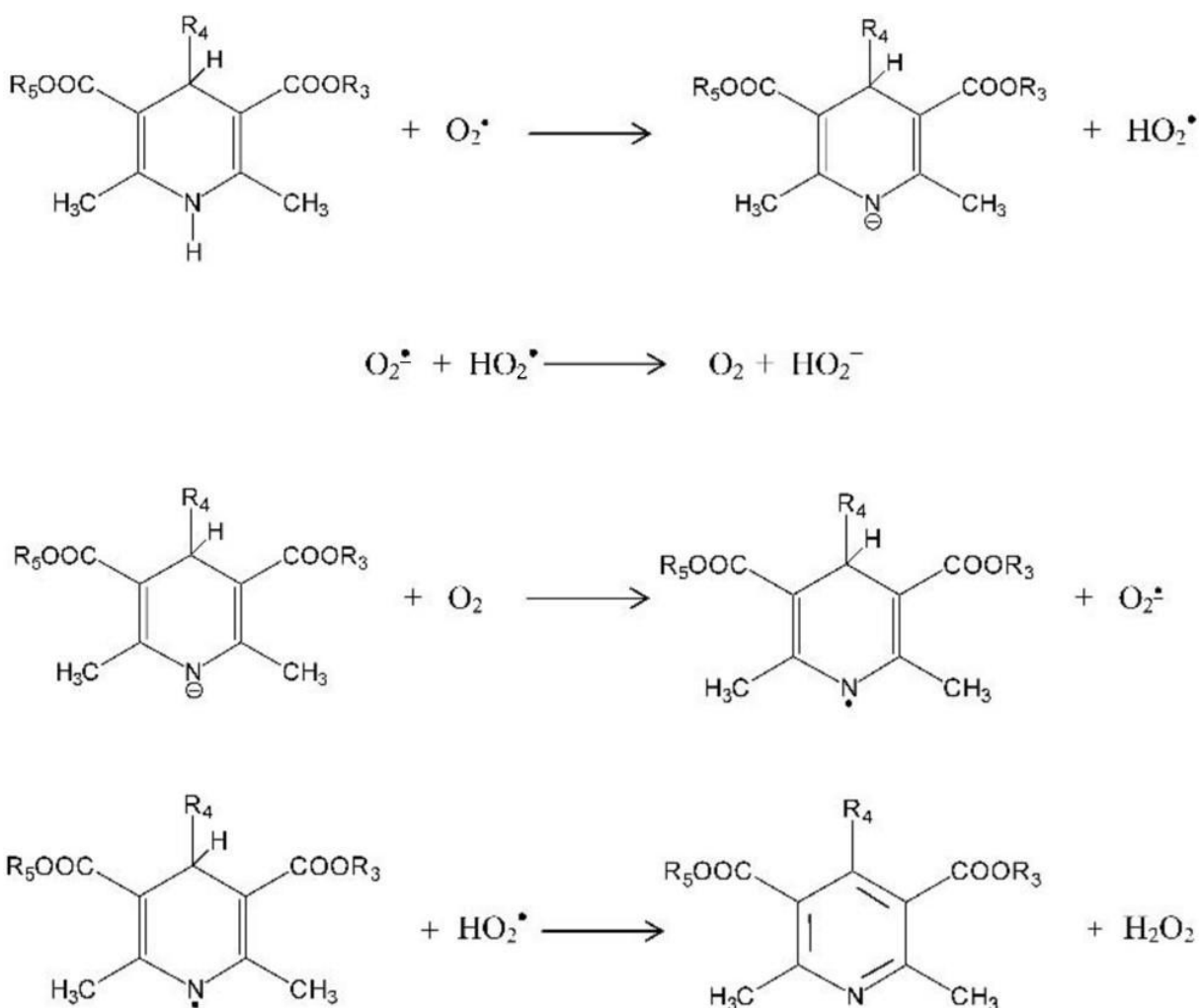
1,4-dihidropiridīni (1,4-DHP) ir liela grupa ar strukturāli daudzveidīgiem, nelieliem organiskiem savienojumiem, kuru pamatā ir piridīna gredzens (1.1. att.). No ķīmiskā viedokļa 1,4-DHP ir sintētiski, hidrogenēti, N-heteroaromātiski savienojumi. Galvenā to iezīme ir iespēja veikt aizvietošanu kādā no sešu atomu vietām, iegūstot dažādus atvasinājumus (Khedkar and Auti, 2014; Veleno *et al.*, 2016).



1.1. attēls. **1,4-dihidropiridīna struktūra.** R – ogļūdeņražu atlikumi (Ioan *et al.*, 2011).

1,4-DHP piemīt brīvo radikāļu savācēju un antioksidantu īpašības; tie ir iesaistīti gan atgriezeniskajās, gan neatgriezeniskajās reducēšanās-oksidēšanās reakcijās. Ūdeņraža donori, piemēram, tioli, amīni, fenoli, darbojas kā antioksidanti, galvenokārt inhibējot dažādu ķīmisku mērķu oksidēšanu. Tā kā 1,4-DHP piemīt ievērojama ūdeņraža atdošanas spēja, tad tie var darboties kā inhibitori brīvo radikāļu reakcijās. Tos klasificē kā dihidropiridīnu tipa antioksidantus (Veleno *et al.*, 2016).

Līdzīgi kā superoksīda dismutāzes, 1,4-DHP pārveido superoksīda radikāli (O_2^{\bullet}) par ūdeņraža peroksīdu (H_2O_2), kas šūnām ir mazāk toksisks (1.2. att.). 1,4-DHP gredzena N-pozīcijā esošais ūdeņraža atoms superoksīda radikāļa klātbūtnē tiek atbrīvots kā protons, un tas var darboties kā O_2^{\bullet} savācējs. Primāri veidojas 1,4-DHP anjons un hidroperoksilradikālis (HO_2^{\bullet}). 1,4-DHP anjons oksidējas un tālākā reakcijā tā 4. pozīcijā esošais ūdeņradis reaģē ar HO_2^{\bullet} . Reakcijas galaprodukti ir aromātiskais piridīns un H_2O_2 (Ortiz *et al.*, 2004).



1.2. attēls. **1,4-dihidropiridīnu oksidēšanās mehānisms.** R – ogļūdeņražu atlikumi; HO_2^{\bullet} – hidroperoksilradikālis; HO_2^- – hidroperoksilanjons; H_2O_2 – ūdeņraža peroksīds; $\text{O}_2^{\bullet -}$ – superoksīda radikālis; $\text{O}_2^{\bullet -}$ – superoksīda anjona radikālis (Ortiz *et al.*, 2004).

Ūdeņraža peroksīdu šūnās neitralizē peroksidāzes un katalāzes. Tomēr atkarībā no struktūras, devas un apstākļiem, 1,4-DHP var darboties arī kā prooksidanti (Velena *et al.*, 2016). 1,4-DHP ūdeņraža atoma atdošanas mehānisma raksturīgās iezīmes ir vērojamas tādu svarīgu šūnas procesu pamatā kā metabolisms un enerģijas piegāde, kas ietver nikotīnamīda dinukleotīdus (NAD) un to fosfātus ($\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}$, $\text{NADPH} \rightleftharpoons \text{NADP}$). 1,4-DHP molekulu var uzskatīt kā 1,4-dihidronikotīnamīda analogu (Matern *et al.*, 2007).

1,4-DHP medicīnā tika ieviesti vairāk nekā pirms 45 gadiem, un šobrīd lietošanā ir daudzi medikamenti, kuru pamatā ir 1,4-DHP gredzens. 1,4-DHP ir multifunkcionālas molekulas, un tiem piemīt dažādas farmakoloģiskas aktivitātes: antioksidantu aktivitāte, antihipertensīva aktivitāte, vazodilatora aktivitāte, antiangināla aktivitāte, antituberkulāra aktivitāte, pretiekaisuma aktivitāte, antibakteriāla aktivitāte, antikonvulsantu aktivitāte, pretcūlu aktivitāte un citas (Cataldi and Bruno 2012, Swarnalatha *et al.* 2011). Daļa no

1,4-DHP spēj iekļūt mitohondrijos un neitralizēt reaktīvos skābekļa radikāļus (*reactive oxygen species*, ROS), kas pastiprināti veidojas mitohondriju bojājumu gadījumā. Tādējādi 1,4-DHP novērš oksidatīvos bojājumus (Zhang *et al.*, 2017). Rezultātā uzlabojas mitohondriju funkcijas, kas, piemēram, taucainas diētas laikā pasargā peles no aptaukošanās, kā arī šīm pelēm uzlabo veselību un pagarina mūža ilgumu (Valente *et al.*, 2016).

Visplašāk 1,4-DHP ir zināmi kā L-tipa Ca^{2+} kanālu ligandu klase. Atkarībā no savas struktūras, tie var darboties gan kā agonisti, kas sekmē Ca^{2+} kanāla vaļēju stāvokli, gan kā antagonisti, kas sekmē neaktīvu stāvokli. Papildus struktūrai, 1,4-DHP specifisko darbību nosaka arī membrānas potenciāls, stimulācijas biežums un kanāla konformācija, tādēļ daži no 1,4-DHP var mainīt savu darbības veidu no agonista uz antagonistu un otrādi (Hockerman *et al.*, 1997). 1,4-DHP spēja inhibēt Ca^{2+} plūsmu paver iespējas izmantot šos savienojumus, piemēram, kardiovarsulāro slimību ārstēšanai: hipertensijai, stenokardijai u.c. (Cataldi and Bruno, 2012).

Daži no Ca^{2+} kanālu antagonistiem ar terapeitiskām īpašībām ir, piemēram, felodipīns, nifedipīns, cerebrokrasts, amlodipīns. Felodipīna antioksidatīvās īpašības izpaužas, inhibējot brīvo radikāļu producēšanu gludās muskulatūras šūnās gan diabēta apstākļos, gan iekaisuma laikā (Hishikawa and Luscher, 1998). Nifedipīns darbojas kā arteriālais vazodilators. Tas saistās pie L-tipa Ca^{2+} kanāliem arteriālajos audos, novērš Ca^{2+} jonu ieplūšanu, tādējādi veicinot vazodilatāciju un skābekļa piegādi miokardam (Snider *et al.*, 2008). Cerebrokrastam ir pretiekaisuma efekts žurku ķepas tūskas modelī. Tas inhibē interleikīnu un neirotoksisku produktu sekrēciju no kultivētām cilvēka monocītu šūnām (Klegeris *et al.*, 2002). Cerebrokrasts pasargā mitohondrijus no oksidatīviem bojājumiem, darbojoties kā iekšējo membrānu anjonu kanālu inhibitors, tādējādi tam ir terapeitisks potenciāls patoloģijās, kas saistītas ar oksidatīvo stresu (Fernandes *et al.*, 2003). Amlodipīns novērš palielinātu asinsspiedienu žurkām ar insulīna rezistenci (Okamura *et al.*, 2014).

1.1.2. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi bez Ca^{2+} kanālu antagonistu aktivitātes

Latvijas Organiskās sintēzes institūtā (LOSI) ir sintezēti 1,4-DHP atvasinājumi, kuriem nepiemīt klasiskā Ca^{2+} kanālu agonistu/antagonistu aktivitāte. Tipisks šo savienojumu pārstāvis ir glutapirons, kuram DHP gredzena 4. pozīcijā ir pievienota “brīva” aminoskābes daļa: dinātrijs glutamāts, savukārt pašā DHP gredzenā ir inkorporēta γ -aminosviestkābe. Abas aminoskābes savieno peptīdu saite, tādējādi glutapirons strukturāli atgādina dipeptīdu. Tas varētu skaidrot tā farmakoloģiskās īpašības un atšķirību no klasiskajiem Ca^{2+} kanālu agonistiem/antagonistiem, piemēram, tam nepiemīt būtiska hipotensīva vai hipertensīva

aktivitāte. Turklāt glutapironam ir ļoti zema toksicitāte (Misane *et al.*, 1998). *In vivo* eksperimentos glutapirons ir uzrādījis neuroaizsargājošas īpašības ar ilgtermiņa efektivitāti (Kluša and Ģērmāne, 1996). Savukārt *in vitro* eksperimentos ar daļēji bojātiem, uzbriedušiem mitohondrijiem tas samazināja adenoziņa trifosfāta (ATP) izraisīto kontrakciju amplitūdu un azidotimidīna inducēto agregāciju, kas norāda uz glutapirona potenciālu novērst dažādas miopātijas (Velēna *et al.*, 1997).

Arī citiem 1,4-DHP atvasinājumiem bez Ca^{2+} kanālu antagonistu aktivitātes piemīt farmakoloģiskas, tai skaitā antidiabētiskas, īpašības. Metkarbatons un J-9-125 streptozotocīna (STZ) inducēta cukura diabēta modelī žurkās ir uzrādījis spēju mazināt DNS vienpavediena pārrāvumus perifēro asiņu baltajās šūnās (Rostoka, 2015). Savukārt AV-153 ir ne tikai antioksidatīvs, bet arī antimutagēns savienojums un DNS reparācijas veicinātājs (Ryabokon *et al.*, 2005). AV-153 nātrija sāls samazina peroksinitrīta producētus DNS bojājumus šūnu kultūrā. Tas interkalē DNS molekulas bojājuma vietā, aktivizējot DNS ekscīzijas reparācijas enzīmus (Leonova *et al.*, 2018).

Ņemot vērā augstāk aprakstītās īpašības, šai 1,4-DHP atvasinājumu grupai varētu piemist modulējoša ietekme uz DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu ekspresiju, kas būtu nozīmīga tādas patoloģijas kā cukura diabēts gadījumā. Šajā darbā aprakstītajam pētījumam sadarbībā ar LOSI zinātniekiem tika izvēlēti deviņi 1,4-DHP atvasinājumi: metkarbatons, etkarbatons, glutapirons, J-9-125, AV-153-Na, AV-153-Ca, AV-153-Mg, AV-153-K un PP-544-Na. Tie iepriekš bija raksturoti, izmantojot fizikāli-ķīmiskās metodes (protonu magnētisko rezonansi, oglekļa-13 magnētisko rezonansi, infrasarkanā spektroskopiju, šķidrums hromatogrāfiju-masspektrometriju, elementāranalīzi) un *in vitro* eksperimentus, un tie bija ieteikti tālākai izpētei kā potenciāli aktīvie savienojumi.

1.2. DNS reparācija

Kaut arī ģenētiskās variācijas ir nozīmīgas evolūcijas norisē, tomēr indivīda izdzīvošanu nodrošina ģenētiskā stabilitāte, kuras uzturēšanā svarīga loma ir atbilstošam DNS metabolismam: gan precīzai DNS replikācijai, gan DNS reparācijai bojājumu gadījumā. Uz DNS reparācijas nozīmi norāda lielais iesaistīto enzīmu daudzums, piemēram, baktēriju un raugu genomos vairāki procenti kodējošās kapacitātes ir vērsti tieši uz DNS reparācijas funkcijām (Alberts *et al.*, 2005).

DNS reparācijas galvenie veidi ir 1) bāzu ekscīzijas reparācija, kuras laikā enzīmi DNS glikozilāzes atpazīst bojātas, piemēram, deaminētas, bāzes DNS molekulā un katalizē to hidrolītisku aizvākšanu, kam seko DNS polimerāzes un DNS ligāzes vadīta bāzes

aizvietošana, un 2) nukleotīdu ekscīzijas reparācija, kas aktivizējas dažādu DNS struktūras izmaiņu laikā, piemēram, ja veidojas pirimidīnu dimēri (timīns-timīns, timīns-citozīns, citozīns-citozīns) – bojājuma vietā no abām pusēm DNS pavediens tiek šķelts un aizvākts; DNS polimerāze un DNS ligāze aizpilda radušos tukšumu (Alberts *et al.*, 2005).

Viens no DNS bojājumu cēloņiem ir oksidatīvais stress. Tas veidojas gan šūnu metabolisma laikā, gan ārējās vides stimulu ietekmē (ultravioletā radiācija, jonizējošā radiācija, medikamenti), un to veicina iekaisuma reakcijas. Hidroksilradikāļi reagē ar purīniem un piridīniem, piesaistoties pie dubultajām saitēm, kā arī atdalot ūdeņraža radikāļi no timīna metilgrupas un 2'-dezoksiribozes oglekļa-ūdeņraža saitēm (Dizdaroglu, 2012).

Oksidatīvie bojājumi var izraisīt ģenētisko nestabilitāti, kas ietekmē dažādos šūnu procesos iesaistītus proteīnus: šūnas cikla regulēšanā, hromosomālajā stabilitātē, DNS replikācijā. Nespēja novērst DNS bojājumus var izraisīt citotoksicitāti, mutāģenēzi un šūnu nāvi (Dizdaroglu, 2012). Cilvēkiem samazināta DNS reparācijas kapacitāte ir saistāma ar daudzām slimībām, piemēram, vairākiem vēža veidiem, leukēmiju, limfomām, neiroloģiskām anomālijām, iedzimtām anomālijām (Alberts *et al.*, 2005).

DNS metabolismā ir iesaistīti dažādi enzīmi, tai skaitā šajā darbā tālāk aprakstītie: poli(ADP-ribozes) polimerāze 1, H2A histonu dzimtas pārstāvis X un ksantīna oksidoreduktāze.

1.3. Poli(ADP-ribozes) polimerāze 1

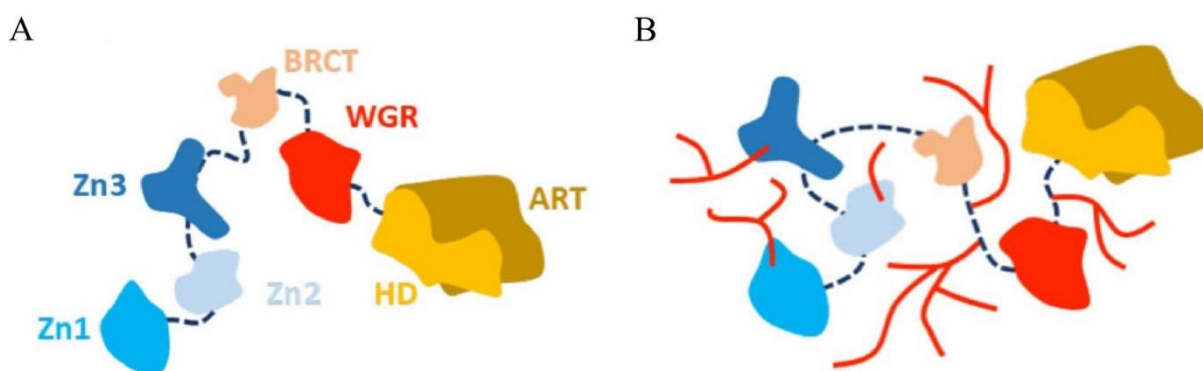
1.3.1. Poli(ADP-ribozes) polimerāzes 1 raksturojums

DNS reparācijā ir iesaistīti poli(ADP-ribozes) polimerāzes (PARP) proteīni. Organismā PARP veic mērķproteīnu poli(ADP-ribozil)ēšanu (PARilēšanu): pēc mērķproteīnu translācijas PARP proteīni pārnes negatīvi lādētās ADP-ribozes grupas no donora oksidētās nikotīnamīda adenīna dinukleotīda (NAD⁺) molekulas uz mērķproteīnu glutamāta, asparagīnskābes un lizīna atlikumiem. Šādi tiek kontrolēti dažādi šūnas procesi – šūnu dalīšanās, RNS interference, transkripcijas regulācija, mitohondriju funkcijas, DNS reparācija. Kopumā ir vismaz 17 PARP dzimtas proteīni, kas ir sadalīti četrās apakšdzimtās: DNS-atkarīgie PARP, tankirāzes, CCCH (Cys-Cys-Cys-His) PARP, un makro-PARP. Šiem proteīniem atšķiras enzimatiskā aktivitāte; daži ir neaktīvi. PARP1 pieder DNS-atkarīgo PARP proteīnu apakšdzimtai (Gibson and Kraus, 2012).

Pēc NCBI datubāzes datiem cilvēka *PARP1* gēns ir lokalizēts 1. hromosomas garā pleca 42.12 pozīcijā (1q42.12). Šim gēnam ir 23 eksoni, tā mRNS ir 3978 bp gara; tas kodē 1014 aminoskābes lielu proteīnu. Cilvēka *PARP1* gēna ortologs ir atrodams citos dzīvniekos,

tostarp eksperimentos plaši izmantotajās žurkās. Arī šajā darbā aprakstītajā pētījumā kā modeļdzīvnieki bija izvēlētas žurkas. Žurkām *Parp1* gēns atrodas 13. hromosomas garā pleca 26. pozīcijā (13q26). Tā pat kā cilvēkam, arī žurku *Parp1* gēns sastāv no 23 eksoniem un tā kodētais proteīns ir 1014 aminoskābes garš, bet mRNS ir 3571 bp gara (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

PARP1 ir kodola proteīns, kas pārsvarā atrodas neaktīvā stāvoklī, konstitutīvi saistījies ar hromatīnu, un sastāv no vairākiem funkcionāliem domēniem (Muthurajan *et al.*, 2014). PARP1 struktūra ir ilustrēta 1.3. attēlā.



1.3. attēls. Poli(ADP-ribozes) polimerāzes 1 (PARP1) struktūra. (A) Neaktīvā stāvoklī. (B) PARilēta. Dažādās krāsās norādīti PARP1 domēni: Zn1–3 – cinka pirksti 1–3; BRCT – krūts vēža tipa C-gala (*Breast cancer type 1 C-Terminus*) domēns; WGR – triptofāns (W), glicīns (G) un arginīns (R); HD – spirālveida domēns (*helical domain*); ART – ADP-riboziltransferāzes domēns; sarkanās līnijas – poli(ADP-ribozes) ķēdes (Sultanov *et al.*, 2017).

PARP1 N-galā atrodas divi homoloģi cinka pirkstu domēni (Zn1 un Zn2), kas atpazīst konkrētas DNS struktūras – vienpavediena un divpavedienu pārrāvumus un nukleosomu linkera DNS. Zn2 ir savienots ar cinka pirkstu 3 (Zn3), kas piedalās PARP1 aktivēšanā un var saistīties ar vienpavediena RNS. Nākamais ir BRCT (krūts vēža tipa C-gala, *Breast cancer type 1 C-Terminus*) domēns, kas atrodas PARP1 centrālajā daļā un ir iesaistīts automodifikācijā un PARP1 mijiedarbībā ar citiem enzīmiem. Tam seko WGR (W – triptofāns, G – glicīns un R – arginīns) domēns, kas piedalās DNS saistīšanās un DNS bojājumu atkarīgai aktivēšanai nozīmīgajā starpdomēnu kontaktu veidošanā (Huambachano *et al.*, 2011; Dawicki-McKenna *et al.*, 2015).

PARP1 C-galā atrodas katalītiskais domēns, kas piedalās ADP-ribozes sintēzē. Tas sastāv no diviem apakšdomēniem – spirālveida domēna (*helical domain*, HD) un ADP-riboziltransferāzes (ART) domēna, kas satur aktīvo saiti (Ruf *et al.*, 1996). HD darbojas kā autoinhibitors domēns: normālos apstākļos tas bloķē NAD⁺ saistīšanos ar PARP1, tādējādi

inhibējot ART katalītisko aktivitāti. Savukārt, kad PARP1 saistās pie DNS bojājuma, HD lokāli atlokās un pārtrauc autoinhibīciju (Dawicki-McKenna *et al.*, 2015). Tad NAD⁺ klātbūtnē notiek PARP1 automodificēšanās – auto-PARilēšana. DNS reparācijas proteīni, kuriem ir PAR-saistīšanas domēni, saistās pie ADP-ribozes ķēdēm, tādējādi nonākdami bojājuma vietā (Pleschke *et al.*, 2000). Par tālāku ADP-ribozes polimēru šķelšanu galvenokārt atbildīgs ir katabolais enzīms poli(ADP-ribozes) glikohidrolāze (Min and Wang, 2009).

Papildus DNS reparācijai PARP1 var darboties kā transkripcijas regulators. DNS bojājumu laikā PARP1 aktivizējas un šķeļ NAD⁺, veidojot nikotīnamīdu, kas novērš transkripcijas faktora NF-κB (kodola faktors kappa B, *nuclear factor kappa B*) subvienības p65 deacetilēšanu. Tā kā NF-κB aktivitāte daļēji tiek regulēta, acetilējot subvienību p65, kas piedalās transkripcijas kompleksa veidošanā, tad p65 deacetilācijas novēršana veicina NF-κB transkripcionālo aktivēšanu (Kauppinen *et al.*, 2013). Kopumā ir vairāki veidi, kā PARP1 piedalās transkripcijas regulēšanā. PARP1 var darboties kā hromatīna struktūras modulators, saistoties pie nukleosomām un modificējot histonu proteīnus. Līdzīgi kā sekvenses specifiskie DNS saistošie aktivatori vai represori, PARP1 var saistīties pie DNS un darboties kā transkripcijas veicinātāju saistošais faktors. PARP1 funkcionē arī kā transkripcijas ko-regulators līdzīgi kā klasiskie ko-aktivatori vai ko-represori. Signālu vadītās transkripcijas atbildes reakcijās PARP1 veicina stimulējošo faktoru piesaisti un inhibējošo faktoru atbrīvošanu. Savukārt, darbojoties kā transkripcijas izolatoru komponents, PARP1 ierobežo transkripcijas veicinātāju efektus promoteru rajonā vai arī aptur heterohromatīna izplatīšanos (Kraus, 2008). Tādējādi PARP1 kā transkripcijas regulators var būt DNS sekvenses atkarīgs, atpazīstot motīvus gēnu promoteru, vai arī DNS sekvenses neatkarīgs, veicot hromatīna remodelēšanu (Ko and Ren, 2012).

Kaut arī PARP1 enzīmu darbībai ir šķietami labvēlīga ietekme DNS bojājumu reparācijas procesos, tā var novest pie šūnu bojāejas. Plaši DNS bojājumi izraisa pārmērīgu PARP1 aktivēšanu ar raksturīgu neatgriezenisku NAD⁺/ATP izsīkumu, kas aizsāk nekrotisku šūnu nāvi. PARP1 inhibitori spēj pasargāt šūnas no nekrozes, līdz ar to tiem piemīt terapeitiskas īpašības (Ha and Snyder, 1999). PARP1 vadītai šūnu bojāejai ir daudz kopīgu īpašību arī ar apoptotisku šūnu nāvi. Nozīmīga loma ir mitohondrijiem, jo NAD⁺ izsīkums izraisa mitohondriju caurlaidību, kā rezultātā apoptozi-inducējošais faktors (AIF) translocējas no mitohondrijiem uz šūnas kodolu. Tur AIF aizsāk kodola kondensāciju, kas noved pie hromatīna fragmentācijas un rezultējas ar šūnas bojāeju (Yu *et al.*, 2002).

Apoptotiskās šūnās enzīmi ar cisteīna proteāzes aktivitāti jeb kaspāzes šķeļ PARP1, kā rezultātā PARP1 zaudē DNS pārrāvumu atpazīšanas funkciju un kļūst nejutīga pret DNS bojājumiem. NAD⁺ vairs netiek patērēta; šūnās saglabājas ATP līmenis un tām pietiek

enerģijas, lai veiktu aktīvo šūnu nāves procesu apoptozi, nevis ar enerģijas izsīkumu saistīto nekrozi. Lai gan pētījumos šķelto PARP1 (*cleaved poly (ADP-ribose) polymerase 1*, c-PARP1) izmanto kā apoptotisku šūnu marķieri, to reizēm var detektēt arī šūnās bez apoptozes (Soldani and Scovassi, 2002). Jāņem vērā arī tas, ka ne visos apoptotiskos audos kaspāzes spēj šķelt PARP1, piemēram, aknu apoptotiskajās šūnās c-PARP1 netiek konstatēta (Jones *et al.*, 1999).

1.3.2. Poli(ADP-ribozes) polimerāzes 1 loma patoloģijās

Pārmērīga PARP1 aktivēšana ir saistāma ar dažādām patoloģijām, piemēram, tā ir būtiska iezīme kardiovaskulāru slimību gadījumā, tādu kā miokarda infarkts un miokarda išēmija. Farmakoloģiska PARP1 inhibēšana uzlabo stāvokli, pasargājot kardiomiocītus un endotēlija šūnas. Plazmā samazinās miocītu nekrozes marķieru līmenis un iekaisuma atbildes reakcijas (Pacher and Szabó, 2007).

Neirodeģeneratīvas slimības, piemēram, Pārkinsona un Alcheimera slimības, ir saistītas ar palielinātu oksidatīvo stresu, kas rezultējas ar pastiprinātu PARP1 aktivitāti. Tā regulē mitohondriālo disfunkciju un izraisa nervu šūnu bojāeju (Martire *et al.*, 2015). Pārkinsona slimības gadījumā *PARP1* gēna ģenētiskajiem variantiem ir aizsargājošs efekts (Infante *et al.*, 2007). Savukārt Alcheimera slimības gadījumā polimorfismiem *PARP1* gēnā ir asociācija ar uzņēmību pret šo slimību (Liu *et al.*, 2010). PARP1 inhibitori mazina PARP1 aktivitāti un pasargā nervu šūnas, novēršot PARP1 izraisīto mitohondriju disfunkciju un gēnu ekspresijas modulācijas (Martire *et al.*, 2015).

PARP1 gēna polimorfismiem ir novērota asociācija arī ar vairākiem vēža veidiem, piemēram, ar plaušu, dzemdes kakla, kuņģa vēzi (Qin *et al.*, 2014). Hepatocelulārās karcinomas pacientiem ir palielināta *PARP1* gēna ekspresija (Li *et al.*, 2017). Vēža gadījumā notiek tieša vai netieša PARP1 mijiedarbība ar dažādiem onkogēniem proteīniem. PARP1 regulē vairākus transkripcijas faktoros, tādējādi modulējot kancerogēni. PARP inhibitoru pielietošana inhibē DNS reparāciju, rezultātā izraisot vēža šūnu bojāeju (Rajawat *et al.*, 2017).

Tādējādi PARP1 inhibīcijai var novērot duālu efektu – no vienas puses inhibitori var pasargāt šūnas, kā tas ir neirodeģeneratīvu slimību gadījumā, no otras puses tie veicina šūnu nāvi, kā tas ir vēža gadījumā. Tādēļ ir rūpīgi jāapzina PARP1 inhibitoru blakusefekti, lai izvairītos no veselo šūnu bojāejas terapijas laikā (Martire *et al.*, 2015).

1.4. H2A histonu dzimtas pārstāvis X

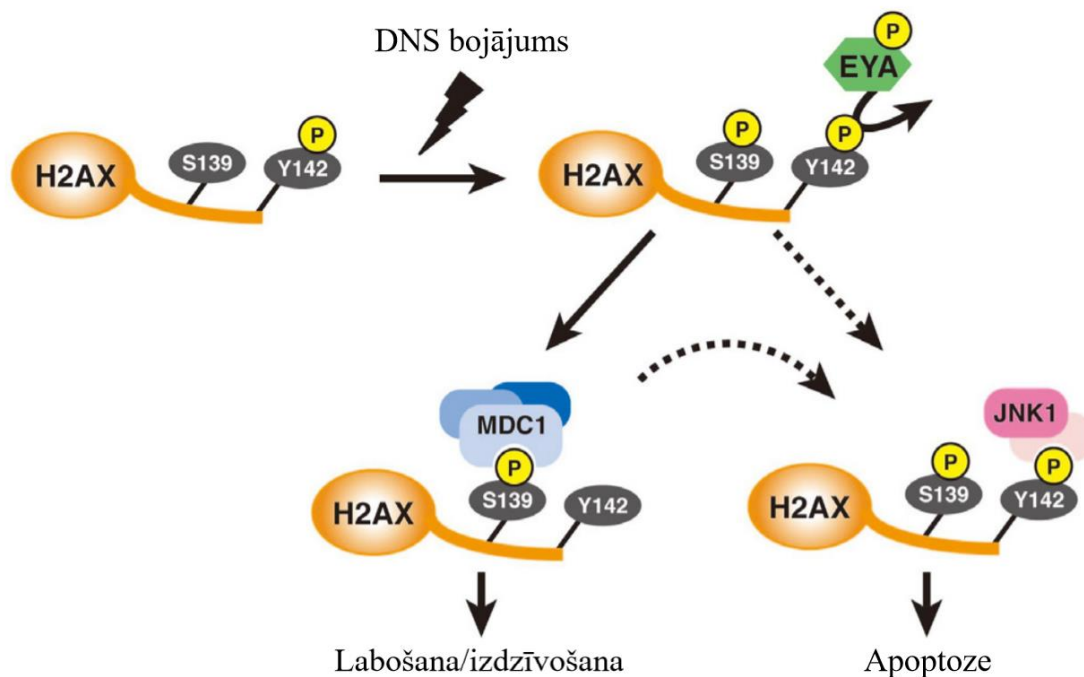
1.4.1. H2AX loma organismā

Vēl viens DNS reparācijā iesaistīts proteīns ir histona H2A variants X (H2AX). Eikariotu šūnās aptuveni 147 bāzu pāru gari DNS fragmenti 1,7 reizes apvijas ap histonu oktamēriem un veido nukleosomas. Katra nukleosoma sastāv no četriem pāriem ļoti konservatīvu histonu proteīnu: H2A, H2B, H3 un H4. Nukleoproteīnu kompleksa stabilitāti nodrošina ūdeņraža saites un hidrofoba mijiedarbība, kā arī elektrostatiskie savienojumi (Luger *et al.*, 1997). Papildus DNS arhitektūras nodrošināšanai, histoni piedalās gēnu ekspresijā, DNS reparācijā, hromosomu segregācijā un citos hromosomālos procesos. Evolūcijas ceļā ir izveidojušies dažādi histonu varianti. H2B un H4 proteīniem ir viens variants, savukārt H3 un H2A ir vairāki varianti, to skaitā arī H2A.X, kuru bieži apzīmē kā H2AX (Henikoff and Smith, 2015).

Pēc NCBI datubāzes datiem cilvēka *H2AX* gēns ir lokalizēts 11. hromosomas garā pleca 23.3 pozīcijā (11q23.3). Šim gēnam ir viens eksons, tā mRNS ir 1614 bp gara un tas kodē 143 aminoskābes lielu proteīnu. Cilvēka *H2AX* gēna ortologs ir atrodams citos dzīvniekos, tostarp žurkās, kurām *H2ax* gēns atrodas 8. hromosomas garā pleca 22. pozīcijā (8q22). Tā pat kā cilvēkam, arī žurku *H2ax* gēns sastāv no viena eksona un tā kodētais proteīns ir 143 aminoskābes garš, bet mRNS ir 1330 bp gara (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Eikariotiem histonu proteīni ir vienīgi, kuru mRNS nav poliadenilēta. Šie gēni ir no šūnu replikācijas atkarīgi, un to 3' galā poli(A) astes vietā ir cilpas sekvenca, kas ir būtiska to regulācijā. Histonu mRNS tiek strauji ekspresēta šūnu dalīšanās S fāzes sākumā un tiek uzturēta augstā līmenī visu S fāzi, kamēr notiek DNS replikācija. Pēc tam šīs mRNS molekulas tiek iznīcinātas. Savukārt histonu varianti netiek regulēti atkarībā no šūnas cikla un to mRNS ir poliadenilēta. H2AX variantam ir divas formas: S fāzes laikā ekspresētā mRNS nav poliadenilēta, bet G0 un G1 fāzē tās 3' galam pievieno poli(A) asti. Tas nodrošina, ka H2AX, kas ir iesaistīts DNS bojājumu atpazīšanā, tiek konstitūīvi ekspresēts visa šūnas cikla laikā (Marzluff *et al.*, 2008).

H2AX ir izvietojies histonos visā DNS garumā. Tā fosforilēšanai ir nozīmīga loma DNS reparācijā (1.4. att.) (Sadatomi *et al.*, 2013).



1.4. attēls. H2AX fosforilēšana un šūnas atbildes reakcija DNS bojājuma gadījumā.

EYA – tirozīna fosfatāze; JNK1 – c-Jun N-gala kināze 1; MDC1 – DNS bojājumu kontrolpunkta mediators 1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (adaptēts no Sadatomi *et al.*, 2013).

DNS divpavedienu pārrāvuma gadījumā tirozīna fosfatāze EYA defosforilē H2AX C-gala tirozīnu 142 (Tyr142), kas nestimulētos apstākļos ir fosforilēts un neļauj reparācijas faktoriem saistīties pie H2AX. Šis notikums sekmē netālu esošā serīna 139 (Ser139) fosforilēšanu, un veidojas fosforilētais H2AX jeb γ H2AX (Sadatomi *et al.*, 2013). Tas izmaina lokālo hromatīna struktūru apkārt DNS pārrāvuma vietai, nodrošinot piekļuvi DNS bojājumu reparācijas faktoriem (Paull *et al.*, 2000). Fosforilēto H2AX atpazīst MDC1 (DNS bojājumu kontrolpunkta mediators 1, *mediator of DNA damage checkpoint 1*), kas sasitās pie γ H2AX C-gala. Šī kompleksa galvenais uzdevums ir veicināt DNS reparācijas faktoru uzkrāšanos un savstarpējo mijiedarbību bojātajos hromatīna rajonos (Stucki *et al.*, 2005). Ja DNS bojājumu nav iespējams novērst, uz H2AX veidojas apoptozi inducējošais komplekss, kur viens no proapoptotiskajiem proteīniem ir c-Jun N-gala kināze 1 (JNK1), kas atkal fosforilē Tyr142. Tā kā tas kavē reparācijas faktoru piesaisti, tad notiek apoptoze (Sadatomi *et al.*, 2013).

Papildus DNS reparācijai, H2AX piedalās arī citos organismam svarīgos procesos, sākot no embrija attīstības līdz novecošanai. Tam ir svarīga loma hromatīna remodelēšanā, kā arī dzimuma hromosomu kondensācijā un transkripcionālā inaktivēšanā (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2003). Somatiskajās šūnās sievietu dzimuma zīdītājiem tiek inaktivēta viena no

X hromosomām – tās tuvumā var detektēt palielinātu γ H2AX līmeni (Chadwick and Lane, 2005). Pelēm ātri dalošajās embriju šūnās ir novērots paaugstināts γ H2AX līmenis, kaut arī nav inducēti nekādi DNS bojājumi. Dažādās šūnu cikla fāzēs ievērojami svārstās γ H2AX līmenis (Ziegler-Birling *et al.*, 2009). Novecojošās šūnās rodas DNS divpavedienu pārrāvumi, kurus šūnas vairs nespēj novērst un var vērot γ H2AX uzkrāšanos (Sedelnikova *et al.*, 2004).

No otras puses, diferencētās šūnās mikroRNS-24 saistās pie *H2AX* mRNS un nomāc tā translāciju. Tas samazina DNS divpavedienu pārrāvumu reparāciju. Šis efekts varētu būt saistīts ar to, ka DNS divpavedienu pārrāvumi visvairāk veidojas replikācijas laikā, tāpēc diferencētās šūnās, kur nav šī procesa, notiek šūnas resursu ekonomēšana. Ja šūnās, kas diferencējas, veic *H2AX* pārekspresiju, tad DNS reparācijas funkcija pilnībā atjaunojas (Lal *et al.*, 2004).

1.4.2. H2AX iesaiste slimību patoģenēzē

Cilvēka *H2AX* gēns atrodas tādā hromosomālajā rajonā, kura mutācijas un delēcijas ir saistītas ar dažādu veidu vēža attīstību; tās novēro mieloīdās leukēmijas un akūtas limfoblastiskas leukēmijas laikā (Rubnitz *et al.*, 1996). Amplifikācija hromosomas 11q13 rajonā kopā ar *H2AX* gēna un citu DNS reparācijas faktoru kodējošā 11q distālā gala zaudēšanu ir raksturīga galvas un kakla plakanšūnu karcinomas gadījumā (Parikh *et al.*, 2007).

Ģenētiskās variācijas *H2AX* gēnā ietekmē ģenētisko uzņēmību vai aizsardzību pret dažiem ne-Hodžkina limfomas apakštipiem (Novik *et al.*, 2007). Jonizējoša radiācija var samazināt *H2AX* gēna ekspresiju asins šūnās (Zhang *et al.*, 2016).

Papildus vāzim, *H2AX* ir saistīts ar dažādām citām slimībām. Fosforilētais *H2AX* veidojas, piemēram, ar vecumu saistītu slimību gadījumā, liecinot par pastiprinātiem DNS bojājumiem. To var novērot arī ar vides stresoriem saistītu slimību gadījumā, piemēram, D vitamīna trūkuma laikā, un citos organismam nelabvēlīgos apstākļos (Schurman *et al.*, 2012).

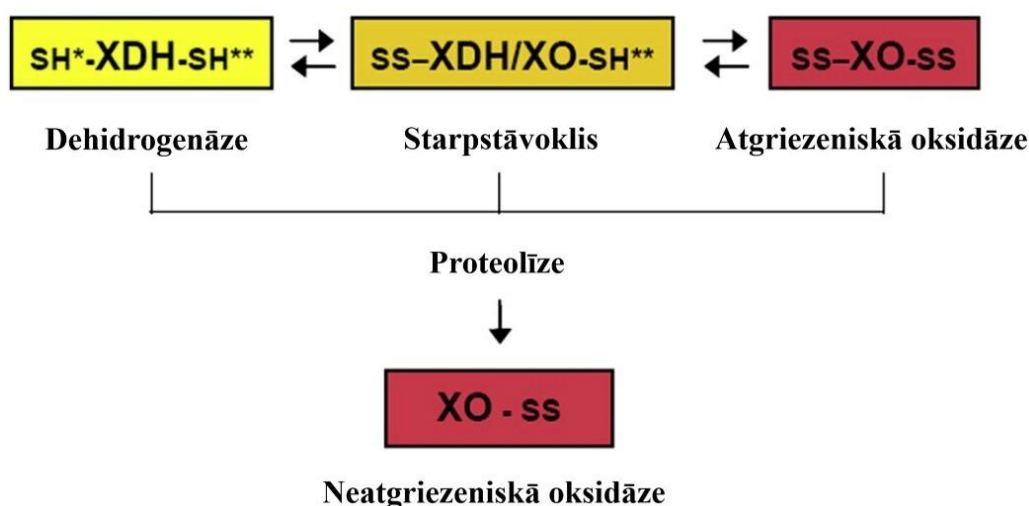
Fosforilētā *H2AX* fokusu kvantificēšana ar imunofluorescenci ir ļoti jutīga un specifiska metode DNS divpavedienu bojājumu noteikšanai, kuru tuvumā fosforilējas simtiem *H2AX* molekulu. Tā ļauj izmantot γ H2AX kā molekulāro marķieri genoma stabilitātes un DNS reparācijas pētījumos, novecošanās pētījumos, kā vēža biomarķieri, kā biodozimetru medikamentu pētījumos un citām vajadzībām (Redon *et al.*, 2011).

1.5. Ksantīna oksidoreduktāze

1.5.1. Ksantīna oksidoreduktāzes funkcijas organismā

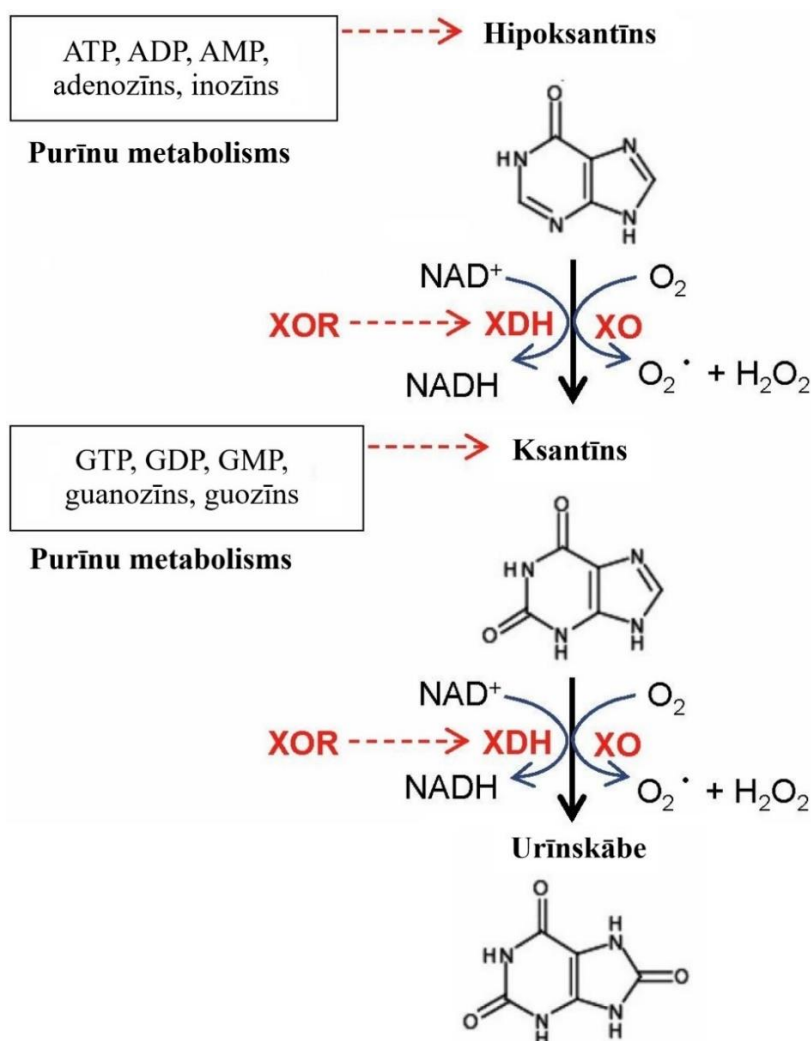
Ksantīna oksidoreduktāze (XOR) ir iesaistīta DNS molekulas sastāvā esošo purīnu (adenīna un guanīna) metabolismā. Šī enzīma gēnu visbiežāk apzīmē kā *XDH* gēnu. Pēc NCBI datubāzes datiem cilvēka *XDH* gēns ir lokalizēts 2. hromosomas īsā pleca 23.1 pozīcijā (2p23.1). *XDH* gēnam ir 37 eksoni, tā mRNS ir 5715 bp gara un tas kodē 1333 aminoskābes garu proteīnu. Cilvēka *XDH* gēna ortologs ir atrodams citos dzīvniekos, tostarp žurkās, kurām *Xdh* gēns ir lokalizēts 6. hromosomas garā pleca 13.–14. pozīcijā (6q13–q14) un to veido 36 eksoni; mRNS ir 4198 bp gara, bet gēna kodētais proteīns sastāv no 1331 aminoskābes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Zīdītāju XOR var eksistēt divās formās – kā konstitutīvi ekspresēta NAD^+ -atkarīga ksantīna dehidrogenāze (XDH) un kā pēc transkripcijas modificēta ksantīna oksidāze (XO). Pāreja starp formām var notikt gan atgriezeniski, kad ķīmiski vai enzimatiski oksidējas XDH tiola grupas, gan neatgriezeniski pēc ierobežotas proteolīzes mehānisma (1.5. att.) (Battelli *et al.*, 2014). XOR ekspresijas līmenis dažādos audos atšķiras. Vislielākais tas ir orgānos ar augstu enzimatisko aktivitāti – aknās, zarnās, kā arī nierēs, vaskulārā endotēlija šūnās (Kooij, 1994).



1.5. attēls. Ksantīna oksidoreduktāzes pāriešana starp ksantīna dehidrogenāzes un ksantīna oksidāzes formām. XDH – ksantīna dehidrogenāze; XO – ksantīna oksidāze; SH – reducētā (ditiola) forma; SS – oksidētā (disulfīda) forma; * – ātri reaģējošā grupa; ** – lēni reaģējošā grupa (adaptēts no Battelli *et al.*, 2014).

Purīnu degradācijas noslēdzošajos soļos XOR katalizē hipoksantīna oksidāciju par ksantīnu un ksantīna oksidāciju par urīnskābi (1.6. att.) (Chung *et al.*, 1997).



1.6. attēls. **Ksantīna oksidoreduktāzes loma purīnu metabolismā.** ATP – adenoziņa trifosfāts; ADP – adenoziņa difosfāts; AMP – adenoziņa monofosfāts; GTP – guanoziņa trifosfāts; GDP – guanoziņa difosfāts; GMP – guanoziņa monofosfāts; H_2O_2 – ūdeņraža peroksīds; NAD^+ – oksidētais nikotīnamīda adenīna dinukleotīds; NADH – reducētais nikotīnamīda adenīna dinukleotīds; $\text{O}_2^{\cdot -}$ – superoksīda radikālis; XOR – ksantīna oksidoreduktāze; XDH – ksantīna dehidrogenāze; XO – ksantīna oksidāze (adaptēts no Chen *et al.*, 2016).

Kaut arī abas XOR formas – XDH un XO – ir viena gēna (*XDH*) produkts, tām ir dažādas katalītiskās īpašības. XDH izmanto hipoksantīnu vai ksantīnu par substrātu un NAD^+ kā kofaktoru, iegūstot NADH un urīnskābi, savukārt XO izmanto to pašu substrātu, bet kā kofaktoru – O_2 , un reakcija rezultējas ar urīnskābi un superoksīda radikāli vai ūdeņraža peroksīdu (Chung *et al.*, 1997). Normālos aerobos apstākļos ūdeņraža peroksīds veido 75 % no XO saražotajiem ROS, bet patofizioloģiskos apstākļos, kad samazinās skābekļa pieejamība

un palielinās ūdeņraža jonu koncentrācija, piemēram, iekaisuma gadījumā, tas var pieaugt līdz 95 % (Kelley *et al.*, 2010).

XOR veidotie ROS var būt gan citotoksiski un izraisīt audu bojājumus, gan tie var būt iesaistīti dažādās bioloģiskās aktivitātēs, piemēram, dzelzs mobilizācijā no aknām un absorbcijā zarnās, aizsardzībā no infekciju slimībām, šūnu proliferācijas inducēšanā. Turklāt urīnskābe var darboties kā antioksidants (Battelli *et al.*, 2014).

Cilvēkos un augstākajos primātos urīnskābe ir purīnu oksidācijas galaprodukts. Aptuveni 30 % urīnskābes tiek izvadīti caur kuņģa-zarnu traktu, bet 70 % – caur nierēm, kur ~ 90 % tiek reabsorbēti. Zemākos dzīvniekos, piemēram, pelēs un žurkās, enzīms urikāze (urāta oksidāze) oksidē urīnskābi par alantoīnu. Tas ir aptuveni 100 reizes labāk šķīstošs ūdenī, salīdzinot ar urīnskābi, un efektīvāk izdalās no urīna. Cilvēkiem nav funkcionāla urikāzes gēna (Chen *et al.*, 2016).

Citas XOR funkcijas ietver dažādu endogēnu metabolītu, piemēram, pirimidīnu, heterociklisku savienojumu, retinola un aldehīdu, oksidāciju. XOR piedalās aknu detoksifikācijā, katalizējot ksenobiotikas, piemēram, pretvīrusu un pretvēža zāles, kā arī reducē skābekli, NAD⁺, fericianīdu un metilēnzilo. Tādējādi tā var gan oksidēt, gan reducēt substrātu (Battelli *et al.*, 2014). *XDH* gēnā ir saistīšanās saiti attīstības regulācijā iesaistītiem transkripcijas faktoriem, tādiem kā aktivators proteīns 1 un aktivators proteīns 2, kas inducē augšanas faktorus un piedalās šūnu diferenciācijā. Savukārt saistīšanās saiti interleikīniem, NF-κB, tumora nekrozes faktoram α un interferonam-γ norāda uz lomu iekaisuma akūtās fāzes reakcijās (Xu *et al.*, 1996).

1.5.2. Ksantīna oksidoreduktāze slimību gaitā

XDH gēna ģenētiskie varianti ir saistīti ar kuņģa vēža prognozēm, turklāt pacientiem ar aizsargājošo genotipu ir zemāks *XDH* gēna ekspresijas līmenis (Liu *et al.*, 2018). Hipoksijas laikā plaušu artērijas endotēlija šūnās palielinās gan *XDH* mRNS līmenis, gan proteīna aktivitāte, kas norāda uz XOR iesaisti plaušu tūskas attīstībā (Hassoun *et al.*, 2018).

Cilvēku asins serumā XOR aktivitāte ir zema, bet tā palielinās dažādu patoloģiju ietekmē, piemēram, vīrushepatīta, reimatisma, autoimūno slimību, šizofrēnijas, pneimonijas, 2. tipa cukura diabēta gadījumā (Battelli *et al.*, 2014).

XOR ir iesaistīta dažādu vēža veidu attīstībā. Pacientu asins plazmā palielinās XOR aktivitāte, kas ir saistāma ar iekaisuma reakciju pret audu bojājumiem audzēja attīstības laikā. Audos, kur normālos apstākļos ir augsta XOR aktivitāte, vēža gadījumā tā samazinās, piemēram, nierēs, aknās, krūtīs, resnajā zarnā. Savukārt smadzeņu audzēju meningiomas un

astrocītomas, kā arī balsenes vēža un plaušu vēža gadījumā ir vērojams XOR aktivitātes pieaugums (Battelli *et al.*, 2016). Hepatocelulāras karcinomas pacientiem zems *XDH* mRNS līmenis korelē ar vēža progresiju un sliktākām prognozēm. Savukārt *XDH* pārekspresija mazina hepatocelulāras karcinomas invāziju (Chen *et al.*, 2017).

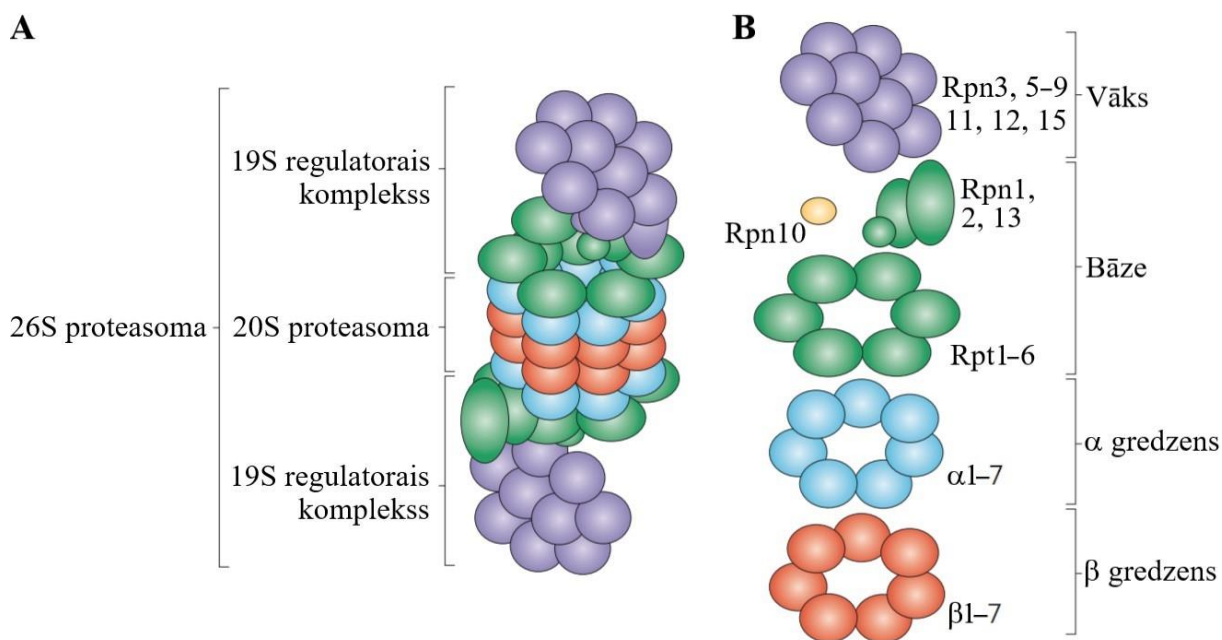
Plazmas XOR aktivitāte var tikt izmantota kā biomarķieris metabolu slimību gadījumā. Japānas populācijā tā ir saistīta ar ķermeņa masas indeksu, smēķēšanu, triglicerīdu, urīnskābes un transamināzes līmeņiem. XOR aktivitātes mērījumi var palīdzēt identificēt pacientus ar augstu metabolo un kardiovaskulāro slimību risku. Dzīvnieku modeļos XOR aktivitātes inhibēšana samazina superoksīda izraisītus audu bojājumus un uzlabo kardiovaskulāro un nieru stāvokli. Cilvēkiem XOR inhibitori samazina urīnskābes līmeni, bet ne plazmas XOR aktivitāti. Tās samazināšana varētu būt jauna terapeitiskā stratēģija metabolo un kardiovaskulāro slimību ārstēšanai (Furuhashi *et al.*, 2018).

1.6. Proteasomu vadīta proteolīze

1.6.1. Ubikvitīna-proteasomu sistēma

Lielāko daļu proteīnu eikariotos proteolīzes ceļā degradē ubikvitīna-proteasomu sistēma (UPS). Līdz ar to tā ir iesaistīta dažādos šūnu procesos: ātra nevajadzīgo proteīnu degradēšana; proteīnu kvalitātes kontrole, aizvācot bojātos vai nepareizi salocītos proteīnus; gēnu transkripcijas regulēšana; imūnajā sistēmā piedalās antigēnu prezentēšanā uz galvenā audu saderības kompleksa I (*major histocompatibility complex*, MHC I) molekulām; darbojas kā aminoskābju avots (Lecker *et al.*, 2006). Lai UPS degradētu proteīnu, tā lizīna atlikumiem kovalenti piesaistās ubikvitīna ķēde, kuras aktivēšana notiek ATP klātbūtnē (Schmidt and Finley, 2014).

UPS sastāv no cilindriskas formas 20S proteolītiskās kodola daļas un pie tās abos galos saistītiem 19S regulatorajiem kompleksiem, kopā veidojot 26S proteasomu (1.7. att.). Eikariotiem 20S proteasoma sastāv no četriem viena virs otra esošiem gredzeniem. Divus ārējos gredzenus katru veido septiņas α subvienības, kas kalpo kā vārti, caur kuriem proteīns nokļūst proteasomas katalītiskajā saitā – divos centrālajos gredzenos, kas katrs sastāv no septiņām β subvienībām. Katalītiski aktīvās subvienības ir $\beta 1$ ar kaspāzei līdzīgu aktivitāti, kas šķel proteīnu aiz skābiem atlikumiem, $\beta 2$ ar tripsīnam līdzīgu aktivitāti, kas šķel aiz bāziskiem atlikumiem, un $\beta 5$ ar himotripsīnam līdzīgu aktivitāti, kas šķel aiz lieliem hidrofobiem atlikumiem (Schmidt and Finley, 2014).



1.7. attēls. Vienkāršota 26S proteasomas uzbūves shēma. (A) 26S proteasomas sastāvs. (B) 26S proteasomas subvienību sastāvs. α – α subvienības; β – β subvienības; Rpt – ATPāzes subvienības; Rpn – ne-ATPāzes subvienības (adaptēts no Murata *et al.*, 2009).

UPS 19S regulatorie kompleksi ir galvenie proteasomu aktivatori, kas veicina ATP un ubikvitīna atkarīgu substrāta pārstrādi. Tie atpazīst poliubikvitinētus substrātus, atloka tos, deubikvitinē un tad translocē uz 20S kompleksu, kas tos degradē līdz oligopeptīdiem. 19S sastāv no 19 subvienībām, kas veido bāzi un vāku 20S subvienības galā. Bāze atrodas tuvāk 20S subvienībai; to veido sešas homologas AAA dzimtas ATPāzes (Rpt1–Rpt6), kas ir izkārtojušās heksamēra gredzena veidā. Tās veic ATP-atkarīgu proteīnu atlocīšanu. Bez ATPāzēm bāzes daļā atrodas arī divas lielākās 19S subvienības Rpn1 un Rpn2, un divi ubikvitīna receptori (Rpn10 un Rpn13), no kuriem Rpn10 savieno bāzes un vāka daļu. Vāka daļu veido deviņas ne-ATPāzes subvienības (Rpn3, 5–9, 11, 12, 15). Rpn11 subvienībai piemīt deubikvitinējoša aktivitāte, kas veicina ubikvitinētu proteīnu degradēšanu (Schmidt and Finley, 2014).

20S var saistīties arī ar heptamēriem 11S proteasomu regulatoriem, veidojot proteasomu, kas veic no ATP neatkarīgu degradēšanu ar ubikvitīnu nesaistītiem peptīdiem. Ja 20S vienlaicīgi saistās ar 19S un 11S, tās veido hibrīdas proteasomas, kas varētu būt iesaistītas ATP atkarīgā neubikvitinētu proteīnu degradēšanā (Aghdam and Sheibani, 2013). Gan 20S, gan 26S proteasomas spēj degradēt arī ar ubikvitīnu nesaistītus proteīnus, kas ir pilnībā vai daļēji atlocījušies novecošanās, oksidēšanās vai mutāciju dēļ (Ben-Nissan and Sharon, 2014).

1.6.2. 26S proteasomas gēni

Pēc NCBI datubāzes datiem proteasomu gēni cilvēka genomā atrodas lielākajā daļā hromosomu. Tie neatrodas vienīgi 4., 5., 8., 10., 22. un Y hromosomās. Šajā darbā izvēlētie proteasomu gēni ir lokalizēti 14. hromosomas garajā plecā. Tie ir: 1) proteasomas alfa tipa 3. subvienība (PSMA3), kas ir viena no 20S proteasomas ārējā gredzena subvienībām; 2) proteasomas alfa tipa 6. subvienība (PSMA6), kas arī atrodas 20S proteasomas ārējā gredzenā; 3) proteasomas beta tipa 5. subvienība (PSMB5), kas ir viena no 20S proteasomas iekšējā gredzena katalītiski aktīvajām subvienībām; 4) 19S regulatorā kompleksa AAA-ATPāzes subvienība Rpt4 (PSMC6), kas ietilpst heksamēru gredzenā virs 20S proteasomas. Informācija par šiem gēniem ir apkopota 1.1. tabulā (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.1. tabula. Darbā analizēto proteasomu gēnu raksturojums.

Gēns	Pozīcija hromosomā	Eksonu skaits	mRNS, bāzu pāri	Proteīna garums, aminoskābes
Cilvēka gēni				
<i>PSMA3</i>	14q23.1	11	955 993	255 248
<i>PSMA6</i>	14q13.2	9	1091 1139 996 1016	246 167 167 227
<i>PSMB5</i>	14q11.2	6	1311 958 1379	263 160 203
<i>PSMC6</i>	14q22.1	15	2163 3265	389 288
Žurkas gēni				
<i>Psm3</i>	6q24	11	1993	255
<i>Psm6</i>	6q23	8	1136	246
<i>Psm5</i>	15p13	3	866	263
<i>Psmc6</i>	15p14	14	2388	403

Visu četru gēnu ortologi ir atrodami citos dzīvniekos, tostarp šajā darbā analizētajās žurkās. Cilvēka genomā šiem gēniem ir vairāki transkripta varianti, bet žurkām – viens (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

1.6.3. Imunoproteasomas

Bez augstāk aprakstītajām visos šūnu tipos ekspresētajām konstitutīvajām proteasomām pastāv arī imunoproteasomas. Tās tiek pastāvīgi ekspresētas hematopoētiskajās šūnās, bet iekaisuma stimulu gadījumā (interferons γ , audzēju nekrozes faktors) tās var tikt inducētas arī

citos šūnu tipos. Imunoproteasomām ir svarīga loma vīrusu infekciju laikā, kad tās piedalās CD8 T šūnu atbildes reakciju kontrolē, NF- κ B ceļu aktivēšanā un oksidatīvā stresa novēršanā (McCarthy and Weinberg, 2015).

Pēc uzbūves imunoproteasomas ir līdzīgas konstitutīvajām proteasomām. Atšķiras β gredzena trīs proteolītiskās subvienības: standarta β 1, β 2 un β 5 subvienības ir aizvietotas ar inducējamajām subvienībām, attiecīgi LMP2 (PSMB9), MECL-1 (PSMB10) un LMP7 (PSMB8), ar kurām aminoskābju sekvenču līdzība ir 60–70 %. No šīm subvienībām MECL-1 un LMP7 ir ar tādām pašām aktivitātēm kā attiecīgās konstitutīvās subvienības, bet LMP2 subvienībai piemīt himotripsīnam līdzīgā aktivitāte, kas proteīnā šķeļ pēc hidrofobām aminoskābēm. Tam par iemeslu tiek minēta vajadzība pēc hidrofobām C-gala aminoskābēm peptīdos antigēnu prezentēšanai (Ferrington and Gregerson, 2012). Savukārt konstitutīvās proteasomas 19S regulatorais komplekss ir aizvietots ar 11S kompleksu, ko veido proteasomu aktivatora kompleksa subvienība 1 (PA28 α) un proteasomu aktivatora kompleksa subvienība 2 (PA28 β). Kopumā imunoproteasoma proteolītiskās funkcijas veic efektīvāk nekā konstitutīvā proteasoma un tās darbība nav ierobežota tikai ar imūno sistēmu. Papildus, piemēram, vīrusu proteīnu šķelšanai un antigēnu prezentēšanai, tā veic arī konstitutīvās proteasomas funkcijas ubikvitinētu proteīnu degradēšanā (Kimura *et al.*, 2015).

1.6.4. Ubikvitīna-proteasomu sistēmas saistība ar slimībām

Tā kā UPS piedalās dažādos procesos, tad izmaiņas tās darbībā – gan palielināta, gan samazināta aktivitāte – ir iesaistītas dažādu mantotu un iegūtu slimību patoģenēzē. Tās var būt neurodeģeneratīvas slimības (Alcheimera slimība, Pārkinsona slimība, Hantingtona slimība, prionu slimība), sirds slimības (pārejošā išēmija, ieslēguma ķermenīšu miozīts), dažādi vēža veidi (krūts vēzis, zarnu vēzis, multiplā mieloma), vīrusu infekcijas (HIV, hepatīts B), cistiskā fibroze un citas (Paul, 2008). UPS ir iesaistīta arī novecošanās procesos – var vērot traucētu proteasomu ekspresiju un funkcijas. Savukārt pastiprināta proteasomu darbība ir saistāma ar palielinātu dzīves ilgumu, kā tas ir novērojams ilgi dzīvojošiem cilvēkiem (Chondrogianni *et al.*, 2000). Imunoproteasomas ir iesaistītas daudzu iekaisuma slimību, tai skaitā autoimūno slimību, patoģenēzē. Tās ietekmē iekaisuma citokīnu producēšanu makrofāgos, T šūnu polarizāciju un signalēšanu pa NF- κ B ceļiem, kas ir nozīmīgi dažādu iekaisuma citokīnu gēnu transkripcijā (Kimura *et al.*, 2015).

Šajā darbā izvēlēto proteasomu subvienību polimorfismiem ir atrasta saistība ar dažādām slimībām. *PSMA3* gēna polimorfismi ir saistīti ar bērnu aptaukošanos un multiplo sklerozi (Kupca *et al.*, 2013; Kalnina *et al.*, 2014). *PSMA6* gēna polimorfismiem ir asociācija

ar kardiovaskulārām slimībām un 2. tipa cukura diabētu (Wang *et al.*, 2013; Sjakste *et al.*, 2007). *PSMC6* gēna polimorfismiem kopā ar *PSMA3* un *PSMA6* gēnu polimorfismiem ir asociācija ar cilvēku uzņēmību pret 1. tipa cukura diabētu, bērnu astmu, juvenilo idiopātisko artrītu (Sjakste *et al.*, 2016, Paramonova *et al.*, 2014, Sjakste *et al.*, 2014). Polimorfismi *PSMB5* gēnā nemaina šīs subvienības aktivitāti, bet ietekmē transkripciju (Wang *et al.*, 2008).

Krūts vēža pacientiem ir pastiprināta *PSMB5* gēna ekspresija. Arī *PSMB5* subvienība ir pārekspresēta; tā modulē vēža šūnu augšanu un migrāciju. Turklāt *PSMB5* piemīt imunosupresīvas īpašības (Wang *et al.*, 2017).

Ņemot vērā proteasomu nozīmi organismā, uz proteasomām mērķētiem savienojumiem ir potenciāls medicīnā. Selektīva proteasomu inhibīcija var būt efektīva vēža ārstēšanā (Crawford *et al.*, 2011). Savukārt imunoproteasomas inhibitori varētu palīdzēt iekaisuma slimību un autoimūno slimību gadījumā (Cromm and Crews, 2017).

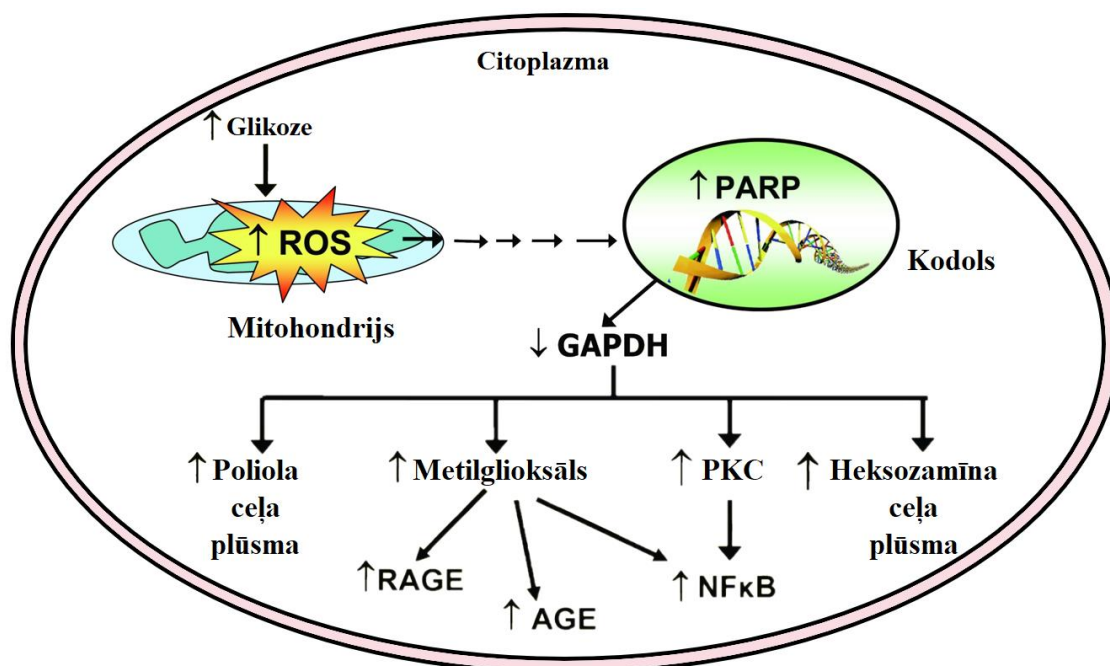
1.7. Cukura diabēts

1.7.1. Cukura diabēta raksturojums un klasifikācija

Līdzšinējos pētījumos 1,4-DHP atvasinājumi ir uzrādījuši pozitīvu ietekmi cukura diabēta modeļsistēmās – dažādos orgānos tie normalizē endoteliālās un inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes (eNOS un iNOS) proteīnu ekspresiju, kā arī samazina DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni baltajās asinīs šūnās (Rostoka, 2015). Šī iemesla dēļ mēs turpinājam analizēt 1,4-DHP atvasinājumu ietekmi cukura diabēta (CD) gadījumā.

CD ar tā raksturīgajām iezīmēm – pastiprinātām slāpēm, urināciju un svara zudumu – pasaulē ir pazīstams jau vairāk nekā 3000 gadus. Jau 1893. gadā radās teorija, ka viela, ko izdala Paula Langerhana 1869. gadā raksturotās aizkuņģa dziedzera saliņas, ir iesaistīta asins glikozes līmeņa kontrolē. Vēlāk, 1909. gadā, šī viela tika nosaukta par insulīnu (Zajac *et al.*, 2010). Glikozes homeostāze organismā ir svarīga, jo smadzenēm tas ir galvenais enerģijas avots, atšķirībā no citiem orgāniem, kas pārsvarā izmanto brīvās taukskābes. Turklāt smadzenes glikozi nesintezē un glikogēnu ilgstoši neuzglabā, tāpēc ir nepieciešama nepārtraukta glikozes piegāde ar plazmu. Pazemināta glikozes koncentrācija var negatīvi ietekmēt cerebrālās funkcijas, bet ilgstoša un smaga hipoglikēmija var izraisīt paliekošus smadzeņu bojājumus un nāvi. Savukārt palielināts glikozes līmenis plazmā var izraisīt kardiovaskulāras slimības. Glikozes līmeni ietekmē gan hormoni (insulīns, glikagons, kateholamīns), gan simpātiskā nervu sistēma, gan citas vielas, piemēram, brīvās taukskābes. Insulīns regulē glikozes metabolismu gan tieši, gan netieši (Shrayyef and Gerich, 2010).

Cukura diabēts ir ar hronisku hiperglikēmiju saistīta metabola slimība, kuras cēloņi ir traucējumi insulīna sekrēcijā vai tā darbībā. Hiperglikēmija veicina ROS pārprodukciju mitohondriālajā elektronu transporta ķēdē. Tie izraisa DNS bojājumus un aktivē PARP, kas veic galvenā glikozē iesaistītā enzīma glicerāldehīda 3-fosfāta dehidrogenāzes (GAPDH) PARilēšanu. Tādējādi samazinās GAPDH aktivitāte, kas tālāk izraisa audu bojājumus caur pieciem galvenajiem mehānismiem (1.8. att.): (1) palielināta glikozes un citu cukuru plūsma caur poliola ceļu, kas pastiprināti patērē NADPH, tādējādi izraisot oksidatīvo stresu, (2) heksozamīna ceļa pārmērīga aktivitāte, kas ietekmē vairāku diabēta komplikāciju patogēnēzē iesaistītu gēnu ekspresiju un proteīnu funkcijas, (3) proteīnu kināzes C (PKC) aktivēšana, kas inhibē endoteliālās NO sintāzes ekspresiju un samazina NO produkciju, kā arī aktivē transkripcijas faktoru NF-κB, (4) neenzimātiskās reakcijās pastiprināti veidojas paātrinātās glikozilēšanas gala produktu (*advanced glycation end-products*, AGE) priekštecis metilglioksāls, tādējādi veicinot AGE veidošanos, kas modificē citus proteīnus un traucē to funkcijām, (5) pastiprinātā metilglioksāla veidošanās palielina AGE receptoru (RAGE) ekspresiju (Giacco and Brownlee, 2010).



1.8. attēls. **Hiperglikēmijas inducētie audu bojājumu mehānismi šūnā.** AGE – paātrinātās glikozilēšanas gala produkti; GAPDH – glicerāldehīda 3-fosfāta dehidrogenāze; NF-κB – kodola faktors kappā B; PARP – poli(ADP-ribozes) polimerāze; PKC – proteīnu kināze C; RAGE – paātrinātās glikozilēšanas gala produktu receptori; ROS – reaktīvie skābekļa radikāļi (adaptēts no Giacco and Brownlee, 2010).

Cukura diabētu iedala četrās kategorijās:

- 1. tipa cukura diabēts (1TCD) – saistīts ar β -šūnu bojāeju, ko parasti pavada pilnīgs insulīna deficīts;
- 2. tipa cukura diabēts (2TCD) – saistīts ar insulīna sekrēcijas samazināšanos un rezistenci pret insulīnu;
- gestācijas CD – diabēts, ko diagnosticē grūtniecības otrajā vai trešajā trimestrī;
- citi specifiski CD tipi, ko izraisa citi cēloņi, tādi kā aizkuņģa dziedzera slimības (piemēram, cistiskā fibroze), monogēni diabēta sindromi (piemēram, jaundzimušo diabēts), medikamentu vai ķīmiski inducēts diabēts (piemēram, glikokortikoīdu lietošana HIV/AIDS ārstēšanā vai pēc orgānu transplantācijām).

Izplatītākie no šiem ir 1. un 2. tipa CD (American Diabetes Association, 2016).

1.7.2. Pirmā tipa cukura diabēts

Pirmā tipa cukura diabēts, saukts arī par insulīna atkarīgo diabētu, skar 5–10 % diabēta pacientu. Visbiežāk tas parādās bērnībā, bet kopumā to var novērot visās vecuma grupās (American Diabetes Association, 2016). Tas rodas no T šūnu vadītas autoimūnas aizkuņģa dziedzera β -šūnu iznīcināšanas, kas izraisa insulīna samazināšanos un noved pie hiperglikēmijas. Aknās glikogenolīzē un glikoneoģenēzē notiek glikozes pārprodukcija, savukārt šūnās insulīna trūkuma dēļ samazinās glikozes uzņemšana. Insulīna neesamība pastiprina tauku noārdīšanos un taukskābju oksidēšanos, kā rezultātā palielinās ketonu produkcija. Neārstētas šādas izmaiņas organismā var izraisīt nervu sistēmas bojājumus, komu un nāvi (Kelly *et al.*, 2003). Tipiskas pazīmes slimniekiem ir osmotiska diurēze un svara zudums, savukārt simptomi ir polifāģija (palielināta ēstgriba), polidipsija (pastiprināta šķidruma uzņemšana) un poliūrija (pastiprināta urīna izdalīšanās), kā arī neskaida redze. Slimības rašanos ietekmē gan ģenētiski, gan vides faktori (American Diabetes Association, 2014).

Pētot 1TCD ģenētiku ir atrasti vairāki desmiti gēnu lokusu, kuriem ir asociācija ar uzņēmību pret šo slimību. Šie gēni ir ar dažādām funkcijām – gan iesaistīti insulīna produkcijā un metabolismā, gan imunitātes veidošanā, gan aizsardzībā pret β -šūnu apoptozi u.c. Tomēr nav identificēts tāds viens gēns pēc kura varētu prognozēt slimības rašanos. Šobrīd slimības uzņēmības noteikšanā lielāko daļu riska (ap 60 %) nosaka cilvēka leikocītu antigēns (*human leukocyte antigen*, HLA). HLA gēniem ir trīs klases, no kurām ciešāko asociāciju ar 1TCD uzrāda II klases gēni, kas kodē antigēnu prezentēšanā iesaistītas

molekulas. Lielai daļai pacientu ir HLA-DR3 vai HLA-DR4 II klases antigēni, no tiem aptuveni 30 % ir DR3/DR4 heterozigotas (Atkinson, 2012).

Vides faktoru ietekme uz 1TCD attīstību nav līdz galam izprasta. Pastāv uzskats, ka mikrobu infekcijas aizsāk vai saasina aizkuņģa dziedzera saliņu iekaisumu ģenētiski uzņēmīgajos indivīdos. Vīrusu infekcija β -šūnās var rezultēties citolīzē vai izraisīt lokālu iekaisumu, kas iniciē autoimunitāti. Ir novērota 1TCD asociācija ar enterovīrusiem. Zarnu mikrobiota arī var ietekmēt β -šūnu autoimunitāti (Clark *et al.*, 2017). Tāpat 1TCD attīstībā ietekme ir toksīniem, klimatam, vakcinācijai, jaundzimušā barošanai, un stresam (Kelly *et al.*, 2003).

Konstatējot 1TCD, ir svarīgi uzturēt insulīna līmeni, jo tas var palīdzēt mazināt retinopātiju un hipoglikēmiju tālākā slimības ārstēšanā. Pacientiem veic intensīvu insulīna terapiju, izmantojot ikdienas injekcijas vai insulīna pumpjus, kā arī aizkuņģa dziedzera saliņu vai autologo hematopoētisko cilmes šūnu transplantāciju (Atkinson *et al.*, 2014; Voltarelli and Couri, 2009). Kā potenciāli medikamenti 1TCD un tā komplikāciju ārstēšanai ir atzīti antioksidanti (Matough *et al.* 2012). Liela loma varētu būt arī mitohondriju disfunkcijas novēršanai (Higgins and Coughlan, 2014). Šādas īpašības piemīt 1,4-DHP atvasinājumiem (Velena *et al.*, 2016).

1.7.3. Otrā tipa cukura diabēts

Aptuveni 90–95 % diabēta pacientu cieš no 2. tipa cukura diabēta, ko sauc arī par insulīna neatkarīgo diabētu un pieaugušo cilvēku cukura diabētu. Pacientiem ir insulīna rezistence un relatīvs insulīna deficīts, bet pārsvarā šiem cilvēkiem nav vajadzīga ārstēšana ar insulīnu, lai varētu dzīvot. Bieži 2TCD paliek nediagnosticēts vairākus gadus, jo hiperglikēmija attīstās pamazām un sākuma stadijā tai nav izteiktu simptomu (American Diabetes Association, 2016).

Cēloņi 2TCD ir dažādi – gan dzīvesveids, gan ģenētika, gan citas slimības. Riska faktori ir maza fiziskā aktivitāte, sēdošs dzīvesveids, liels alkohola patēriņš, smēķēšana, aptaukošanās, arī toksīni vidē un novecošana. Šo slimību var pārmantot – ir aptuveni 25 % iespēja saslimt, ja ģimenes vēsturē ir bijuši diabēta gadījumi. Ir atklāta asociācija starp 2TCD un dažādiem gēniem, piemēram, *KCNJ11* (kodē aizkuņģa dziedzera saliņu ATP-jutīgo kālija kanālu Kir6.2), *TCF7L2* (regulē proglikagona gēnu ekspresiju un tādējādi glikagona līdzīgā peptīda-1 produkciju) un citiem gēniem. Papildus tam, dažādas veselības problēmas palielina saslimšanas risku – hipertensija, kombinēta hiperlipidēmija, metabolais sindroms, hronisks pankreatīts un citas (Olokoba *et al.*, 2012).

Veselā cilvēkā organisms uztur glikozes homeostāzi – β -šūnu stimulētā insulīna sekrēcija vada glikozes, aminoskābju un taukskābju uzņemšanu insulīna-jutīgos audos, bet šie audi nodod informāciju saliņām par nepieciešamību pēc insulīna. Savukārt insulīna rezistences gadījumā β -šūnas palielina insulīna sekrēciju, lai uzturētu normālu glikozes toleranci. Ja β -šūnas nefunkcionē pareizi, palielinās glikozes līmenis asins plazmā (Kahn *et al.*, 2014).

Pacientiem ar 2TCD samazinās β -šūnu skaits, palielinās glikolipotoksicitāte un amiloīdu uzkrāšanās, kas rezultējas ar oksidatīvā stresa un endoplazmatiskā tīkla stresa izraisītu β -šūnu apoptozi. Turklāt ir novērots, ka pēc 30 gadu vecuma β -šūnas vairs neatjaunojas. Arī α -šūnas ir iesaistītas 2TCD attīstībā – to nepareizas darbības rezultātā palielinās glikagona sekrēcija, kas veicina hiperglikēmijas veidošanos. Kuņģa-zarnu trakts ražo dažādus peptīdus, piemēram, glikagonam līdzīgo peptīdu 1 (GLP-1) un glikozes atkarīgo insulīnotropo polipeptīdu, kopā sauktus par inkretīniem, kas iedarbojas uz aizkuņģa dziedzera saliņām stimulējot β -šūnu insulīna sekrēciju un supresējot α -šūnu glikagona sekrēciju. Tā pat arī zarnu mikroflorai un nervu sistēmai ir nozīme 2TCD attīstībā. Būtiska loma ir sistemātiskam iekaisumam, kas ir saistāms ar β -šūnu nepareizu funkcionēšanu (Kahn *et al.*, 2014).

Pacienti savu veselības stāvokli var uzlabot, mainot dzīves stilu un ēšanas paradumus – uzturot ķermeņa masas indeksu līdz 25 kg/m^2 , nodarbojoties ar fiziskām aktivitātēm, uzturā lietojot daudz šķiedrvielu un nepiesātināto taukskābju, atturoties no smēķēšanas un pastiprinātas alkohola lietošanas. Ārstēšanā izmanto arī medikamentus, lai normalizētu glikozes koncentrāciju un mazinātu komplikāciju attīstību, piemēram, sulfonilurīnvielas, biguanīdus, meglitinīdus, tiazolidīndionus u.c. (Olokoba *et al.*, 2012).

1.7.4. Cukura diabēta komplikācijas

Cukura diabēta pacientiem var attīstīties dažādas diabētiskās komplikācijas. Tās var būt, piemēram, retinopātija ar iespējamu redzes zaudēšanu, neiropātija ar iespējamām amputācijām, gremošanas sistēmas traucējumiem un kardiovaskulārām slimībām. Var novērot aterosklerotiskas kardiovaskulāras un cerebrovaskulāras slimības, aknu slimības. Viena no izplatītākajām mikrovaskulārajām komplikācijām gan 1TCD, gan 2TCD pacientiem ir nefropātija ar sekojošu nieru mazspēju (American Diabetes Association, 2014).

Diabētiskā nefropātija skar $\sim 30\%$ CD pacientu. Diabēts izraisa izmaiņas nieru struktūrā; tajās var novērot mezangija proliferāciju, glomerulu bazālās membrānas

sabiezēšanu, glomerulosklerozi. Paaugstināts asinsspiediens, hiperglikēmija un ģenētiskā predispozīcija ir galvenie riska faktori diabētiskās nefropātijas attīstībai (Gross *et al.*, 2005).

Slimības patoģenēzē ir iesaistīti dažādi ceļi: profibrotiskie un iekaisuma citokīni, hemodinamiskais ceļš (renīna-angiotenzīna-aldesterona un urotenzīna sistēmas), dažādu kināžu ceļi (piemēram, proteīna kināze C), bet visnozīmīgākie ir oksidatīvā stresa mediatori (Arora and Singh, 2013). Diabētisku nieru garozā pastāv cieša saistība starp paaugstinātu oksidatīvo stresu, profibrotisko mediatoru pieaugumu (kolagēns I, kolagēns III, transformējošais augšanas faktors β , fibronektīns) un pastiprinātu pirmsiekaisuma mediatoru pieaugumu (vaskulārā šūnu adhēzijas molekula 1, monocītu hemotaktiskais proteīns) (Chew *et al.*, 2010). Diabēta laikā pastiprināti darbojas iNOS un tā veicina peroksinitrīta veidošanos, kam ir svarīga loma glomerulāro bojājumu attīstībā (Xiao *et al.*, 2008). Diabētiskās nierēs ir vairāki enzimatiski un neenzimatiski ROS avoti – slāpekļa oksīda sintāzes, ksantīna oksidāzes aktivitāte, glikozes autooksidācija, NADPH oksidāze, traucējumi mitohondriālās elpošanas ķēdē (Forbes *et al.*, 2008).

Mitohondriju veiktā oksidatīvā fosforilācija nodrošina šūnu homeostāzei nepieciešamo ATP, kas uztur Na^+ gradientu nieru kanāliņos. Paaugstināta glikozes līmeņa dēļ pieaug vajadzība pēc ATP, kura nodrošināšanai notiek intensīvāka oksidatīvā fosforilācija. Tās laikā no elektronu transporta ķēdes noplūst elektroni, kas reagē ar molekulāro skābekli un veido ROS. Tālāk ROS pārprodukcija izraisa oksidatīvo stresu, kas savukārt bojā mitohondrijus (Higgins and Coughlan, 2014). Nepareizi funkcionējošu mitohondriju ražotie ROS, it īpaši superoksīds, tiek uzskatīti par nozīmīgu faktoru diabētisko komplikāciju attīstībā (Forbes *et al.*, 2008). Nepareizi funkcionējošos mitohondrijus šūnā var iznīcināt mitofāģijas ceļā, bet, kad to skaits pārsniedz mitofāģijas kapacitāti, bojātie mitohondriji izraisa šūnu nāvi. Līdz ar to diabētiskās nefropātijas stāvokļa uzlabošanas stratēģijai vajadzētu ietvert mitohondriju disfunkcijas novēršanu (Higgins and Coughlan, 2014).

1.8. DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu loma cukura diabēta patoģenēzē

1.8.1. Poli(ADP-ribozes) polimerāzes aktivitāte cukura diabēta laikā

Pastiprināta PARP1 aktivitāte ir saistāma gan ar 1. tipa, gan ar 2. tipa cukura diabētu un to komplikācijām. Palielinātā glikozes koncentrācija veicina ūdeņraža peroksīda, superoksīda anjonu un peroksinitrīta veidošanos, kas ir cēlonis DNS bojājumiem. Tie savukārt aktivē PARP1 un pastiprina PAR līmeni, tādējādi izmainot gan endoteliālā ATP daudzumu, gan

piridīna nukleotīdu līmeni un NADPH (Garcia-Soriano *et al.*, 2001). Tā kā eNOS, kas atrodas vaskulārajās endotēlijā šūnās, ir atkarīga no NADPH, tad endotēlija disfunkcija diabēta gadījumā tiek saistīta ar PARP1 vadītu, atgriezenisku šūnu NADPH deficītu (Pacher and Szabo, 2005).

PARP1 pārmērīga aktivēšana var izraisīt arī motoro un sensoro nervu vadītspējas deficītu, neirovaskulāro disfunkciju un enerģijas trūkumu šūnās, kas raksturīgs perifērajai diabētiskajai neiropātijai (Obrosova *et al.*, 2004a). Patoloģiskas izmaiņas vērojamas arī, piemēram, miokardā, tīklenē, nieru garozā. PARP1 inhibitori uzrāda pozitīvu ietekmi diabētisko komplikāciju mazināšanā (Pacher *et al.*, 2002; Obrosova *et al.*, 2004b; Minchenko *et al.*, 2003). Tie spēj normalizēt diabēta izmainītos ATP, NAD⁺ un NADPH līmeņus, kā arī ne tikai novērst endotēlija disfunkcijas attīstību, bet arī atjaunot tā darbību (Soriano *et al.*, 2001).

1.8.2. Histona H2AX iesaiste cukura diabēta norisē

Palielinātu γ H2AX proteīna līmeni var novērot 1TCD attīstības laikā aizkuņģa dziedzera β -šūnās, kas norāda uz pastiprinātu DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos. Tie veicina β -šūnu disfunkciju un iekaisuma reakcijas, tādējādi piedaloties autoimunitātes veidošanā un aizkuņģa dziedzera saliņu bojāejā (Horwitz *et al.*, 2018). Līdzīgi, 2TCD laikā aizkuņģa dziedzera β -šūnās ievērojami pieaug DNS divpavedienu pārrāvumu līmenis (Tornovsky-Babeay *et al.*, 2014).

Citur organismā arī var konstatēt DNS bojājumus, piemēram, 1TCD gadījumā pacientu limfocītos hiperglikēmijas dēļ rodas brīvie radikāļi, kas izraisa oksidatīvo stresu un ietekmē DNS, kā rezultātā var novērot palielinātu fosforilētā H2AX līmeni (Giovannini *et al.*, 2014). Cilvēkiem bez cukura diabēta γ H2AX var būt noderīgs marķieris kardiometabolā riska monitorēšanai, kas saistīts ar kardiovaskulārajām slimībām (Yoon *et al.*, 2017).

1.8.3. Ksantīna oksidoreduktāzes loma cukura diabēta gadījumā

Palielināta XO aktivitāte serumā ir riska faktors 2TCD attīstībai (Li *et al.*, 2018). Diabētiskām pelēm tika novērots, ka diabēta laikā pastiprinātā superoksīda veidošanās ir saistāma ar XO aktivitātes pieaugumu plazmā, ko nodrošina palielināts XO un XDH daudzums. Palielinātā XO aktivitāte var iesaistīties diabēta vaskulāro komplikāciju patoģenēzē (Matsumoto *et al.*, 2003).

XO aktivitāte 1TCD gadījumā pieaug aknās, kuras to atbrīvo plazmā. XO saistās ar glikozaminoglikāniem pie asinsvadu sienām, izraisot lokālu oksidatīvo stresu un audu

bojājumus. Savukārt XO inhibēšana samazina oksidatīvo stresu diabēta gadījumā: XO inhibitors allopurinols novērš glutationa oksidāciju un lipoperoksidāciju cilvēkiem ar ITCD (Desco *et al.*, 2002).

Nierēs hiperglikēmija stimulē XO aktivitāti, kas ir saistīta ar palielinātu oksidatīvo stresu un iekaisumu caur NF-κB ceļa aktivēšanu, rezultējoties ar nieru bojājumiem. XO inhibēšana inaktivē NF-κB signalēšanu, kas savukārt inhibē citokīnu atbrīvošanu un iekaisuma veidošanos (Liu *et al.*, 2015).

Pacientiem īpaši izteikta ROS veidošanās ir vērojama diabētiskās perifērās neiropātijas gadījumā (skar rokas un kājas), kad serumā samazinās brīvā tiola daudzums un palielinās oksidatīvi bojātu molekulu koncentrācija, piemēram, išēmijas modificēts albumīns un AGE, kas korelē ar XO aktivitāti. Šo korelāciju var novērot arī pacientiem ar glikēto hemoglobīnu, hipertensiju un palielinātu ķermeņa masas indeksu (Miric *et al.*, 2016).

Diabēta pacientiem ir traucēts brūču dzīšanas process. Diabētisku brūču tuvumā pieaug XO aktivitāte un reizē ar to arī ROS līmenis. XOR inhibitori varētu novērst ROS pārprodukciju un mazināt urīnskābes līmeni, atjaunojot homeostāzi audos, un paātrināt brūču dzīšanas procesu (Weinsteinet *et al.*, 2015).

1.8.4. Proteolīzes enzīmu nozīme cukura diabēta gadījumā

Augstam glikozes līmenim, kāds tas ir diabēta gadījumā, ir tiešs bioloģisks efekts uz proteasomu funkcijām. Izmaiņas to darbībā ir iesaistītas CD komplikāciju patofizioloģijā. Hiperglikēmija diabēta sākuma stadijā veicina peroksinitrīta un 19S regulatorā kompleksa vadītu 26S proteasomas aktivitātes palielināšanos diabētiskos aortas, tīkles un nieru audos. Tas izraisa NF-κB ceļa aktivēšanos, kas stimulē iekaisuma reakcijas, ko var novērot gan 1. tipa, gan 2. tipa CD pacientiem. Oksidatīvais stress tīkles endotēlija šūnās palielina ubikvitīna konjugātu produkciju, kas pastiprina UPS darbību, lai nodrošinātu to degradēšanu (Liu *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2006). Insulīna deficīta gadījumā sirds muskuļos palielinās UPS veiktā proteolīze, tādējādi UPS ir iesaistīta arī diabētiskās kardiomiopātijas attīstībā (Hu *et al.*, 2008).

Cukura diabēta laikā palielinātai UPS aktivitātei ir svarīga loma skeleta muskuļu atrofijas attīstībā – var novērot pastiprinātu ekspresiju ar proteīnu degradāciju saistītiem gēniem (Lecker *et al.*, 2004). Diabētisku žurku muskuļos ir novērots palielināts imunoproteasomu daudzums (Merforth *et al.*, 2003).

Pētījumos par UPS aktivitāti diabētiskā sirdī ir atklāts, ka drīz pēc ITCD sākšanās oksidatīvais stress izraisa UPS darbības pastiprināšanos, palielinot kaspāzei līdzīgo aktivitāti,

tripsīnam līdzīgo aktivitāti un himotripsīnam līdzīgo aktivitāti, bet vēlāk, diabētam progresējot, visu trīs peptidāžu aktivitātes ievērojami samazinās. Arī ubikvitinēto proteīnu uzkrāšanās nav vērojama uzreiz pēc diabēta sākšanās. Tas norāda, ka sākotnējā proteasomu funkciju pastiprināšanās nodrošina īslaicīgu aizsardzību pret oksidatīvo stresu, bet tā tiek zaudēta ilgstoša diabēta stāvokļa dēļ. Sirds UPS darbības stimulēšana, pārekspresējot PA28 α , aizkavē sirds disfunkciju: samazinās diabēta izraisītā sirds fibroze un apoptoze (Li *et al.*, 2017).

Intracelulārās hiperglikēmijas ietekmē mikrovaskulārajās endotēlija šūnās tīklenē un nierēs palielinās reaktīvo karbonilsavienojumu metilglioksāla (MGO) un glioksāla koncentrācija, kas proteīnos veido kovalentus aduktus ar konkrētiem lizīna un arginīna atlikumiem, traucējot to funkcijām. MGO ir galvenais avots intracelulāriem AGE, kas ir saistīti ar hronisku iekaisumu, aterosklerozi un diabētisko nefropātiju. MGO kovalenti modificē 20S subvienības, samazinot proteasomālo himotripsīnam līdzīgo aktivitāti, kā arī 19S proteīnu līmeni. Tas palielina poliubikvitinētu proteīnu uzkrāšanos šūnās, traucējot to funkcijām (Queisser *et al.*, 2010). Proteīna apelinā saistība ar diabētiskās nefropātijas attīstību ir meklējama mijiedarbībā ar UPS. Nieru glomerulās atrodas šūnas podocīti, kurās apelinā ietekmē diabēta laikā samazinās proteasomu aktivitāte, kā rezultātā podocītos uzkrājas poliubikvitinēti proteīni. Tas savukārt izraisa endoplazmatiskā tīkla stresu, tādējādi stimulējot bojājumus podocītos un diabētiskās nefropātijas attīstību (Guo *et al.*, 2015). Papildus pazeminātajam proteasomu aktivitātes līmenim, diabētisku žurku nieru garozā ir samazināts PSMA6 proteīna daudzums. Tā kā proteasomu ceļš ir svarīgs šūnu ciklu kontrolējošo proteīnu, piemēram, p21WAF1/CIP1 un p27Kip1, regulācijā, PSMA6 samazinājumam varētu būt saistība ar nefropātijai raksturīgo p21WAF1/CIP1 un p27Kip1 proteīnu pieaugumu, kas izraisa mezangiālo šūnu cikla apstāšanos G1 fāzē (Li *et al.*, 2010).

Augsts glikozes līmenis aizkuņģa dziedzera saliņās samazina vairāku UPS gēnu ekspresiju, kam ir regulatoras funkcijas dažādos šūnu procesos (piemēram, Uch-L1, E6-AP, UbcH5), liecinot par UPS lomu saliņu fizioloģijā. Turpretī c-Cbl ekspresija šajos apstākļos saliņās nedaudz palielinās, jo šis proteīns veicina aktivētu tirozīnkināzes receptoru ubkvitinēšanu un internalizāciju, tādējādi pārtraucot šūnu signalēšanu. Šādi tiek ietekmēti insulīna signalēšanas ceļi β -šūnās. Proteasomu inhibēšana veicina glikozes stimulētu insulīna sekrēciju, norādot uz proteasomu lomu insulīna apritē (López-Avalos *et al.*, 2006).

1.9. Pirmā tipa cukura diabēta dzīvnieku modeļsistēmas

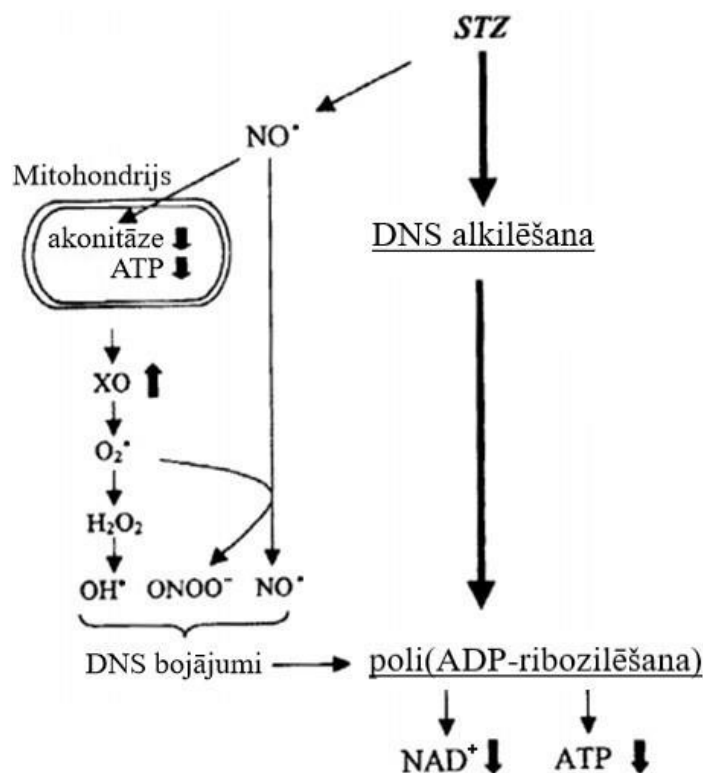
Diabēta izpētei nepieciešams pārdomāts eksperimenta dizains, lai iegūtās zināšanas būtu nodēroģas šīs slimības seku novērsānai. Pētījumos nereti jāpielieto invazīvas manipulācijas un novērojumi, ko iespējams veikt dzīvnieku modeļsistēmās, turklāt tām jāattēlo slimības patoģenēze, tās tālākā attīstība un komplikācijas. Līdz šim vēl nav izveidots tāds viens dzīvnieku modelis, kas pilnībā atspoguļotu cilvēku diabēta rašanos un komplikācijas. Plaši pielietotas ir žurku un peļu modeļsistēmas. Cukura diabētu dzīvniekiem var izraisīt ķīmiski, ķirurģiski un ar ģenētiskām/imunoloģiskām manipulācijām. Ķīmiskai cukura diabēta izraisīšanai visbiežāk izmanto STZ vai aloksānu, kas ir citotoksiski glikozes analogi. Ar šiem savienojumiem var izraisīt gan 1. tipa, gan 2. tipa CD, tomēr pārsvarā tos lieto 1TCD izsāukšanai, jo tie nevar tieši inducēt insulīna rezistenci (Radenković *et al.*, 2016).

Kaut arī abu vielu citotoksicitāte tiek sasnieģta pa dažādiem ceļiem, to selektīvā iedarbība uz β -šūnām ir vienāda. Aptuveni 30 min pēc aloksāna injicēšanas palielinās insulīna un samazinās glikozes līmenis, izraisot īslaicīģu hipoglikēmiju, kāda nav novērojama pēc STZ ievadīšanas. Nākamās 2–4 h abi savienojumi, inhibējot insulīna sekrēciju, izraisa asins glikozes koncentrācijas palielināšanos un insulīna samazināšanos. Šajā laikā β -šūnās ir vērojams samazināts Goldži aparāta laukums, intracelulāra vakuolizācija, samazināts insulīna daudzums, graudainā endoplazmatiskā tīkla dilatācija un piebrieduši mitohondriji. Tad 4–8 h pēc injekcijas seko vairāku stundu hipoglikēmija, kas var izraisīt pat dzīvnieka nāvi. Vēlāk glikozes līmenis atkal ceļas un par diabēta sākumu uzskata paliekošu hiperglikēmiju, kas parādās 48 stundas pēc STZ un aloksāna ievadīšanas. Tajā laikā ir vērojama pilnģga β -šūnu deģranulācija un integritātes zudums (Lenzen, 2008). Tālāk ir aprakstģti STZ un aloksāna citotoksiskās ietekmes mehānismi.

1.9.1. Streptozotocģna modelis

Streptozotocģns (2-deoksi-2-(3-metil-3-nitrozourģnvielas)-1-D-glikopiranoze) ir dabā sastopams antibakterģals savienojums, kuru producē augsnes baktģrijas *Streptomyces achromogenes*. Tas ir hidroģils, relatģvi stabģls aptuveni stundu +37 °C temperatūrā pie pH 7,4. Gan zģdģtāģju, gan baktģriju šūnās STZ inhibē DNS sintģzi (Reusser, 1971; Lenzen, 2008).

STZ ir glikozes analogs – tā molekulā esošā glikozes daģa pieļauj STZ transportu caur plazmas membrānā esošo glikozes transportģtāģproteģnu 2 (*glucose transporter 2*, GLUT2). Tādēģģdi STZ var selektģvi uzkrāties aizkuņģa dziedzera β -šūnās. Insulģnu producģjošām šūnām, kuras neekspresē GLUT2, STZ toksicitāte ir zema (Elsner *et al.*, 2000; Schnedl *et al.*, 1994). STZ citotoksiskās darbģbas princģps ir parāģģts 1.9. attēlā.



1.9. attēls. Streptozotocīna inducētu toksisko reakciju mehānismi žurku aizkuņģa dziedzera β -šūnās. ATP – adenozīna trifosfāts; H_2O_2 – ūdeņraža peroksīds; NO^\bullet – slāpekļa oksīds; O_2^\bullet – superoksīda radikālis; OH^\bullet – hidroksilradikālis; ONOO^- – peroksinitrīts; NAD^+ – oksidētais nikotīnamīda adenīna dinukleotīds; STZ – streptozotocīns; XO – ksantīna oksidāze (adaptēts no Szkudelski 2001).

Galvenais STZ inducētās β -šūnu nāves mehānisms ir DNS alkilēšana, ko nodrošina STZ molekulas *N*-metil-*N*-nitrozourīnvielas daļa (Elsner *et al.*, 2000). Nonākot β -šūnās, STZ metilē DNS, kas ir viens no izplatītākajiem alkilēšanas veidiem. Šajā reakcijā veidojas 7-metilguanīns, O^6 -metilguanīns, 3-metiladenīns un 7-metiladenīns, un rodas DNS pārrāvumi. DNS fragmentācija aktivē PARP, tam seko NAD^+ līmeņa samazināšanās aizkuņģa dziedzera saliņu šūnās, ietekmējot to funkcijas, tai skaitā proinsulīna sintezēšanu, kas ir zīmīgs diabēta izveidošanās rādītājs (Bennett and Pegg 1981, Yamamoto *et al.*, 1981). Turklāt NAD^+ līmeņa krišanās samazina ATP daudzumu, bet šāda šūnas enerģijas rezervju iztukšošana izraisa β -šūnu nekrozi – ir vērojama palielināta membrānu caurlaidība un nenotiek hromatīna kondensēšanās (Burkart *et al.*, 1999). PARP inhibitoriem, piemēram, nikotīnamīdam un pikolīnamīdam, ir atgriezenisks efekts uz NAD^+ līmeņa samazināšanos un proinsulīna sintēzes inhibēšanu (Yamamoto *et al.*, 1981).

No otras puses, STZ citotoksiskajam efektam ir saistība arī ar slāpekļa oksīdu (NO^\bullet), ko tas var atbrīvot no savas nitrozo daļas. NO^\bullet β -šūnās stimulē guanilātciklāzi, mijiedarbojoties ar tās hēma dzelzs atomu, un veicina cikliskā 3',5'-guanozīnmonofosfāta (cGMP) uzkrāšanos.

NO[•] mijiedarbojas arī ar mitohondriālās akonitāzes dzelzs-sēra centriem un inhibē tās aktivitāti, tādējādi traucējot šūnas elpošanu (Turk *et al.*, 1993). Pastiprinātā ATP defosforilācija nodrošina hipoksantīnu kā substrātu ksantīna oksidāzei, kuru tā oksidē par urīnskābi. Hipoksantīna metabolisms ietver ūdeņraža peroksīda dismutēšanu, kuras laikā izdalās superoksīda radikālis (O₂[•]) un hidroksilradikālis (OH[•]). NO[•] un brīvie radikāļi var izraisīt DNS bojājumus, gan darbojoties atsevišķi, gan kopā veidojot toksisko peroksinitrītu (ONOO⁻) (Nukatsuka *et al.*, 1990; Szkudelski, 2001). Turklāt β-šūnas ir īpaši jutīgas pret bojājumiem, ko izraisa NO[•] un brīvie radikāļi, jo tajās ir zems brīvo radikāļu savācējenzīmu līmenis, tādu kā katalāze un glutaciona peroksidāze (Spinas, 1999).

Vēl viens mehānisms, kas raksturo STZ diabetogēno darbību, ir STZ spēja inhibēt β-šūnu enzīmu O-saistīto N-acetilglikozamīna (O-GlcNAc)-selektīvo N-acetil-β-D-glikozaminidāzi (O-GlcNAcāzi). Šis enzīms ir noslēdzošais O-glikozilēšanas ceļā β-šūnās un nošķeļ O-GlcNAc no proteīniem. STZ ir GlcNAc analogs, tāpēc tā mērķis ir O-GlcNAcāzes aktīvais saits. Šis enzīms konvertē STZ par savienojumu, kas līdzinās dabīgajam liganda pārejas stāvoklim, bet ir enerģētiski stabilāks. Konvertētais STZ savienojums tiek katabolizēts lēnāk, tāpēc tas izkonkurē O-GlcNAc substrātu aktīvajā saitā, izraisot enzīma inhibīciju. Rezultātā STZ ietekmē β-šūnās uzkrājas O-glikozilēti proteīni, turklāt STZ inducētā O-glikozilēšana ir neatgriezeniska gan *in vitro*, gan *in vivo*. β-šūnas satur vairāk O-GlcNAc transferāzi, salīdzinot ar citām šūnām, un tas ir vēl viens faktors, kas padara β-šūnas īpaši jutīgas pret STZ (Kondar *et al.*, 2001; Toleman *et al.*, 2006).

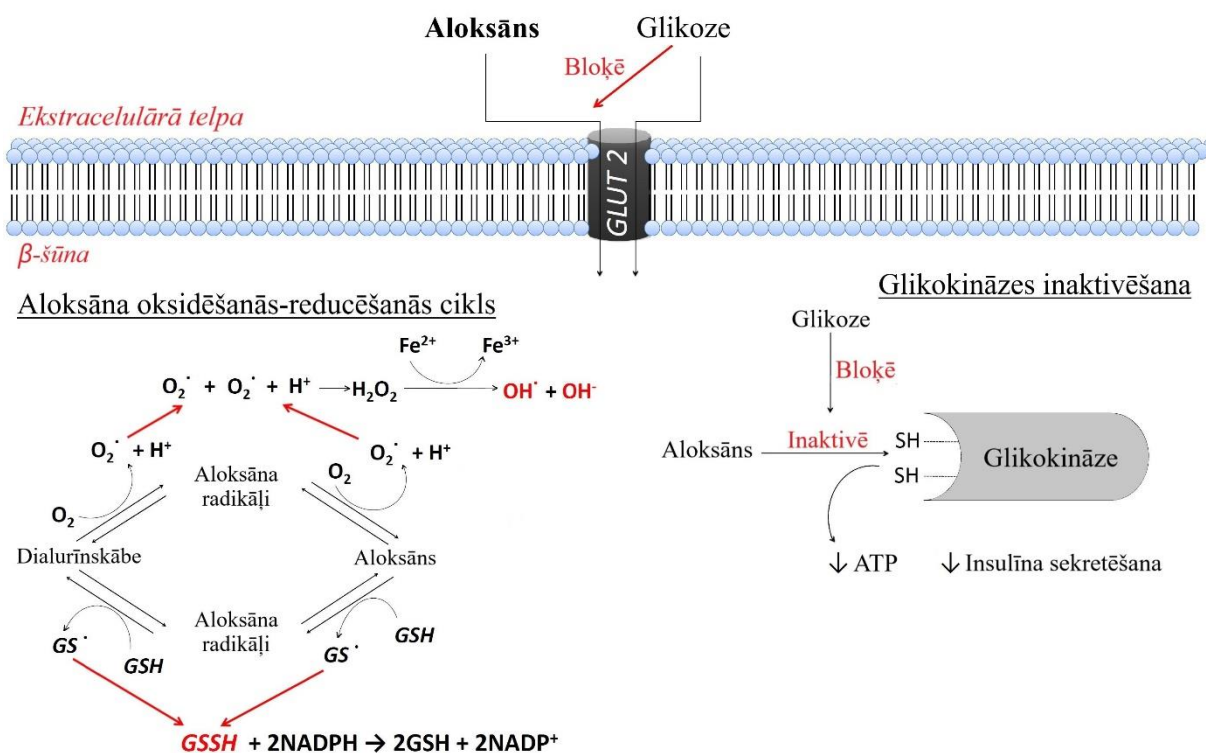
Kopš STZ diabetogēnās iedarbības atklāšanas 1963. gadā, to lieto cukura diabēta izraisīšanai dažādiem eksperimenta dzīvniekiem, tai skaitā žurkām, pelēm, pērtiķiem u.c. (Rerup, 1970). Žurkām to parasti ievada kā vienu lielu devu (50–100 mg/kg), izsaucot toksiskas izcelsmes diabētu ar nopietnu insulīna deficītu, vai kā vairākas nelielas devas, kas diabētu izraisa pakāpeniskāk un tam ir drīzāk autoimūna izcelsme (Islas-Andrade *et al.*, 2000).

1.9.2. Aloksāna modelis

Aloksāns (2,4,5,6-tetraoksipirimidīns) ir pirimidīnu atvasinājums, kas tika uzsynetēts 1838. gadā, oksidējot urīnskābi. Tas ir hidrofilis, ķīmiski nestabils savienojums ar pussabrukšanas periodu 1,5 min +37 °C temperatūrā pie pH 7,4. Aloksāna spēju izraisīt diabētu konstatēja 1943. gadā. Dzīvniekiem bija vērojami tipiski cilvēku diabēta simptomi – ketonūrija, ketonēmija, polidipsija, poliūrija, svara zudums, hiperglikēmija, glikozūrija (Lenzen 2008; Lenzen *et al.*, 1991).

Būdams glikozes analogs, aloksāns aizkuņģa dziedzerī selektīvi uzkrājas β-šūnās, nonākot tajās caur zemas afinitātes GLUT2 glikozes transportieri. Glikoze spēj inhibēt šo procesu, darbojoties kā konkurents uz transportieri. Tā kā aloksānam ir īss pussabrukšanas periods, fizioloģiskā vidē 5 min laikā sadalās ap 90 % vielas un tā kļūst netoksiska β-šūnām. Tāpēc diabēta izraisīšanai aloksānam šūnās jānonāk 5 min laikā (Gorus *et al.*, 1982; Elsner *et al.*, 2002).

Aloksāna darbības mehānisms, kas rezultējas ar β-šūnu nekrozi, ir parādīts 1.10. attēlā.



DNS bojājumi

1.10. attēls. Aloksāna darbības mehānisms β-šūnās. ATP – adenoīna trifosfāts; GLUT2 – glikozes transportētājproteīns 2; GS[•] – glutations radikālis; GSH – glutations; GSSG – oksidēts glutations; H₂O₂ – ūdeņraža peroksīds; NADPH – nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāts; O₂^{•-} – superoksīda radikālis; OH[•] – hidroksilradikālis; OH⁻ – hidroksiljons; SH – sulfhidril grupa (adaptēts no Radenković *et al.*, 2016).

β-šūnās notiek aloksāna oksidēšanās-reducēšanās cikls, kura laikā rodas brīvie radikāļi. Tripeptīds glutations (GSH) reducē aloksānu par dialurīnskābi. Šajā reakcijā no GSH rodas glutations radikālis (GS[•]), kas savstarpēji veido oksidētu glutationu (GSSG). Savukārt dialurīnskābe O₂ klātbūtnē var pašoksidēties par aloksāna radikāļiem, kas pārveidojas atpakaļ par aloksānu. Procesa laikā no O₂ rodas superoksīda radikāļi, un veidojas arī H₂O₂. Tālāk Hābera-Veisa reakcijā pārneses metāla, visbiežāk Fe²⁺, klātbūtnē no H₂O₂ veidojas hidroksilradikāļi. Tā kā GSH konkurē ar O₂ par aloksāna radikāļiem, tad tas var inhibēt

pašoksidāciju (Winterbourn and Munday, 1989). Līdzīgi kā STZ gadījumā, hidroksilradikāļi bojā β -šūnu DNS, tādējādi aktivējot PARP, kas samazina intracelulārā NAD^+ līmeni un inhibē proinsulīna sintēzi. Tiols un brīvo radikāļu savācēji var pasargāt šūnas no aloksāna diabetogēnās iedarbības (Yamamoto *et al.*, 1981).

Otrais aloksāna citotoksiskuma veids izpaužas, inhibējot glikokināzi (heksokināzi IV) – β -šūnu glikozes sensoru, enzīmu, kas ir nozīmīgs glikozes inducēta insulīna sekrēcijā. Aloksāns reaģē ar divām blakus esošām sulfhidril (SH) grupām, kas atrodas aizkuņģa dziedzera β -šūnu glikokināzes cukura saistīšanās saitā, veidojot disulfīdu saites. Rezultātā notiek atgriezeniska enzīma inaktivēšana un aloksāna reducēšanās par dialurātu (Lenzen *et al.*, 1988). Glikokināzes inhibēšana samazina glikozes oksidēšanu un ATP ģenerēšanu, nomācot ATP signālu, kuram būtu jāaktivizē insulīna sekrēcija (Lenzen 2008). Glikoze var kavēt aloksāna piekļuvi SH grupām, saistoties glikokināzes cukura saistīšanas saitā (Lenzen *et al.*, 1988).

Aloksāna ietekmē β -šūnu citosolā palielinās brīvā Ca^{2+} līmenis (Kim *et al.*, 1994). Tas ir saistīts ar aloksāna spēju depolarizēt šūnu membrānas (Dean and Matthews, 1972). Tajās atveras kalcija kanāli, kas veicina Ca^{2+} nokļūšanu šūnās no ekstracelulārā šķidrums. Palielinās arī Ca^{2+} mobilizācija no intracelulārajām rezervēm, savukārt tā izkļūšana no citoplazmas ir ierobežota (Szkudelski, 2001). Palielinātais Ca^{2+} līmenis aizsāk reakciju virkni, kas inducē DNS pārrāvumu veidošanos (Kim *et al.*, 1994).

Cukura diabēta izraisīšanai žurkām visbiežāk aloksānu izmanto intravenozi devā 65 mg/kg vai intraperitoneāli – devā 150 mg/kg. Devas lielums atkarīgs ne tikai no dzīvnieka sugas un ievadīšanas veida, bet arī no tā, vai dzīvnieki ir ēduši vai neēduši – pēdējā variantā tie ir uzņēmīgāki pret diabēta ierosināšanu. Cilvēka aizkuņģa dziedzera saliņas nav tik jutīgas pret aloksānu, salīdzinot ar pelēm un žurkām (Szkudelski, 2001).

1.10. Tat proteīns

Arī citu slimību izraisītāji ir saistīti ar oksidatīvā stresa radītiem DNS divpavedienu pārrāvumiem, piemēram, cilvēka imūndeficīta vīruss 1 (*human immunodeficiency virus 1*, HIV-1). DNS pārrāvumi un to reparācija nodrošina vīrusa DNS integrēšanu saimniekorganisma genomā (Tachiwana *et al.*, 2006). Turklāt HIV-pozitīviem pacientiem ir pavājināta antioksidantu aizsardzības sistēma, salīdzinot ar veseliem cilvēkiem, kas kavē oksidatīvā stresa novēršanu (Allard *et al.*, 1998). Ar HIV-1 saistītie DNS bojājumi var izraisīt genoma nestabilitāti, kas var novest pie mutācijām un hromosomu translokācijām (El-Amine *et al.*, 2018).

HIV-1 gadījumā viens no oksidatīvā stresa avotiem ir HIV-1 vīrusu replikācijas trans-aktivators (Tat) proteīns (Price *et al.*, 2005). Tat ir iesaistīts HIV-1 transkripcijā un vīrusa replikācijā, kas notiek divos galvenajos šūnu tipos, ko inficē HIV-1: CD4⁺ T šūnās un monocītos/makrofāgos (Rice *et al.*, 2017).

Tat inducē ROS producēšanu, aktivējot NADPH un spermīna oksidāzes, kas ir citotoksiskā ūdeņraža peroksīda avots, kā arī samazinot poliamīna spermīna daudzumu, kas ir nepieciešams normālai šūnu funkcionēšanai un augšanai (Capone *et al.*, 2013). Tat var tieši iedarboties uz mitohondrijiem un izraisīt mitohondriju transmembrānu potenciāla samazināšanos un citohroma c atbrīvošanu. Izolētos sirds, aknu un smadzeņu mitohondrijos Tat izraisa to uzbriešanu; samazinās mitohondriju veiktā oksidācija. Tat inhibē citohroma c oksidāzi, kas ir viens no galvenajiem oksidatīvās fosforilācijas regulēšanas saitēm un katalizē noslēguma fāzi mitohondriālajā elektronu pārnesei ķēdē (Lecoeur *et al.*, 2012).

Vēl viens veids, kā Tat var inducēt oksidatīvo stresu, ir antioksidantu mehānismu kavēšana, piemēram, samazinot antioksidanta glutaciona daudzumu. Tas veicina NF- κ B aktivēšanu, kas vēl vairāk palielina oksidatīvo stresu un stimulē DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos. ROS var oksidēt arī tādas šūnu molekulas kā proteīni un lipīdi, tādējādi ietekmējot signālu kaskādi, kas regulē dažādus šūnu procesus – augšanu, diferencēšanos un apoptozi. Turklāt Tat var iekļūt šūnu tipos, ko neskar HIV-1, piemēram, B-šūnās (El-Amine *et al.*, 2018). HIV-1 inficētās šūnas sekretē Tat proteīnu; tas cirkulē HIV pozitīvu cilvēku asinsritē un savu strukturālo īpašību dēļ šķērso B-šūnu membrānu. Šūnās Tat aktivē *AICDA* gēnu, kas kodē AID (aktivēšanas inducēta citidīna deamināze). Šis proteīns nonāk pie imunoglobulīna smagās ķēdes (*IGH*) gēna lokusa, kas HIV pozitīviem pacientiem izteiktāk kolokalizē ar proto-onkogēnu *MYC*, kurš kodē šūnas cikla progresijā un apoptozē iesaistītu kodola fosfoproteīnu. Kolokalizācijas vietās vienlaicīgi notiek DNS divpavedienu bojājumi. Tiem sekojoša nehomologā DNS pavedienu galu savienošana izraisa hromosomu translokāciju, kas noved pie Burkita limfomas attīstības (Sall *et al.*, 2019).

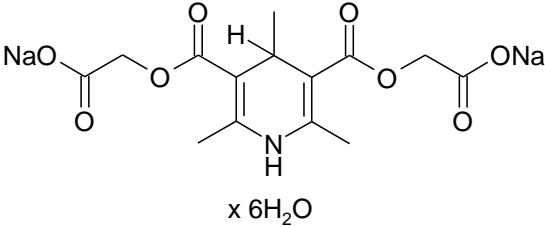
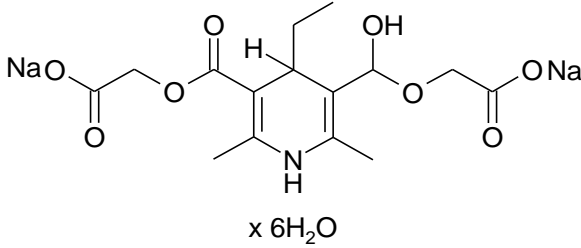
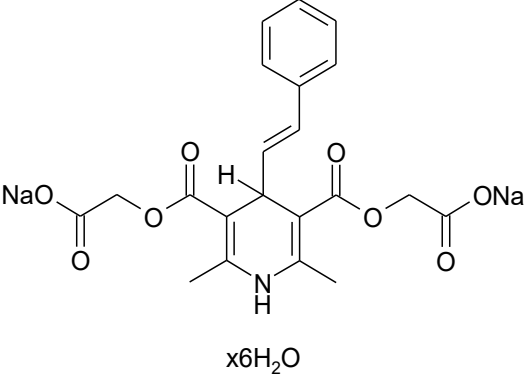
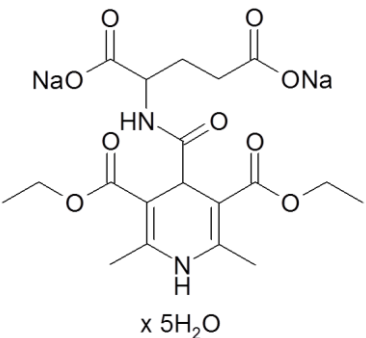
Veselu donoru izolētu B-šūnu inkubēšana kopā ar Tat proteīnu ir pietiekama, lai tajās izraisītu DNS divpavedienu pārrāvumus, ko var konstatēt pēc γ H2AX klātbūtnes. Antioksidanti, tai skaitā uz mitohondrijiem mērķēti savienojumi, spēj samazināt gan ROS līmeni, gan DNS pārrāvumu līmeni, kas norāda, ka Tat veicina genomisko nestabilitāti, inducējot mitohondriālo ROS veidošanos (El-Amine *et al.*, 2018). 1,4-DHP atvasinājumi ir uzrādījuši gan antioksidatīvas aktivitātes, gan mitohondriotropiskas īpašības (Velena *et al.*, 2016). Tiem varētu piemist potenciāls mazināt Tat izraisītu DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos.

2. MATERIĀLI UN METODES

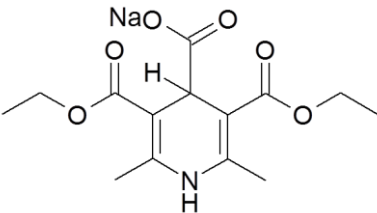
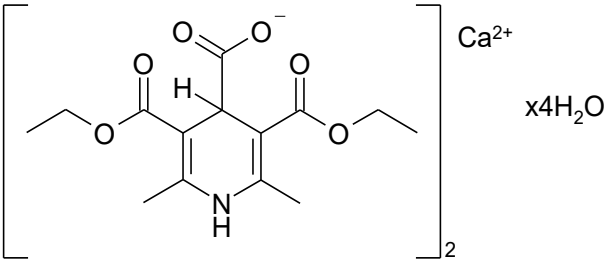
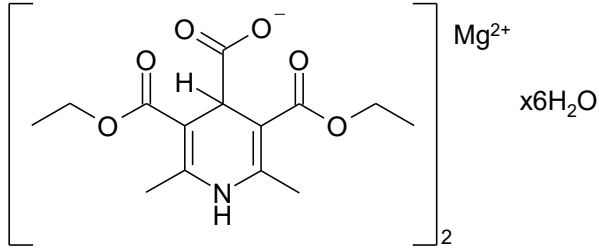
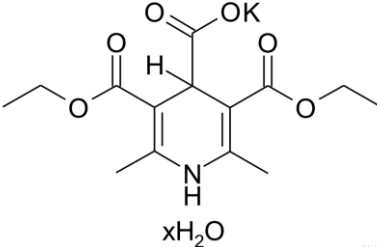
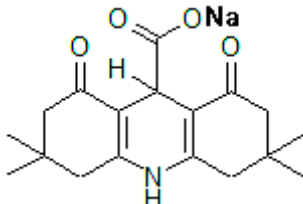
2.1. Izmantotās vielas

Darbā izmantotos 1,4-DHP atvasinājumus nodrošināja LOSI. To struktūrformulas ir atainotas 2.1. tabulā.

2.1. tabula. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu struktūrformulas.

Savienojums	Struktūrformula	Molekulārais svars (g/mol)
Metkarbatons Dinātrija-2,4,6-trimetil-1,4-dihidropiridīna-3,5-biskarboniloksiacetāta heksahidrāts		479,34
Etkarbatons Dinātrija-4-etil-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridīna-3,5-biskarboniloksiacetāta heksahidrāts		493,37
J-9-125 Dinātrija-2,6-dimetil-4-stiril-1,4-dihidropiridīna-3,5-biskarboniloksiacetāta heksahidrāts		567,50
Glutapirons 2-(2,6-dimetil-3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidropiridil-4-karboksamido)glutārskābes dinātrija sāls pentahidrāts		542,50

2.1. tabula (turpinājums). 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu struktūrformulas.

Savienojums	Struktūrformula	Molekulārais svars (g/mol)
AV-153-Na 2,6-dimetil-3,5- dietoksikarbonil-1,4- dihidroizonikotīnskābes nātrija sāls		319,30
AV-153-Ca 2,6-dimetil-3,5- dietoksikarbonil-1,4- dihidroizonikotīnskābes kalcija sāls tetrahidrāts		704,77
AV-153-Mg 2,6-dimetil-3,5- dietoksikarbonil-1,4- dihidroizonikotīnskābes magnija sāls heksahidrāts		724,99
AV-153-K 2,6-dimetil-3,5- dietoksikarbonil-1,4- dihidroizonikotīnskābes kālija sāls monohidrāts		353,40
PP-544-Na 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10- dekahidroakridīn-1,8- dion-9-karbonskābes nātrija sāls		403,40

Reaģenti hloroforms, izopropanols, nātrija hlorīds, mononātrija fosfāts (NaH₂PO₄), dinātrija fosfāts (Na₂HPO₄), nātrija dodecilsulfāts, glicerīns, kālija acetāts, Tris-HCl, etīdija bromīds, Tween 80, TRI reaģents, agaroze, 10 % neitrāli buferēts formalīna šķīdums bija iegādāti no *Sigma-Aldrich*, Vācija. Creamiskās piestas bija no SIA Arbor, Latvija. Nātrija hidroksīds, 96 % etanols bija piegādāti no SIA ENOLA, Latvija. Šķidrās slāpekļs bija

iepirkts no SIA AGA, Latvija. Ar DEPC apstrādātais ūdens, RNS paraugu attīrīšanas komplekts (*RapidOut DNA Removal Kit*), reversās transkripcijas komplekts (*RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit*) bija iegādāti no *Thermo Scientific*, ASV. Kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas reaģentu maisījums (*SYBR® Green PCR Master Mix*) bija iegādāts no *Applied Biosystems*, ASV. Praimerus piegādāja *Metabion international AG*, Vācija. Plastmasas mēģenes (15 ml, 1,5 ml), automātisko pipešu uzgaļi (0,1–1000 µl) bija iepirkti no *Sarstedt*, Vācija. Reaktīvus un materiālus imūnhistoķīmijas pētījumam iepirka no SIA Diamedika, Latvija. Antivielas proteīnu ekspresijas noteikšanai iegādājās no *Abcam*, Lielbritānija: truša poliklonālā PARP1 antiviela (*AbCam*, ab6079), truša monoklonālā anti-šķeltā PARP1 antiviela (*AbCam*, ab32651) un truša poliklonālā γ H2AX antiviela (*AbCam*, ab11175). Priekšmetstikliņi un segstikliņi bija no *Biosigma*, Itālija. *EnVision* reaģents bija no DAKO, *Glostrup*, Dānija. Darbam ar B-limfocītiem izmantotie reaģenti bija *Pancoll* (*PAN Biotech*, Vācija), *B-cell isolation kit II* (*Macs Milteny Biotec*, Vācija), RPMI barotne (*Life Technologies*, Lielbritānija), karstuma inaktivēts fetālais teļa serums (FCS, *Life Technologies*, Lielbritānija), penicilīns/streptomicīns (*Life Technologies*, Lielbritānija), Tat proteīns (*Ablinc*, ASV), 4 % paraformaldehīds (*Euromedex*, Francija), liellopu seruma albumīns (BSA, *Life Technologies*, Lielbritānija), fosfāta buferis (PBS, *Life Technologies*, Lielbritānija), DAPI vide (*Vector laboratories*, ASV). Izmantotās antivielas: CD19 (*Biolegend*, ASV), CD3 (*BD Pharmigen*, ASV), peles monoklonālās antivielas pret γ H2AX (*phospho Ser139 H2AX*, *Active Motif*, ASV), anti-truša sekundārās antivielas ar *Alexa Fluor-488* (*Life Technologies*, Lielbritānija).

Darba veikšanai izmantotas šādas iekārtas: transiluminators *BioSpectrumAC Imaging System* (*UVP*, Kanāda), centrifūga *Sigma 3-16K* (*Sigma Laborzentrifugen GmbH*, *Ostrode am Harz*, Vācija), spektrofotometrs *BioPhotometer* (*Eppendorf*, Vācija), līdzstrāvas devējs (*PowerPac Basic*, *Bio-Rad*, ASV), elektroforēzes kamera (MSCHOISE, *Cleaver Scientific Ltd.*), *StepOne™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, ASV), laminārās plūsmas skapis *Esco Airstream Max Class II Biological Safety Cabinet* (*Esco Technologies, Inc.*, ASV), TCS SP8 konfokālais mikroskops (*Leica Microsystems*, Vācija).

2.2. Eksperimentā izmantotie dzīvnieki

Pētījumā izmantoja pieaugušus *Wistar* līnijas balto žurku tēviņus ar svaru 200–250 g. Dzīvniekus piegādāja no Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas (Rīga, Latvija). Darbā tika ievērotas vadlīnijas no Eiropas Savienības direktīvas 2010/63/EU un Ministru kabineta 2001. gada 23. oktobra noteikumiem Nr. 450 „Eksperimentos un

zinātniskos nolūkos izmantojamo dzīvnieku turēšanas, izmantošanas, tirdzniecības un nogalināšanas kārtība”. Tika saņemta Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja dzīvnieku izmantošanai izmēģinājumos (1. pielikums).

Eksperimenti ar dzīvniekiem noritēja no 2012. līdz 2013. gadam Kronvalda bulvārī 4 (toreizējā LU Bioloģijas fakultāte). Pēc dzīvnieku pārvešanas uz eksperimenta telpām tos izmitināja atbilstošos, laboratorijas žurkām paredzētos būros, kā arī noteica septiņu dienu adaptācijas periodu. Telpā uzturēja $+22,0 \pm 0,5$ °C gaisa temperatūra un ievēroja 12 stundu gaismas-tumsas ciklu. Visā dzīvnieku turēšanas laikā tos baroja *ad libitum* ar žurkām piemērotu laboratorijas barību (“Tukuma Straume”, Latvija), un tiem bija neierobežota piekļuve dzeramajam ūdenim.

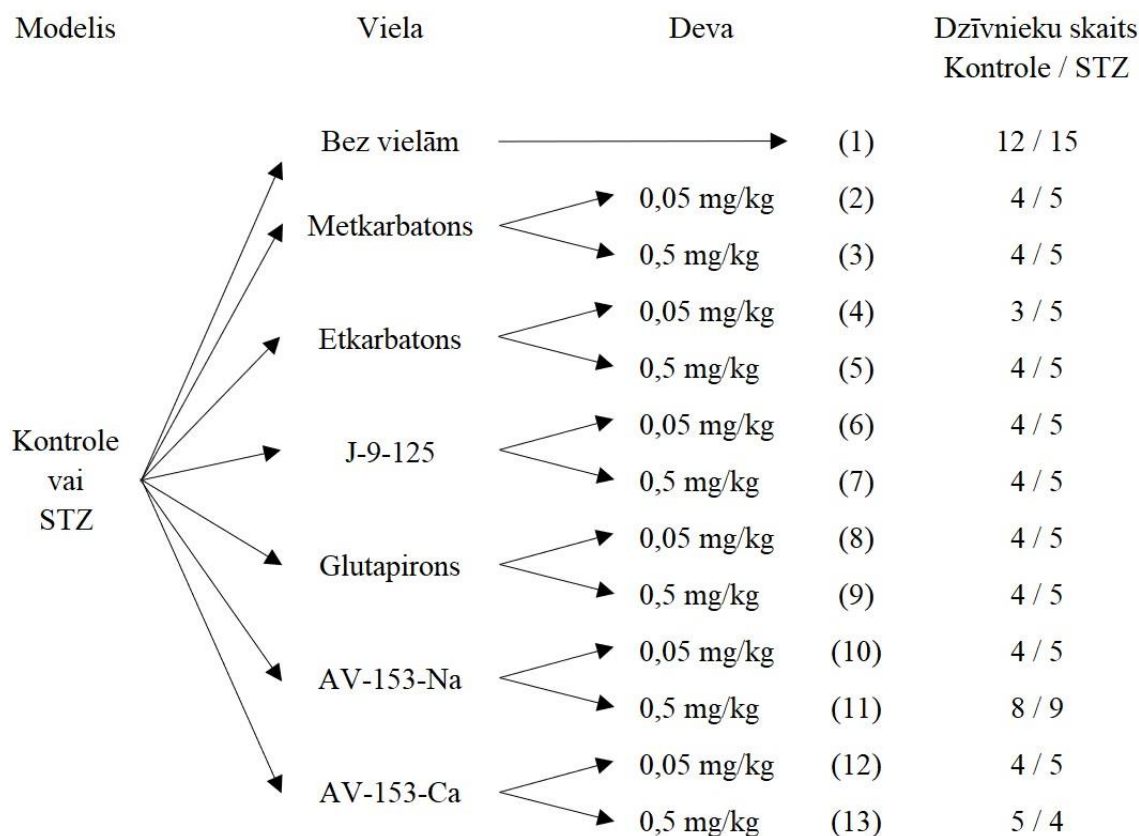
2.3. Eksperimenta dizains

Pirmā tipa CD izraisīšanai izmantoja STZ un aloksānu, kas abi ir toksiski glikozes analogi insulīnu producējošajām aizkuņģa dziedzera β -šūnu saliņām (Lenzen, 2008). Tas ļāva salīdzināt dažādu modeļu ietekmi uz gēnu ekspresiju.

2.3.1. Streptozotocīna modelis

Žurkām izraisīja 1. tipa cukura diabētu, vienu reizi injicējot astes vēnā 0,20–0,25 ml STZ (50 mg/kg), ko tieši pirms manipulācijas atšķaidīja 10 mM citrāta buferī (pH 4,5). Žurkas 12 h pirms STZ injicēšanas nebaroja, bet tās varēja brīvi piekļūt ūdenim. Kontroles grupai astes vēnā injicēja 0,20 ml 10 mM citrāta buferi. Žurkām 48 h pēc manipulācijas no astes vēnas paņēma perifēro asiņu paraugu, kurā izmērīja glikozes līmeni. Tālāko pētījumu veica ar žurkām, kurām glikozes līmenis bija virs 13,89 mmol/l. Korekcijas ar insulīna injekcijām neveica.

Žurkas sadalīja divās lielās grupās: vienā no tām bija veseli dzīvnieki, bet otrā – dzīvnieki ar STZ izraisīto cukura diabētu. Devītajā dienā pēc STZ injekcijas katru no lielajām grupām sadalīja 13 apakšgrupās (2.1. att.), kur vienai ar mākslīgās barošanas adatu trīs dienas pēc kārtas vienu reizi dienā ievadīja *per os* ūdeni, bet 12 grupām ievadīja *per os* kādu no sešiem dažādiem 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem: metkarbatonu, etkarbatonu, glutapironu, J-9-125, AV-153-Na vai AV-153-Ca, kas atšķaidīti 0,9 % NaCl.



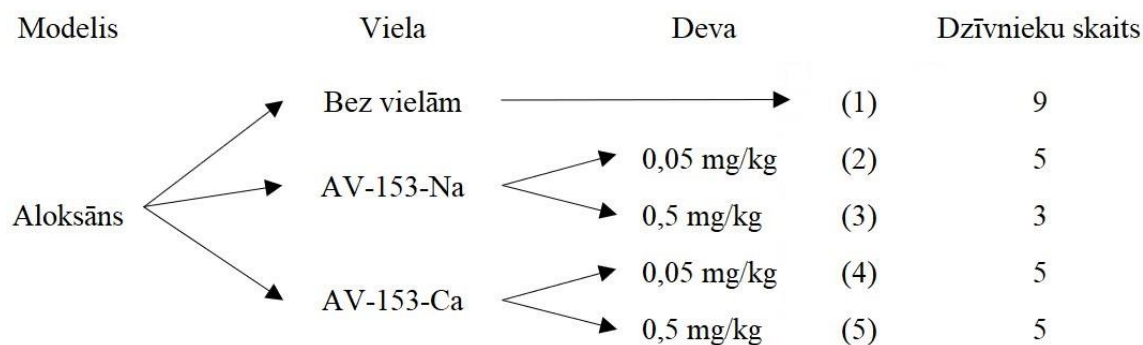
2.1. attēls. Streptozotocīna diabēta modeļa grupu izveides shēma. STZ – streptozotocīns.

Visus 1,4-DHP atvasinājumus izmantoja divās koncentrācijās – 0,05 mg/kg un 0,5 mg/kg.

2.3.2. Aloksāna modelis

Žurkām 1. tipa CD izraisīja ar aloksāna injekciju subkutāni (110 mg/kg, šķaidīts 0,9 % NaCl šķīdumā). Žurkas 24 h pirms aloksāna injekcijas nebaroja, bet tām bija brīva piekļuve ūdenim. Žurkām 48 h pēc manipulācijas no astes vēnas paņēma perifēro asiņu paraugu, kurā izmērīja glikozes līmeni. Tālāko pētījumu veica ar žurkām, kurām glikozes līmenis bija virs 13,89 mmol/l. Korekcijas ar insulīna injekcijām neveica.

Devītajā dienā pēc aloksāna injekcijas žurkas sadalīja piecās grupās (2.2. att.).



2.2. attēls. Aloksāna diabēta modeļa grupu izveides shēma.

Vienai grupai trīs dienas pēc kārtas vienu reizi dienā ievadīja *per os* ūdeni, bet cetrām ievadīja *per os* AV-153-Na vai AV-153-Ca. Abiem 1,4-DHP atvasinājumiem izmantoja divas koncentrācijas – 0,05 mg/kg un 0,5 mg/kg.

2.4. RNS izdalīšana un cDNS sintēze

Pētījuma beigās žurkas dekapitēja, izmantojot četrnažu giljotīnu, un no tām tika paņemtas un šķidrā slāpekļī sasaldētas nierēs, aknas un asinis. Nieres un aknas ir pakļautas diabētisko komplikāciju attīstības riskam (American Diabetes Association, 2014), bet diabēta pacientu asinīs ir vērojams pastiprināts oksidatīvais stress (Francescato *et al.*, 2014).

Sasaldētos audus un asinis saberza keramikas pietā kopā ar šķidro slāpekli. Mēģenē ar TRI reaģentu (1 ml uz 0,1 g audu vai 5 ml uz 1 ml asiņu), kas bija stundu inkubēta +60 °C, iebēra 0,5 g audu vai 1,5 ml saberzto asiņu, vorteksēja 15 s, inkubēja 5 min +60 °C, nedaudz vorteksēja un centrifugēja 4500 apgriezieni/minūtē 30 min +4 °C (asins paraugus necentrifugēja, bet uzreiz pievienoja 2 ml hloroformu un turpināja kā ar audu paraugiem). Dzidro slāni pārvietoja jaunā mēģenē, inkubēja istabas temperatūrā 5 min, pievienoja 0,2 ml hloroforma uz 1 ml TRI reaģenta, vorteksēja 15 s, inkubēja 10 min istabas temperatūrā un centrifugēja 4500 apgriezieni/minūtē 30 min +4 °C. Augšējo dzidro slāni pārnesa jaunā mēģenē un audu paraugiem pievienoja 3 ml izopropanola, bet asins paraugiem pievienoja 5 ml izopropanola. Paraugus vorteksēja 15 s, inkubēja 10 min istabas temperatūrā un centrifugēja 4500 apgriezieni/minūtē 30 min +4 °C. Supernatantu izlēja, nogulsnēm pievienoja 10 ml 75 % etanola, vorteksēja 15 s un centrifugēja 4500 apgriezieni/minūtē 15 min +4 °C. Supernatantu nolēja, nogulsnes žāvēja un izšķīdināja 100 µl ar DEPC apstrādātā ūdenī. RNS attīrīšanai no DNS piemaisījumiem izmantoja *RapidOut DNA Removal Kit* pēc ražotāja norādījumiem. RNS kvalitātes pārbaudei izmantoja elektroforēzi 1 % agarozes gēlā, savukārt kvantitāti un tūrbības pakāpi noteica ar spektrofotometru, šķaidot RNS fosfātu buferī (1 M Na₂HPO₄, 1 M NaH₂PO₄, pH 8; atšķaidīts 1:1000 nukleāžu brīvā ūdenī). Tālākā darbā analizēja paraugus, kuriem absorbcijas attiecība A260/A280 bija 1,9 līdz 2,1.

No 5 µg nieru un aknu RNS un no 2 µg asins RNS sintezēja cDNS, izmantojot *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* ar randomizētu heksamēru praimeriem pēc ražotāja norādījumiem. Tās kvalitāti pārbaudīja ar elektroforēzi 1 % agarozes gēlā.

2.5. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija

Gēnu ekspresijas noteikšanai izmantoja *SYBR® Green PCR Master Mix* pēc ražotāja norādījumiem. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas veica ar *StepOne™ Real-Time PCR*

System šādos apstākļos: viens cikls +95 °C 10 min un 40 cikli +95 °C 15 s, +60 °C 1 min. Amplifikācijas produktu specifiskumu pārbaudīja ar disociācijas līkni: +95 °C 15 s, +60 °C 1 min un +95 °C 15 s. Rezultātus analizēja ar relatīvās kvantitēšanas jeb 2^{-ΔCT} metodi (*StepOne* programmatūra, *Applied Biosystems*, versija 2.1) un attēloja relatīvajās vienībās (RV). Praimeru dizainēšanai izmantoja *NCBI/Primer-BLAST* programmu. Praimeru sekvenču *Parp1* gēnam: tiešais praimeris 5'-CGGAGAGGCTTTACCGAGTG-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-GAACATGGGTGACTGCACCA-3', sagaidāmā produkta garums 119 bp; *H2ax* gēnam: tiešais praimeris 5'-CGGTTTGTCTCCTGGCGTTT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-ACATCGTGTGCGAGGTAGAA-3', sagaidāmā produkta garums 50 bp; *Xdh* gēnam: tiešais praimeris 5'-CGGACCCTGAAACAACACTT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-CAAGCAGGCATTGACAGAAA-3', sagaidāmā produkta garums 164 bp; *Psm3* gēnam: tiešais praimeris 5'-CACCATCCTCTGGTGTCCATT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-CGCAGATATCCTCAATTACCCAAC-3', sagaidāmā produkta garums 128 bp; *Psm6* gēnam: tiešais praimeris 5'-GTGTGCGCTACGGGGTGTA-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-AGTCACGGTGCTGGAATCCA-3', sagaidāmā produkta garums 247 bp; *Psm5* gēnam: tiešais praimeris 5'-AGGTGCCTACATTGCTTCCC-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-GAGATGCGTTCCTTGTTGCG-3', sagaidāmā produkta garums 159 bp; *Psm6* gēnam: tiešais praimeris 5'-TACATTGGGGAAAGCGCTCG-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-TCAGAAAACCGACGACCACC-3', sagaidāmā produkta garums 116 bp. RNS polimerāzi II izmantoja kā references gēnu (Sokolovska *et al.*, 2011): tiešais praimeris 5'-GCCAGAGTCTCCCATGTGTT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-GTCGGTGGGACTCTGTTTGT-3', sagaidāmā produkta garums 135 bp.

2.6. Imūnhistoķīmija

Proteīnu ekspresijas noteikšanai kontroles un STZ diabēta modeļa dzīvniekos izmantoja imūnhistoķīmijas metodi (Di Stefano *et al.*, 2002). PARP1, c-PARP1 un γH2AX proteīnu līmeni noteica žurku nierēs, sirdī, acīs un sēžas nervos. Šie orgāni ir pakļauti diabētisko komplikāciju attīstības riskam (American Diabetes Association, 2014).

Pēc žurku dekapitēšanas imūnhistoķīmiskajam pētījumam paredzētos audus un orgānus ievietoja 10 % neitrāli buferētā formalīna šķīdumā, kur tos fiksēja vismaz 48 stundas. Pēc tam audus atūdeņoja un ieguldīja parafīnā. Tos sagrieza 4 mikronus biezus griezumus ar rotācijas mikrotomu un pārnesa uz priekšmetstikliņiem, kas klāti ar polilizīnu. Histoloģiskos griezumus žāvēja termostatā diennakti +36 °C temperatūrā. Pirms imūnhistoķīmiskās krāsošanas paraugus deparafinizēja, tos secīgi ievietojot šķīdumos: ksilolā I (10 min), ksilolā II (5 min),

96 % spirtā I (3 min), 96 % spirtā II (3 min), 70 % spirtā I (3 min), 70 % spirtā II (3 min). Tad audu paraugus skaloja divas reizes destilētā ūdenī un trešajā reizē atstāja destilētajā ūdenī uz 5 min. Antigēna demaskēšanai izmantoja 20 min karsēšanu mikroviļņu krāsnī 300 W, inkubējot nātrija citrāta buferī pH=6,0. Paraugus trīs reizes skaloja Tris bufera sāls (TBS) šķīdumā. Endogēnās peroksidāzes aktivitātes nomākšanai izmantoja 0,5 % H₂O₂ 10 min. Tad paraugus atkārtoti skaloja TBS šķīdumā un inkubēja proteīnu bloka reaģentā buļļa kazeīnā 10 min. Paraugus 1 h inkubēja ar primārajām antivielām: truša poliklonālo PARP1 antivielu (atšķaidījums 1:200), truša monoklonālo anti-šķelto PARP1 antivielu (atšķaidījums 1:200) un truša poliklonālo γ H2AX antivielu (atšķaidījums 1:500). Pēc tam griezumus skaloja TBS buferī un piesaistītās antivielas parādīja, inkubējot paraugus 30 min istabas temperatūrā ar *EnVision* reaģentu. Paraugus skaloja ar TBS un veica 7 min vizualizācijas reakciju ar 3,3'-diaminobenzidīnu, kas veido brūnu gala produktu antivielas saistīšanās vietā. Šūnu kodolus krāsoja ar hematoksilīnu un paraugus analizēja 400x palielinājumā, nosakot šūnu skaitu uz vienu kvadrātmilimetru.

2.7. B-limfocītu apstrāde ar Tat proteīnu un 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem

Asins paraugus ieguva no veselīgiem donoriem *Etablissement Français du Sang, Saint-Louis* slimnīcā, Parīzē, Francijā, atbilstoši Francijas likumiem un *Agence Nationale de Sécurité du Médicament* (2016-A01316-45), ar informētu piekrišanu.

Perifēro asiņu mononukleārās šūnas izolēja no asinīm ar *Pancoll* blīvuma gradienta centrifugēšanu. B-limfocītus attīrīja ar negatīvo selekciju, izmantojot *B-cell isolation kit II*. Tīrību pārbaudīja, krāsojot ar CD19 un CD3, un tam sekojošu fluorescences aktivēto šūnu šķirošanas analīzi (FACS). B-limfocītus kultivēja 10⁶ šūnas/ml RPMI barotnē, kas papildināta ar 10 % FCS un 1 % penicilīnu/streptomicīnu, +37 °C, 5 % CO₂. Šūnas sešas stundas transficēja ar attīrītu rekombinantu Tat proteīnu 250 ng/ml. Vienlaicīgi šūnas tika apstrādātas ar 1,4-DHP atvasinājumiem dažādās koncentrācijās (5–500 nM): AV-153-Na, AV-153-Ca, AV-153-Mg, AV-153-K, metkarbatonu, J-9-125, glutapironu un PP-544-Na.

B-limfocītus izsēja uz 15x15 mm segstikliņiem, kas pārklāti ar poli-L-lizīnu, 20 min, +37 °C, 5 % CO₂. Tālāko procesu veica istabas temperatūrā. Šūnas mazgāja ar 0,3X PBS un fiksēja 10 min ar 4 % paraformaldehīdu, kas atšķaidīts ar 0,3X PBS. Tad trīs reizes mazgāja ar 1X PBS. Šūnas bloķēja 40 min ar 0,5 % BSA, kas atšķaidīts ar 1X PBS. Imunokrāsošanu veica 2 h ar peles monoklonālajām antivielām pret γ H2AX (atšķaidījums 1:500). Tad šūnas trīs reizes mazgāja ar 1X PBS un inkubēja 1h ar anti-truša sekundārajām antivielām ar *Alexa*

Fluor-488 (atšķaidījums 1:200). Segstikliņus pievienoja priekšmetstikliņiem ar DAPI vidi. Attēlu iegūšanai izmantoja TCS SP8 konfokālo mikroskopu ar 63X eļļas imersijas objektīvu (El-Amine *et al.*, 2018).

2.8. Datu statistiskā apstrāde

Datu apkopošanu un statistisko analīzi veica ar *Microsoft Excel* (*Microsoft*, ASV) un *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software Inc.*, ASV) datorprogrammām. Izmantojot Šapiro-Vilka (*Shapiro-Wilk*) testu, pārlicinājās par datu atbilstību normālsadalījumam.

Proteīnu un gēnu ekspresijas datu analizēšanā kontroles grupu un STZ vai aloksāna grupu bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem salīdzināja, izmantojot nepāra T-testu, kas paredzēts divu nesaistītu grupu salīdzināšanai.

Kontroļu un STZ vai aloksāna grupas, kurām deva 1,4-DHP atvasinājumus (2.1. un 2.2. att.), salīdzināja ar attiecīgajām neārstētajām grupām, izmantojot divvirzienu dispersijas analīzes (*analysis of variance*, ANOVA) testu ar Daneta multiplo salīdzinājumu pēctestu (salīdzina gadījuma grupas ar kontroles grupu). Divvirzienu ANOVA testu lieto, ja ir vismaz divas lielās kategorijas (kontrolē un modelis) un katrā no tām ir vismaz trīs apakškategorijas (neārstētā grupa un ārstētās grupas).

Analīzēs, kur AV-153-Na bija tikai vienā koncentrācijā (0,5 mg/kg), ekspresijas datu salīdzināšanai izmantoja vienvirziena ANOVA testu ar Sidaka multiplo salīdzinājumu pēctestu (salīdzina testā norādītus pārus). Vienvirziena ANOVA testu lieto, lai savstarpēji salīdzinātu trīs vai vairāk grupas.

Rezultātus pēc B-limfocītu apstrādes analizēja, izmantojot vienvirziena ANOVA testu ar Daneta multiplo salīdzinājumu pēctestu. Kontroles grupu salīdzināja ar Tat grupu bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem, izmantojot nepāra T-testu.

Rezultātus pieņēma par statistiski ticamiem, ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$; programmatūra p vērtības uzrādīja ar četriem cipariem aiz komata. Datus no gēnu ekspresijas pētījuma attēloja relatīvajās vienībās (RV), no proteīnu ekspresijas pētījuma – kā antigēnus ekspresējošo šūnu skaitu uz vienu kvadrātmilimetru, bet no *in vivo* eksperimenta – kā γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu procentuālo daudzumu paraugos. Ir uzrādīta vidējā aritmētiskā vērtība un vidējās aritmētiskās vērtības standartnovirze (*standard deviation*, SD).

3. REZULTĀTI

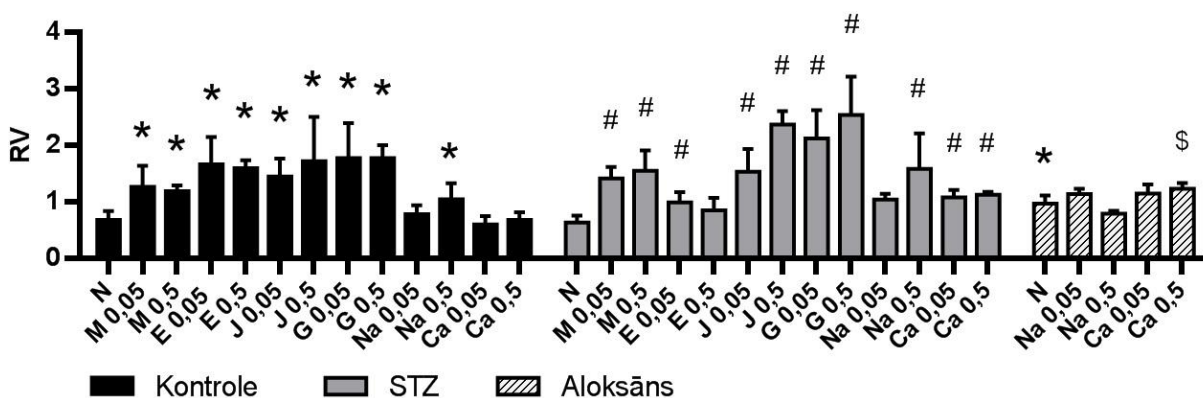
3.1. DNS reparācijas un proteolīzes enzīmu ekspresijas izmaiņas žurkās 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē cukura diabēta modeļos

1,4-DHP atvasinājumu ietekmi uz *Parp1*, *H2ax*, *Xdh*, *Psm3*, *Psm6*, *Psm5* un *Psmc6* gēnu ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Citotoksiskos glikozes analogus STZ un aloksānu visbiežāk izmanto ķīmiskai 1. tipa cukura diabēta izraisīšanai (Lenzen, 2008). Šajā eksperimentā varējām salīdzināt abu modeļu ietekmi uz gēnu ekspresiju. PARP1, c-PARP1 un γ H2AX proteīnu ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un STZ modeļa žurku nierēs, sirdī, acīs un nervos. Visus minētos orgānus var skart diabētiskās komplikācijas (American Diabetes Association, 2014).

3.1.1. *Parp1* gēna ekspresija

Parp1 gēna ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 2., 3., un 4. pielikumā.

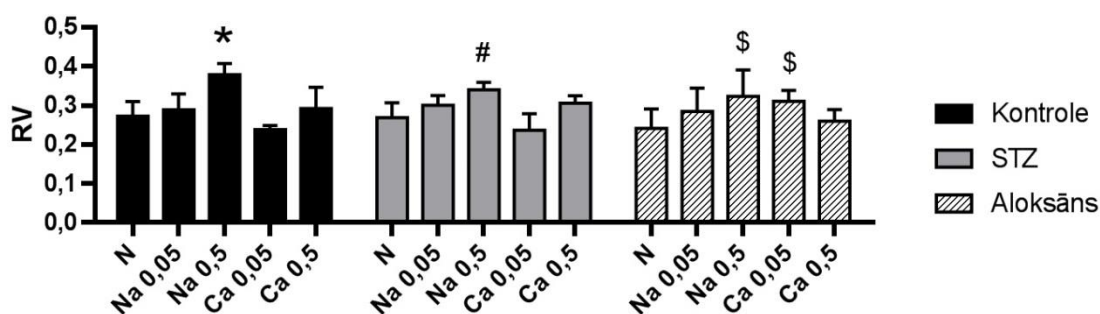
Cukura diabēta izraisīšana ar STZ statistiski ticami neietekmēja *Parp1* gēna ekspresijas līmeni žurku nierēs, bet aloksāns to statistiski ticami palielināja ($p=1,10 \times 10^{-3}$; 3.1. att.).



3.1. attēls. *Parp1* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapijons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

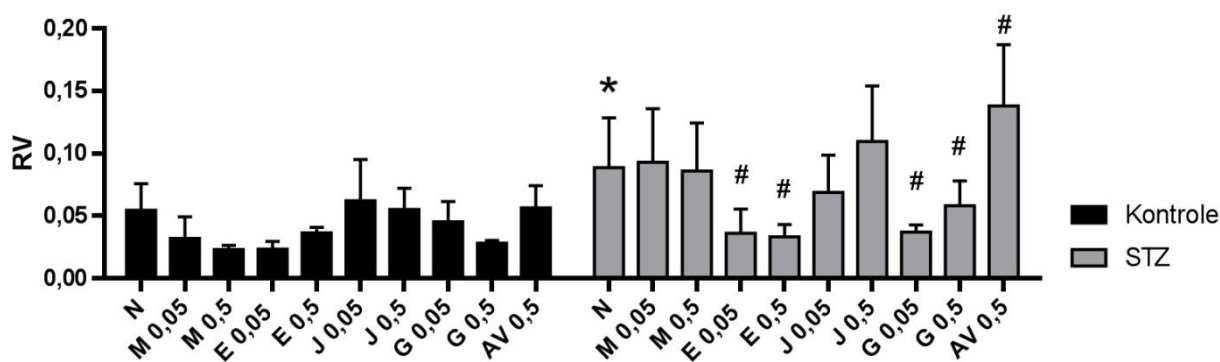
Kontroles grupu nierēs *Parp1* ekspresiju statistiski ticami palielināja visi aplūkoti 1,4-DHP atvasinājumi, izņemot AV-153-Ca: metkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=1,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=6,00 \times 10^{-4}$), etkarbatons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), J-9-125 (deva 0,05 mg/kg: $p=7,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), glutapirons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$) un AV-153-Na (deva 0,5 mg/kg: $p=3,81 \times 10^{-2}$). STZ grupu nierēs, līdzīgi kā kontroles grupās, *Parp1* ekspresiju statistiski ticami palielināja visi apskatītie savienojumi – metkarbatons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=5,60 \times 10^{-3}$), J-9-125 (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), glutapirons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), AV-153-Na (deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$) un AV-153-Ca (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$). Aloksāna grupās žurku nierēs no diviem apskatītajiem savienojumiem ekspresiju statistiski ticami palielināja tikai AV-153-Ca lielākajā devā ($p=5,60 \times 10^{-3}$).

Žurku aknās diabēta izraisīšana statistiski ticami neietekmēja *Parp1* gēna ekspresiju (3.2. att.). AV-153-Na izmantošana lielākajā devā statistiski ticami palielināja *Parp1* ekspresiju visās trīs grupās (kontrolē: $p=1,00 \times 10^{-3}$; STZ: $p=9,40 \times 10^{-3}$; aloksāns: $p=1,22 \times 10^{-2}$), bet aloksāna grupā to statistiski ticami paaugstināja arī AV-153-Ca mazākajā devā ($p=5,60 \times 10^{-3}$).



3.2. attēls. *Parp1* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Asinīs gēnu ekspresija tika noteikta STZ diabēta modelī, kur tā bija statistiski ticami paaugstināta, salīdzinot ar kontroli ($p=2,13 \times 10^{-2}$; 3.3. att.).



3.3. attēls. *Parp1* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

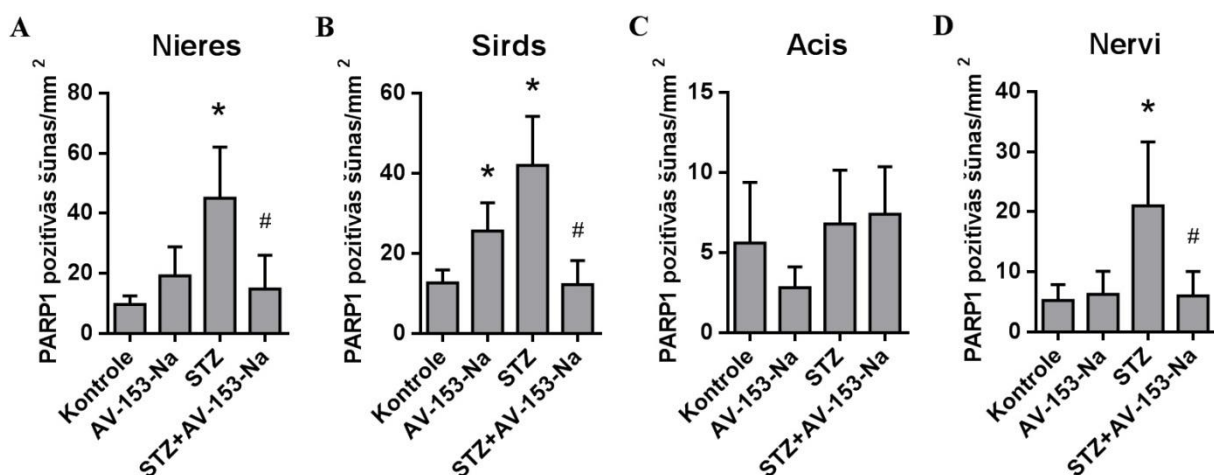
Kontroles grupās 1,4-DHP atvasinājumu izmantošana *Parp1* gēna ekspresiju statistiski ticami neietekmēja. STZ grupās asinīs *Parp1* ekspresiju statistiski ticami samazināja etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p = 1,70 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p = 1,00 \times 10^{-3}$) un glutapirons (deva 0,05 mg/kg: $p = 1,90 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p = 4,10 \times 10^{-2}$), savukārt AV-153-Na to vēl vairāk palielināja (deva 0,5 mg/kg: $p = 1,90 \times 10^{-2}$).

3.1.2. PARP1 proteīna ekspresija

PARP1 proteīna ekspresijas līmeni noteicām AV-153-Na ietekmē žurku nierēs, sirdī, acīs un nervos kontroles grupās un STZ izraisīta diabēta modelī. PARP1 proteīna ekspresiju analizējām tikai AV-153-Na ietekmē, jo šis savienojums ir visvairāk pētītais 1,4-DHP atvasinājums mūsu darba grupā. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas 5. pielikumā.

Nierēs PARP1 ekspresiju varēja novērot proksimālajos un distālajos nieru kanālīšos, nieru kamoliņos un asinsvadu sienīnās. Pēc STZ inducēta diabēta PARP1 pozitīvo šūnu līmenis statistiski ticami paaugstinājās ($p = 1,80 \times 10^{-3}$; 3.4. A att.). AV-153-Na to statistiski ticami samazināja ($p = 1,40 \times 10^{-3}$).

Sirds audos PARP1 ekspresija galvenokārt bija vērojama kardiomiocītu citoplazmā un endotēlija šūnās. Diabēta izraisīšana statistiski ticami palielināja PARP1 ekspresiju ($p = 8,00 \times 10^{-4}$; 3.4. B att.). Kontrolēs grupā AV-153-Na to statistiski ticami paaugstināja ($p = 3,70 \times 10^{-2}$), bet diabēta gadījumā – samazināja līdz kontroles līmenim ($p < 1,00 \times 10^{-4}$).



3.4. attēls. PARP1 proteīna ekspresija žurku (A) nierēs, (B) sirdī, (C) acīs un (D) nervos AV-153-Na ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. AV-153-Na koncentrācija – 0,5 mg/kg. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles grupu bez apstrādes ar AV-153-Na; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ grupu bez apstrādes ar AV-153-Na.

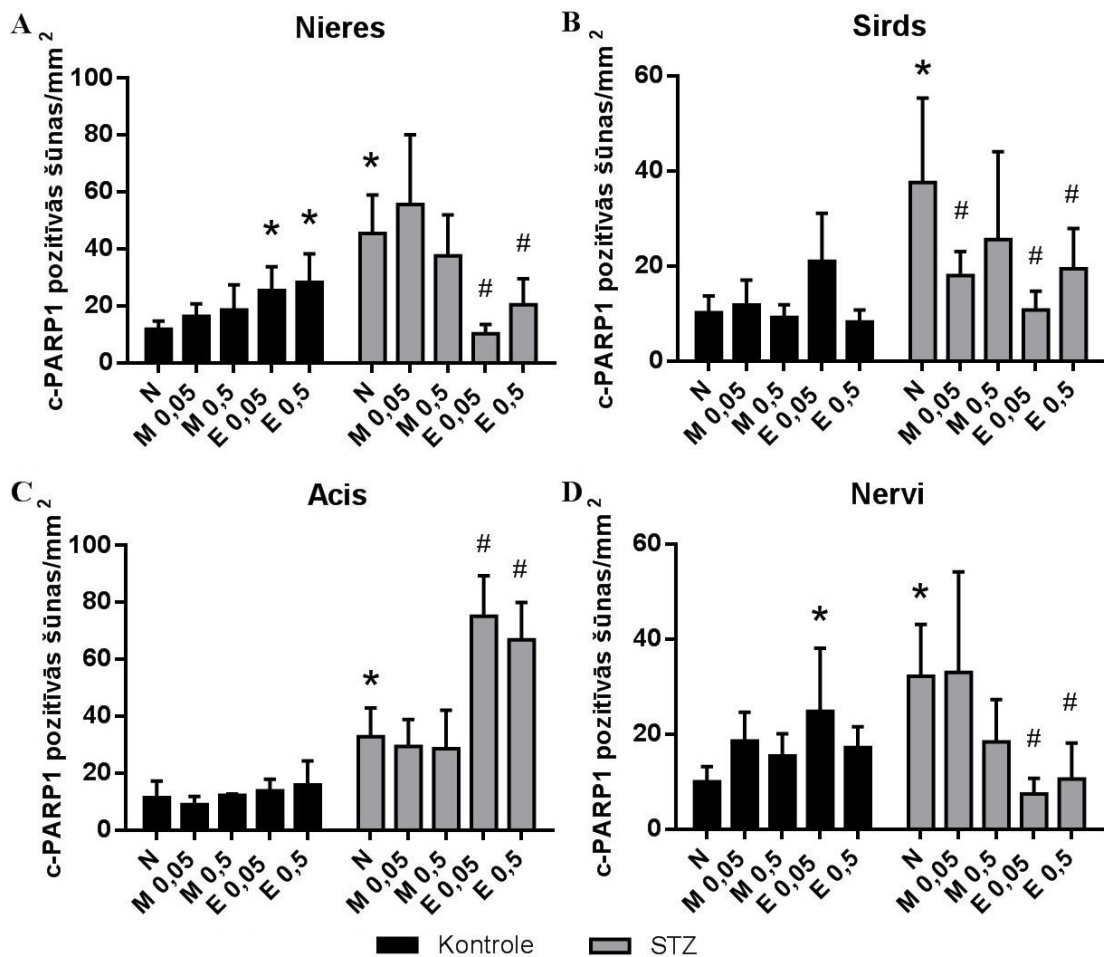
Acs audos cukura diabēta izraisīšana ar STZ statistiski ticami neizmainīja PARP1 proteīna ekspresijas līmeni (3.4. C att.). AV-153-Na to statistiski ticami neietekmēja ne kontroles, ne STZ grupā.

Nervu audos PARP1 proteīna ekspresija bija vērojama Švāna šūnās. Pēc diabēta izraisīšanas PARP1 proteīna ekspresija statistiski ticami palielinājās ($p = 2,80 \times 10^{-2}$; 3.4. D att.). AV-153-Na to statistiski ticami samazināja līdz kontroles līmenim ($p = 9,60 \times 10^{-3}$).

3.1.3. Šķeltā PARP1 proteīna ekspresija

Šķeltais PARP1 proteīns ir jutīgs apoptozes marķieris (Soldani and Scovassi, 2002). Tā ekspresiju analizējām metkarbatona un etkarbatona ietekmē žurku nierēs, sirdī, acīs un nervos kontroles grupās un STZ izraisīta diabēta modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas 6. pielikumā.

Nieru audos c-PARP1 ekspresija bija novērota proksimālajos un distālajos nieru kanālīšos, kā arī atsevišķās iekaisuma šūnās stromā un asinsvadu sienīnā. STZ inducēta diabēta gadījumā c-PARP1 ekspresija statistiski ticami palielinājās ($p = 6,00 \times 10^{-4}$; 3.5. A att.). Ārstēšana ar metkarbatonu statistiski ticami neietekmēja c-PARP1 ekspresiju ne kontroles grupās, ne STZ grupās. Savukārt etkarbatons to statistiski ticami palielināja kontroles grupās (deva 0,05 mg/kg: $p = 3,96 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p = 1,27 \times 10^{-2}$), bet statistiski ticami samazināja STZ grupās (deva 0,05 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p = 3,00 \times 10^{-4}$).



3.5. attēls. c-PARP1 proteīna ekspresija žurku (A) nierēs, (B) sirdī, (C) acīs un (D) nervos metkarbatona un etkarbatona ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

Sirds audos c-PARP1 ekspresija bija novērota kardiomiocītos, atsevišķās iekaisuma šūnās sirds interstīcijā un ap asinsvadiem. Diabēta izraisīšana to statistiski ticami pastiprināja ($p = 9,60 \times 10^{-3}$; 3.5. B att.). Diabēta grupās c-PARP1 ekspresiju statistiski ticami samazināja metkarbatons mazākajā devā ($p = 1,81 \times 10^{-2}$) un etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p = 3,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p = 9,80 \times 10^{-3}$). Kontroles grupās ekspresija bija bez statistiski ticamām izmaiņām.

Acis audos c-PARP1 ekspresija STZ inducēta diabēta laikā statistiski ticami pastiprinājās ($p = 3,30 \times 10^{-3}$; 3.5. C att.). Metkarbatons statistiski ticami neietekmēja c-PARP1 ekspresiju, bet etkarbatons to vēl vairāk stimulēja diabēta grupās (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$).

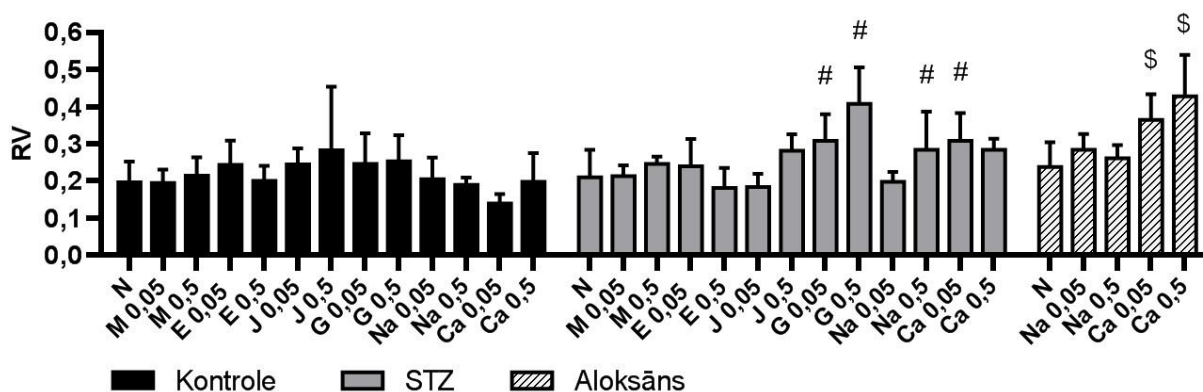
Nervu audos c-PARP1 ekspresija bija novērota Švāna šūnās un iekaisuma šūnās ap nervu apvalkiem. Diabēta izraisīšana statistiski ticami paaugstināja c-PARP1 ekspresiju

($p=2,40 \times 10^{-3}$; 3.5. D att.). Etkarbatons to statistiski ticami palielināja kontroles grupā mazākajā devā ($p=1,51 \times 10^{-2}$) un statistiski ticami samazināja STZ grupās (deva 0,05 mg/kg: $p=1,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=6,00 \times 10^{-4}$), bet metkarbatons ekspresiju statistiski ticami neizmainīja.

3.1.4. *H2ax* gēna ekspresija

H2ax gēna ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 7., 8., un 9. pielikumā.

Žurku nierēs ar STZ izraisītu cukura diabētu statistiski ticami nemainījās *H2ax* gēna ekspresija; arī aloksāns to statistiski ticami neietekmēja (3.6. att.).

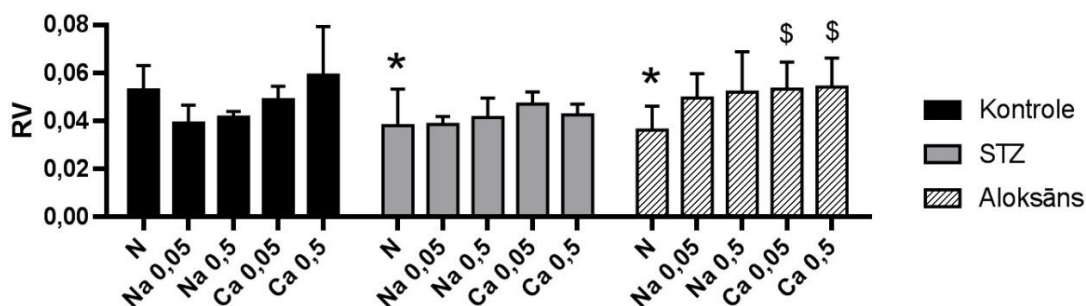


3.6. attēls. *H2ax* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Kontroles grupās nierēs apstrāde ar 1,4-DHP atvasinājumiem statistiski ticami neietekmēja *H2ax* ekspresiju, savukārt STZ grupās to statistiski ticami palielināja glutapirons (deva 0,05 mg/kg: $p=3,38 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), AV-153-Na lielākajā devā ($p=3,54 \times 10^{-2}$) un AV-153-Ca mazākajā devā ($p=1,54 \times 10^{-2}$). Aloksāna grupās *H2ax* ekspresiju statistiski ticami paaugstināja AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg: $p=7,20 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$).

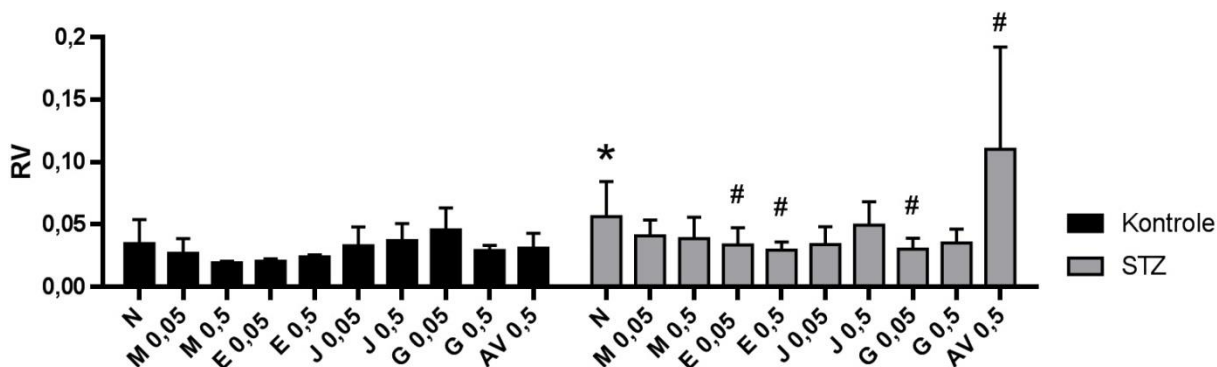
Žurku aknās diabēta izraisīšana statistiski ticami samazināja *H2ax* gēna ekspresiju (STZ: $p=3,77 \times 10^{-2}$; aloksāns: $p=2,90 \times 10^{-3}$; 3.7. att.). AV-153-Ca to statistiski ticami

palielināja aloksāna grupās (deva 0,05 mg/kg: $p=2,39 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=1,73 \times 10^{-2}$). Savukārt AV-153-Na neradīja statistiski ticami izmaiņas nevienā no pētīto žurku grupām aknās.



3.7. attēls. *H2ax* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Asinīs pēc STZ inducēta diabēta *H2ax* ekspresija statistiski ticami palielinājās ($p=3,27 \times 10^{-2}$; 3.8. att.).



3.8. attēls. *H2ax* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

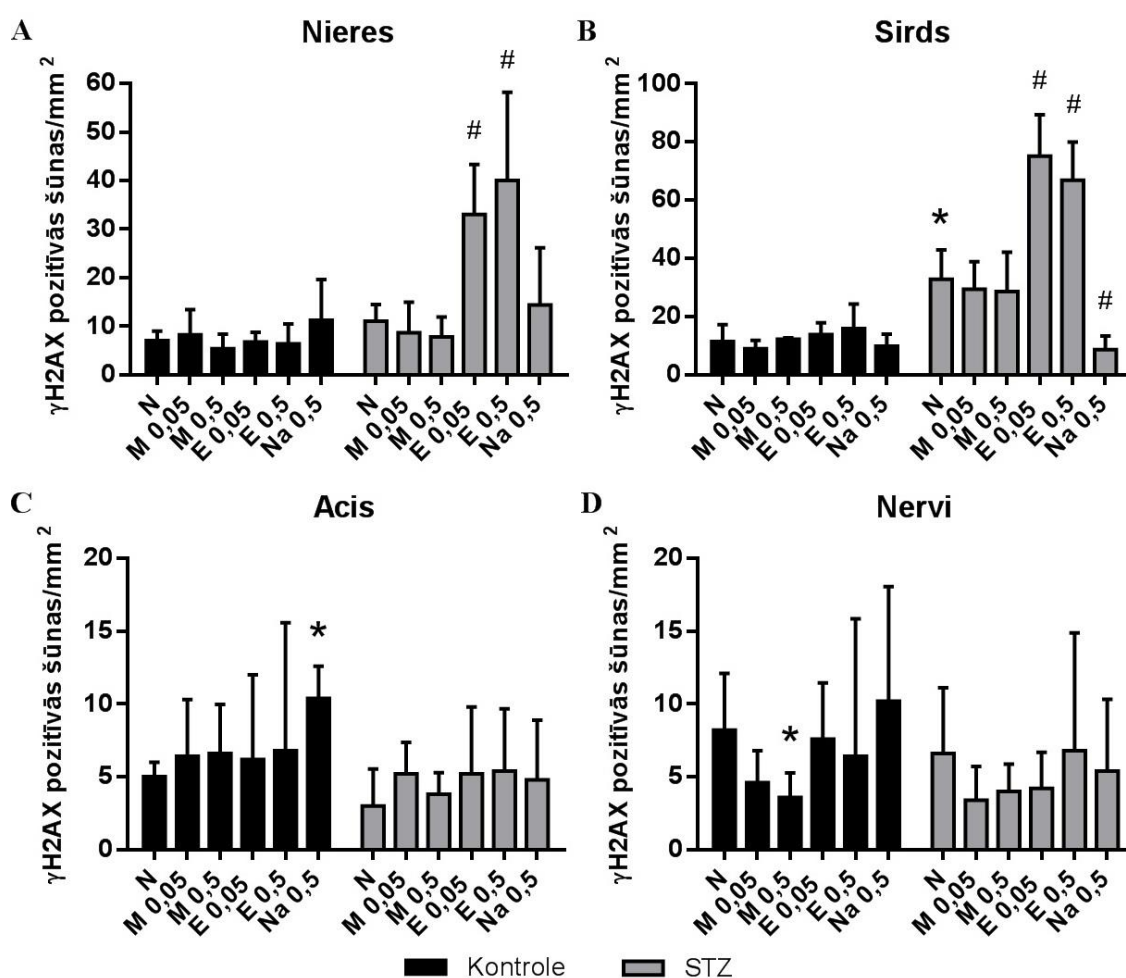
Kontroles grupās asinīs 1,4-DHP atvasinājumu ievadīšana statistiski ticami neizmainīja *H2ax* ekspresiju. STZ grupu asinīs to statistiski ticami samazināja etkarbatons (deva

0,05 mg/kg: $p=4,05 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=3,28 \times 10^{-2}$) un glutapirons mazākajā devā ($p=4,31 \times 10^{-2}$), bet palielināja AV-153-Na ($p=1,27 \times 10^{-2}$).

3.1.5. γ H2AX proteīna ekspresija

γ H2AX proteīna ekspresiju noteicām metkarbatona, etkarbatona un AV-153-Na ietekmē žurku nierēs, sirdī, acīs un nervos kontroles grupās un STZ izraisīta diabēta modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 10., 11., 12. un 13. pielikumā.

Nieru audos γ H2AX proteīna ekspresiju novērojām proksimālajos un distālajos kanālišos, kamoliņos, interstīcijā un asinsvadu sienīnā. Diabēta izraisīšana nierēs statistiski ticami neizmainīja γ H2AX proteīna ekspresiju (3.9. A att.).



3.9. attēls. γ H2AX proteīna ekspresija žurku (A) nierēs, (B) sirdī, (C) acīs un (D) nervos dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

Etkarbatons statistiski ticami palielināja šī proteīna ekspresiju STZ grupās nierēs (deva 0,05 mg/kg: $p=1,30 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$); metkarbatons un AV-153-Na statistiski ticami neietekmēja γ H2AX proteīna ekspresiju ne kontroles grupās, ne diabēta grupās.

Sirds audos γ H2AX proteīna ekspresija bija vērojama kardiomiocītu kodolos, iekaisuma šūnu kodolos sirds interstīcijā un endotēlijā. Galvenokārt γ H2AX ekspresiju varēja novērot miokardā, bet tā bija vērojama arī perikardā un endokardā. Diabēta izraisīšana statistiski ticami paaugstināja γ H2AX proteīna ekspresiju ($p=3,30 \times 10^{-3}$; 3.9. B att.). Kontroles grupās neviens no savienojumiem statistiski ticami neietekmēja šī proteīna ekspresiju, bet STZ grupās to statistiski ticami palielināja etkarbatons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$) un samazināja AV-153-Na ($p < 1,00 \times 10^{-4}$).

Acs audos γ H2AX proteīna ekspresiju novērojām tīklenē. Diabēta izraisīšana to statistiski ticami neietekmēja (3.9. C att.). Izvēlētie 1,4-DHP atvasinājumi lielākoties statistiski ticami neizmainīja šī proteīna ekspresiju ne kontroles grupās, ne diabēta modelī, izņemot AV-153-Na, kas statistiski ticami palielināja ekspresiju kontroles dzīvniekiem ($p=1,18 \times 10^{-2}$).

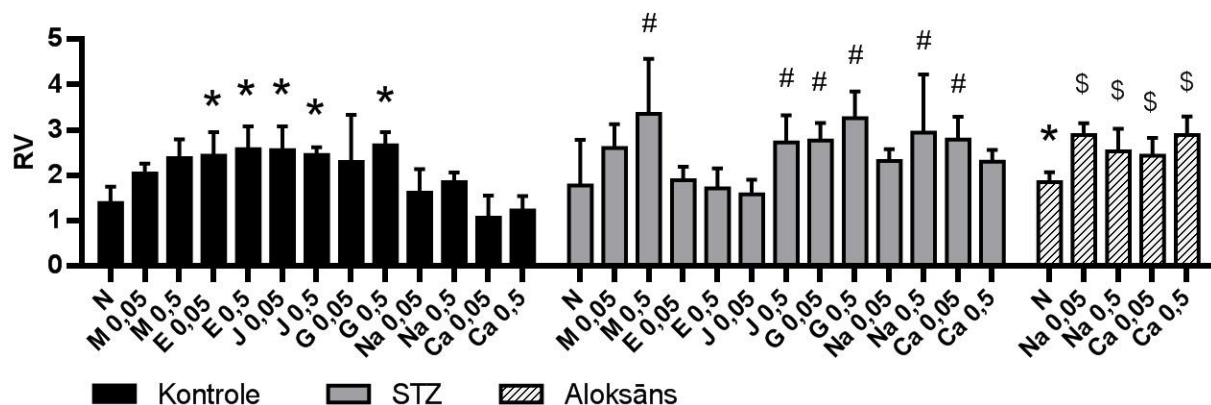
Nervu audos nebija vērojamas statistiski ticami atšķirības γ H2AX proteīna ekspresijā kontroles grupās un diabēta modeļa dzīvniekos (3.9. D att.). Kontroles grupās proteīna ekspresiju statistiski ticami samazināja metkarbatons lielākajā devā ($p=3,84 \times 10^{-2}$). Citas grupas bija bez statistiski ticamām izmaiņām.

3.1.6. *Xdh* gēna ekspresija

Xdh gēna ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 14., 15. un 16. pielikumā.

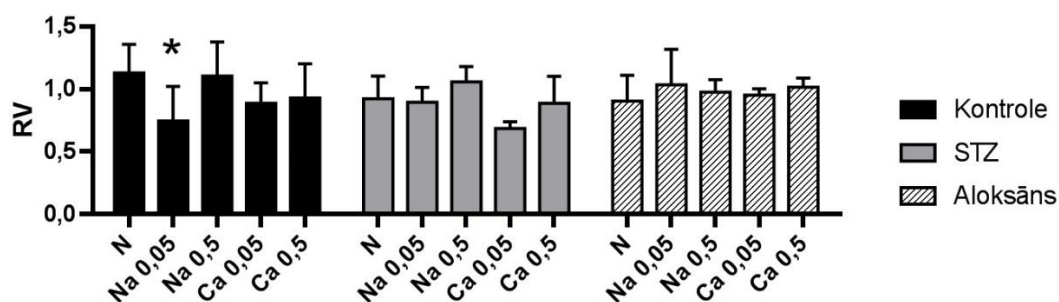
Ar STZ izraisīta cukura diabēta modelī žurku nierēs *Xdh* gēna ekspresija statistiski ticami nemainījās, bet aloksāns to palielināja ($p=3,00 \times 10^{-3}$; 3.10. att.). Kontroles grupās gēna ekspresiju statistiski ticami palielināja etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=4,39 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=9,20 \times 10^{-3}$), kā arī J-9-125 (deva 0,05 mg/kg: $p=1,13 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=4,28 \times 10^{-2}$) un glutapijons lielākajā devā ($p=9,60 \times 10^{-3}$). STZ grupu nierēs *Xdh* gēna ekspresiju statistiski ticami palielināja metkarbatons lielākajā devā ($p=8,00 \times 10^{-4}$), J-9-125 lielākajā devā ($p=2,37 \times 10^{-2}$), glutapijons (deva 0,05 mg/kg: $p=2,67 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=8,00 \times 10^{-4}$), AV-153-Na lielākajā devā ($p=3,20 \times 10^{-3}$) un AV-153-Ca mazākajā devā ($p=1,32 \times 10^{-2}$). Savukārt aloksāna grupu nierēs *Xdh* gēna ekspresiju statistiski ticami

paaugstināja abi analizētie savienojumi: AV-153-Na (deva 0,05 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p = 2,37 \times 10^{-2}$) un AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg: $p = 1,20 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$).



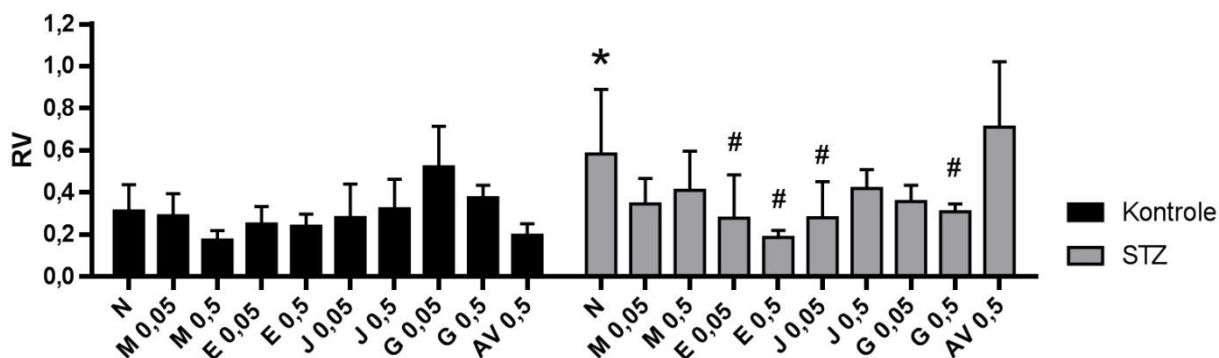
3.10. attēls. *Xdh* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Aknās pēc diabēta izraisīšanas nebija statistiski ticamu izmaiņu *Xdh* gēna ekspresijas līmenī (3.11. att.). Kontroles grupās *Xdh* gēna ekspresiju statistiski ticami samazināja AV-153-Na mazākajā devā ($p = 7,40 \times 10^{-3}$), bet STZ un aloksāna grupās šādu efektu nenovēroja.



3.11. attēls. *Xdh* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Asinīs *Xdh* gēna ekspresiju statistiski ticami palielināja diabēta izraisīšana ar STZ ($p=1,06 \times 10^{-2}$; 3.12. att.).



3.12. attēls. *Xdh* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

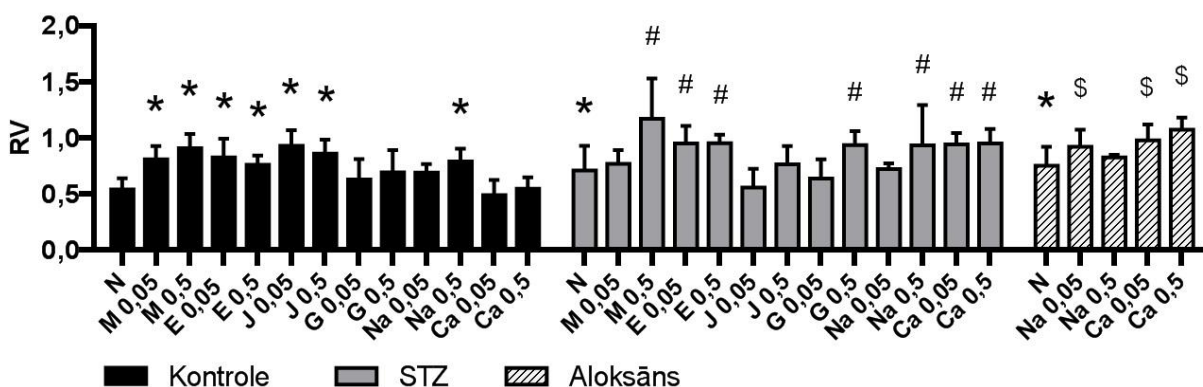
Kontroles grupās asinīs 1,4-DHP atvasinājumi neizraisīja statistiski ticamas izmaiņas, bet STZ grupās *Xdh* ekspresiju statistiski ticami samazināja etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=1,62 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=1,70 \times 10^{-3}$), J-9-125 mazākajā devā ($p=1,96 \times 10^{-2}$) un glutapirons lielākajā devā ($p=4,71 \times 10^{-2}$).

3.1.7. *Pσμα3* gēna ekspresija

Pσμα3 gēna ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 17., 18. un 19. pielikumā.

STZ ietekmē statistiski ticami palielinājās *Pσμα3* gēna ekspresija žurku nierēs ($p=3,67 \times 10^{-2}$); arī aloksāns stimulēja šī gēna ekspresiju ($p=3,90 \times 10^{-3}$; 3.13. att.). Kontroles grupās nierēs *Pσμα3* gēna ekspresiju statistiski ticami pastiprināja metkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=4,84 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=6,20 \times 10^{-3}$), etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=2,04 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=4,81 \times 10^{-2}$), J-9-125 (deva 0,05 mg/kg: $p=8,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=5,10 \times 10^{-3}$) un AV-153-Na lielākajā devā ($p=2,86 \times 10^{-2}$). STZ grupās ekspresiju statistiski ticami palielināja metkarbatons lielākajā devā ($p=2,00 \times 10^{-4}$), etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=1,70 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=2,60 \times 10^{-2}$), glutapirons lielākajā devā ($p=3,78 \times 10^{-2}$), AV-153-Na lielākajā devā ($p=3,59 \times 10^{-2}$) un AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg:

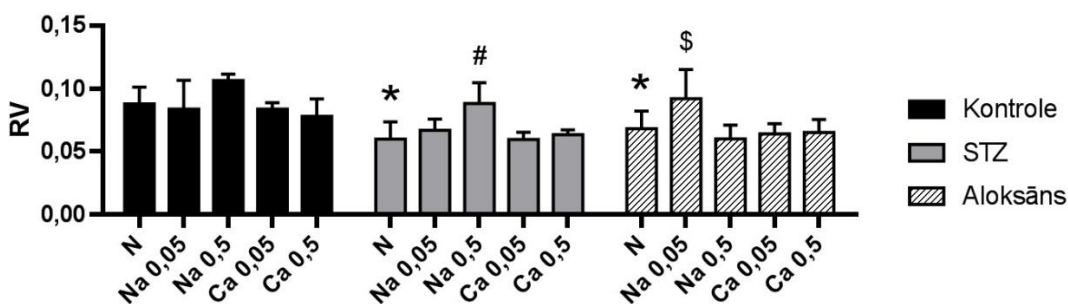
$p=1,62 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=2,10 \times 10^{-2}$). Aloksāna grupu nierēs *Psm3* gēna ekspresiju statistiski ticami paaugstināja gan AV-153-Na (deva 0,05 mg/kg: $p=4,53 \times 10^{-2}$), gan AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg: $p=9,00 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p=7,00 \times 10^{-4}$).



3.13. attēls. *Psm3* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos.

N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Diabētisku žurku aknās *Psm3* gēna ekspresija statistiski ticami samazinājās, salīdzinot ar kontroli (STZ: $p=8,00 \times 10^{-4}$; aloksāns: $p=9,80 \times 10^{-3}$; 3.14. att.).

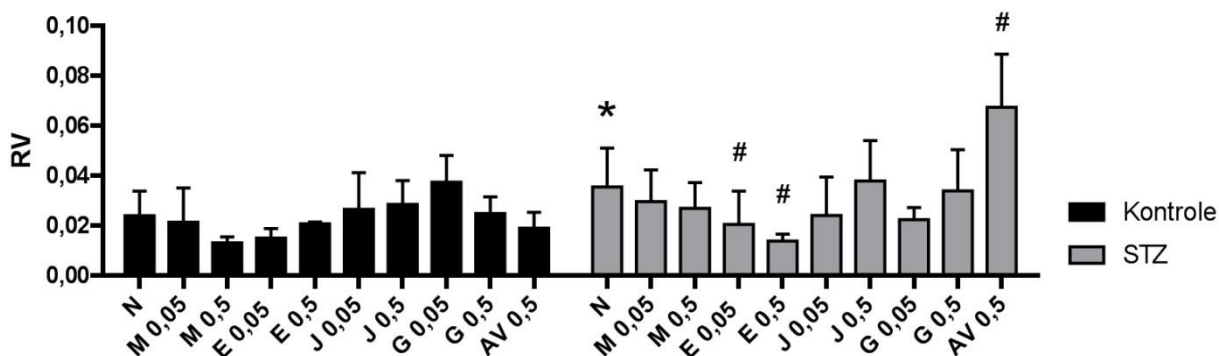


3.14. attēls. *Psm3* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos.

N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Kontroles grupās aknās statistiski ticamas ekspresijas izmaiņas netika konstatētas ne AV-153-Na, ne AV-153-Ca gadījumā. Diabētiskajās grupās statistiski ticamu ekspresiju pastiprinošu efektu uzrādīja AV-153-Na: STZ gadījumā lielākajā devā ($p=4,40 \times 10^{-3}$), savukārt aloksāna gadījumā mazākajā devā ($p=1,67 \times 10^{-2}$).

Žurku asinīs diabēta ietekmē statistiski ticami pastiprinājās *Psm3* gēna ekspresija ($p=4,12 \times 10^{-2}$; 3.15. att.).



3.15. attēls. *Psm3* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

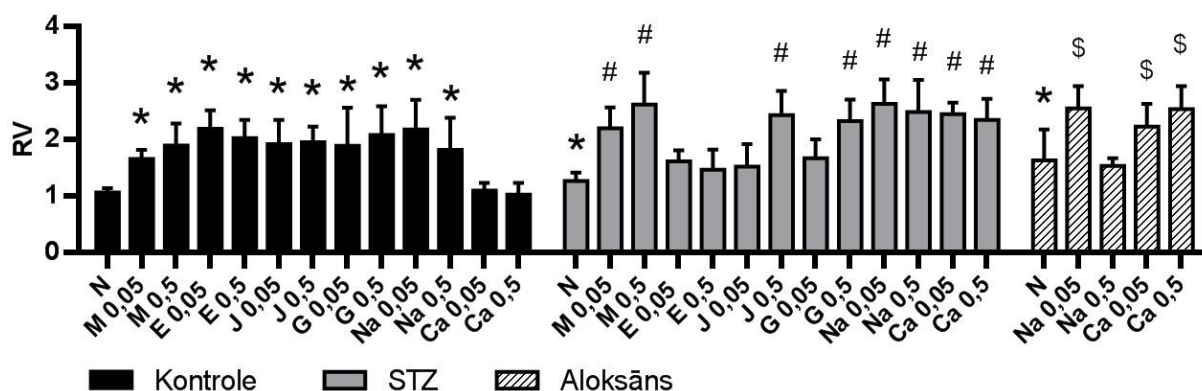
Kontroles grupās asinīs statistiski ticamas *Psm3* ekspresijas izmaiņas 1,4-DHP atvasinājumu ietekmē nebija novērotas. STZ grupās statistiski ticami *Psm3* ekspresiju samazināja etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=3,49 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=2,10 \times 10^{-3}$), bet palielināja AV-153-Na (deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$).

3.1.8. *Psm6* gēna ekspresija

Psm6 gēna ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 20., 21. un 22. pielikumā.

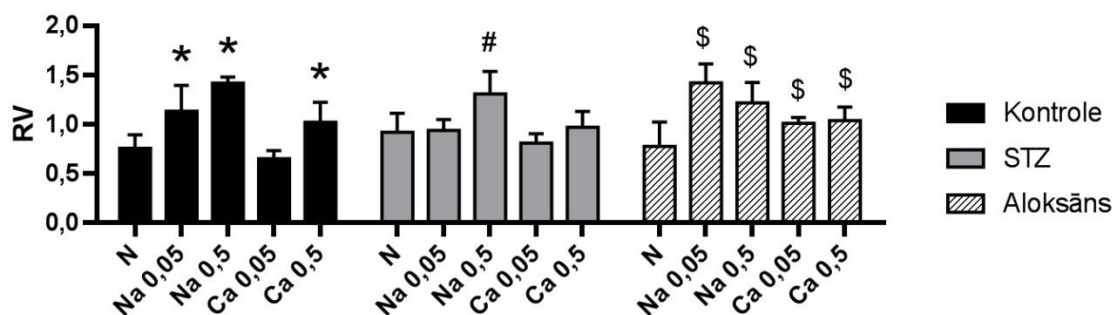
STZ izraisītā cukura diabēta gadījumā *Psm6* gēna ekspresija žurku nierēs bija statistiski ticami palielināta ($p=7,80 \times 10^{-3}$); arī aloksāns to statistiski ticami palielināja ($p=2,69 \times 10^{-2}$; 3.16. att.). Kontroles grupu nierēs visi pētītie savienojumi, izņemot AV-153-Ca, statistiski ticami pastiprināja *Psm6* ekspresiju: metkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=1,31 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=7,00 \times 10^{-4}$), etkarbatons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), J-9-125 (deva

0,05 mg/kg: $p=3,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=2,00 \times 10^{-4}$), glutapirons (deva 0,05 mg/kg: $p=2,60 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p=3,00 \times 10^{-4}$) un AV-153-Na (deva 0,05 mg/kg: $p=8,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=6,30 \times 10^{-3}$). STZ izraisīta diabēta grupu nierēs *Psmab* ekspresiju statistiski ticami palielināja metkarbatons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), J-9-125 lielākajā devā ($p < 1,00 \times 10^{-4}$), glutapirons lielākajā devā ($p < 1,00 \times 10^{-4}$), AV-153-Na (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$) un AV-153-Ca (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$). Aloksāna diabēta gadījumā *Psmab* gēna ekspresiju statistiski ticami paaugstināja gan AV-153-Na mazākajā devā ($p=3,50 \times 10^{-3}$), gan AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg: $p=1,75 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=1,00 \times 10^{-3}$).



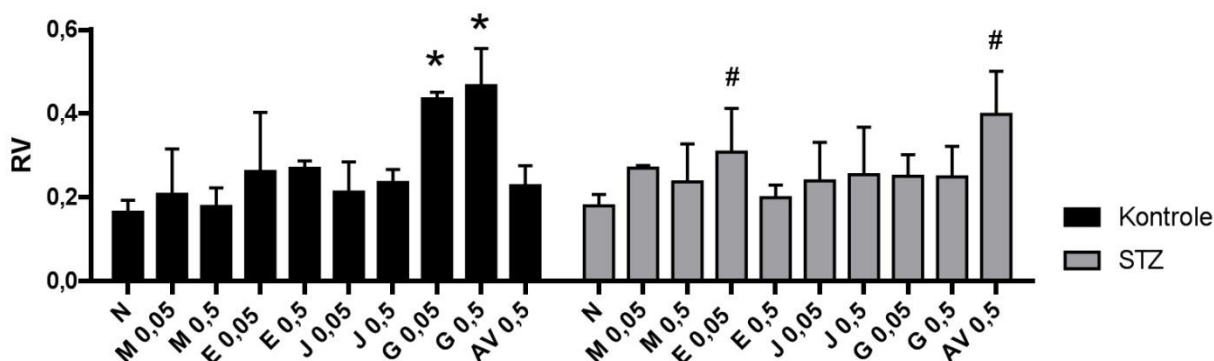
3.16. attēls. *Psmab* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Aknās nebija vērojamas statistiski ticamas izmaiņas *Psmab* gēna ekspresijā abu diabēta modeļu gadījumā (3.17. att.). AV-153-Na ietekmē *Psmab* gēna ekspresija statistiski ticami palielinājās gan kontroles grupās (deva 0,05 mg/kg: $p=5,10 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), gan STZ grupās (deva 0,5 mg/kg: $p=2,30 \times 10^{-3}$), gan aloksāna grupās (deva 0,05 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=3,10 \times 10^{-3}$). AV-153-Ca statistiski ticami pastiprināja *Psmab* gēna ekspresiju aknās kontroles grupās lielākajā devā ($p=1,43 \times 10^{-2}$) un aloksāna grupās abās devās (deva 0,05 mg/kg: $p=3,16 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=1,57 \times 10^{-2}$).



3.17. attēls. *Psmab* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Asinīs diabēta izraisīšana ar STZ statistiski ticami neietekmēja *Psmab* gēna ekspresiju (3.18. att.).



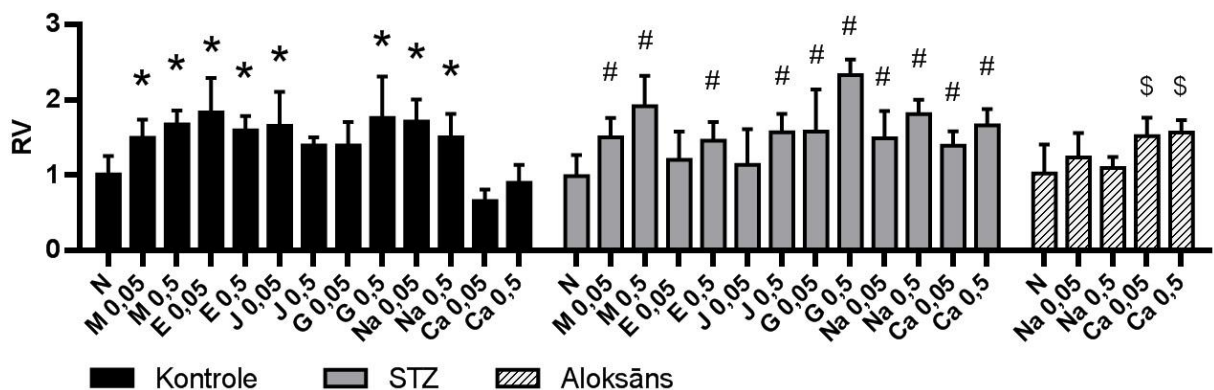
3.18. attēls. *Psmab* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

Kontroles grupu asinīs *Psmab* gēna ekspresiju statistiski ticami palielināja tikai glutapirons (abas devas: $p < 1,00 \times 10^{-4}$), savukārt STZ grupās – etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p = 3,21 \times 10^{-2}$) un AV-153-Na (deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$).

3.1.9. *Psmb5* gēna ekspresija

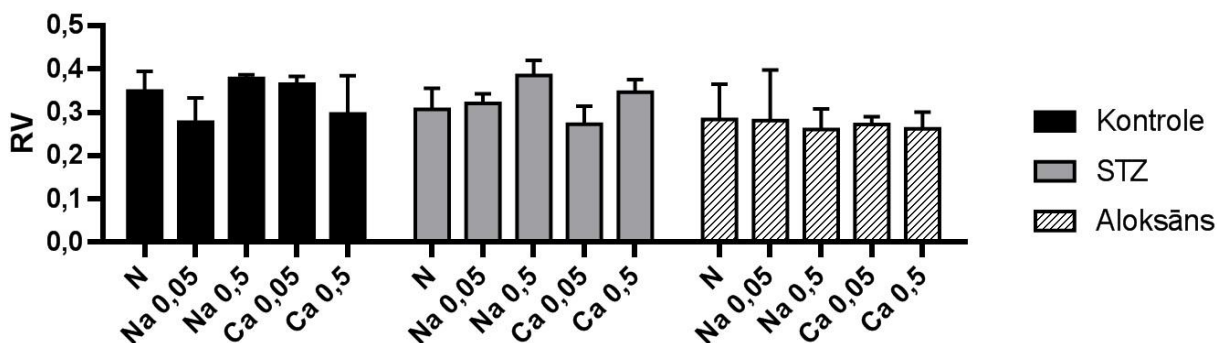
Psmb5 gēna ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 23., 24. un 25. pielikumā.

Cukura diabēta izraisīšana ar STZ statistiski ticami neietekmēja *Psmb5* gēna ekspresijas līmeni žurku nierēs; arī aloksāns to statistiski ticami neizmainīja (3.19. att.). Kontroles grupu nierēs ekspresiju statistiski ticami palielināja metkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=8,80 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p=4,00 \times 10^{-4}$), etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=2,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=2,70 \times 10^{-3}$), J-9-125 mazākajā devā ($p=1,90 \times 10^{-3}$), glutapirons lielākajā devā ($p=1,20 \times 10^{-3}$) un AV-153-Na (deva 0,05 mg/kg: $p=2,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=8,00 \times 10^{-4}$). Žurku nierēs pēc diabēta izraisīšanas ar STZ *Psmb5* gēna ekspresiju statistiski ticami paaugstināja visi pētītie savienojumi: metkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=2,60 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p<1,00 \times 10^{-4}$), etkarbatons lielākajā devā ($p=8,00 \times 10^{-3}$), J-9-125 lielākajā devā ($p=2,20 \times 10^{-3}$), glutapirons (deva 0,05 mg/kg: $p=5,40 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p<1,00 \times 10^{-4}$), AV-153-Na (deva 0,05 mg/kg: $p=3,00 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p<1,00 \times 10^{-4}$) un AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg: $p=7,70 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p<1,00 \times 10^{-4}$). Aloksāna diabēta gadījumā *Psmb5* gēna ekspresiju statistiski ticami pastiprinošu efektu uzrādīja AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg: $p=6,50 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p=5,40 \times 10^{-3}$).



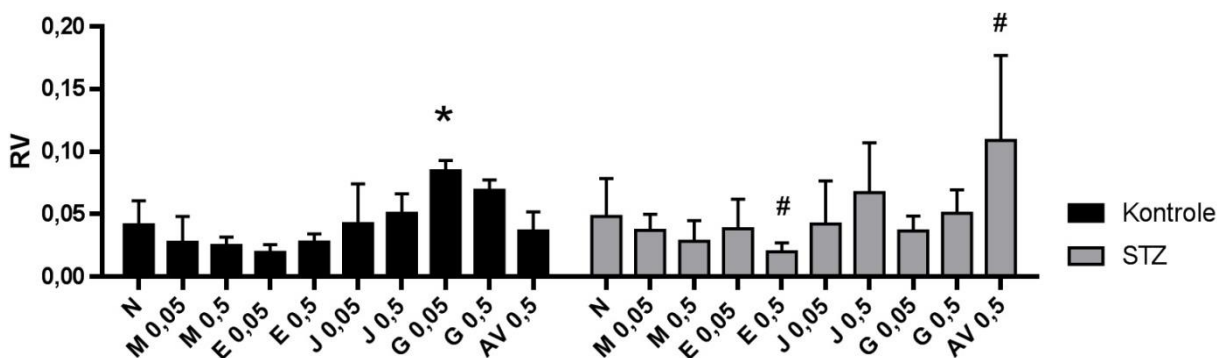
3.19. attēls. *Psmb5* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p<5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p<5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p<5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Aknās cukura diabēta izraisīšana statistiski ticami neietekmēja *Psmb5* gēna ekspresiju (3.20. att.). 1,4-DHP atvasinājumu pielietošanai nevienā no pētītajām grupām nebija vērojamas statistiski ticamas *Psmb5* gēna ekspresijas izmaiņas.



3.20. attēls. *Psmb5* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontrolēs grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontrolēs N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Asinīs ar STZ inducēts diabēts statistiski ticami neizmainīja *Psmb5* gēna ekspresiju (3.21. att.).



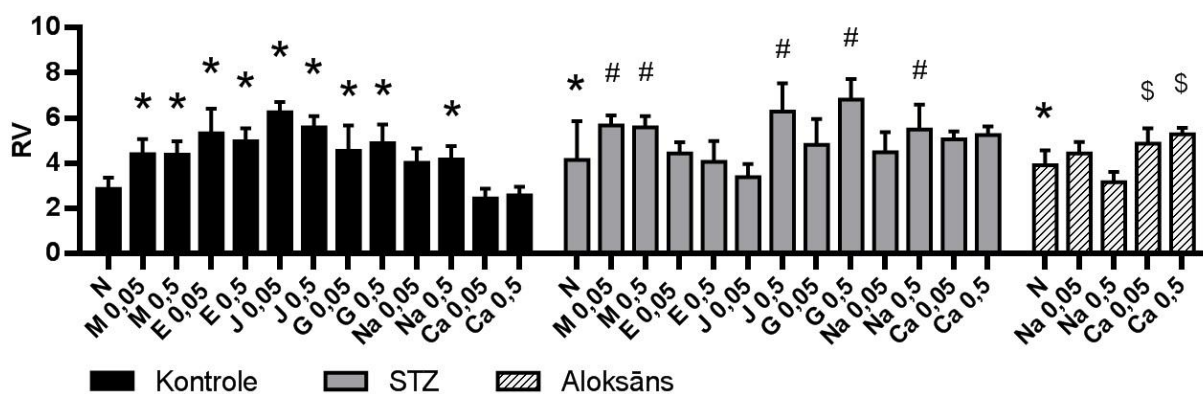
3.21. attēls. *Psmb5* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontrolēs grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontrolēs N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

Kontroles grupu asinīs *Psmb5* gēna ekspresijas statistiski ticamu pieaugumu veicināja glutapirons mazākajā devā ($p=4,00 \times 10^{-3}$). STZ grupām etkarbatons lielākajā devā to statistiski ticami samazināja ($p=4,10 \times 10^{-2}$), bet AV-153-Na – palielināja (deva 0,5 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$).

3.1.10. *Psmc6* gēna ekspresija

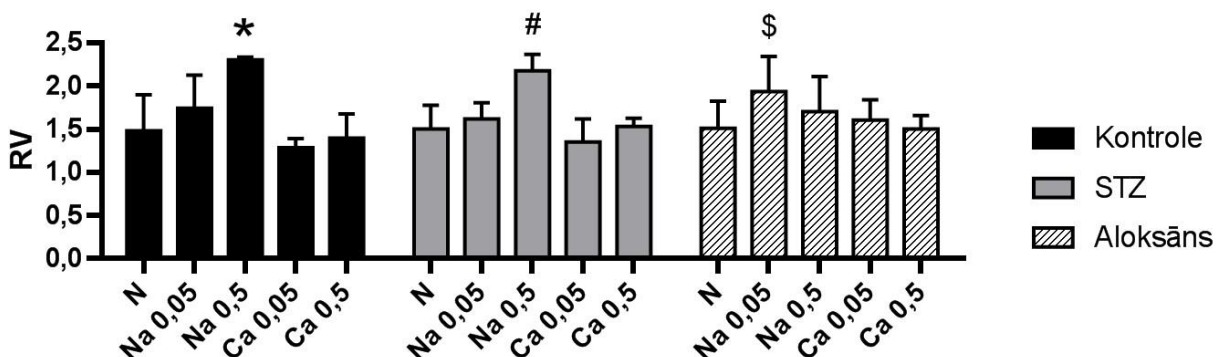
Psmc6 gēna ekspresiju noteicām kontroles dzīvnieku un diabētisku žurku nierēs un aknās STZ un aloksāna modelī, kā arī asinīs STZ modelī. Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas attiecīgi 26., 27. un 28. pielikumā.

Cukura diabēta izraisīšanai ar STZ sekoja statistiski ticams *Psmc6* gēna ekspresijas pieaugums žurku nierēs ($p=4,45 \times 10^{-2}$), arī aloksāns to statistiski ticami paaugstināja ($p=2,10 \times 10^{-3}$; 3.22. att.). Kontroles grupu nierēs pieci no sešiem 1,4-DHP atvasinājumiem statistiski ticami palielināja *Psmc6* gēna ekspresiju: metkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=4,46 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=4,81 \times 10^{-2}$), etkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=6,00 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p=9,20 \times 10^{-3}$), J-9-125 (deva 0,05 mg/kg: $p < 1,00 \times 10^{-4}$; deva 0,5 mg/kg: $p=8,00 \times 10^{-4}$), glutapirons (deva 0,05 mg/kg: $p=4,92 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=1,62 \times 10^{-2}$) un AV-153-Na lielākajā devā ($p=4,02 \times 10^{-2}$). STZ grupās līdzīgu efektu uzrādīja metkarbatons (deva 0,05 mg/kg: $p=2,28 \times 10^{-2}$; deva 0,5 mg/kg: $p=3,10 \times 10^{-2}$), J-9-125 lielākajā devā ($p=2,60 \times 10^{-3}$), glutapirons lielākajā devā ($p=3,80 \times 10^{-3}$) un AV-153-Na lielākajā devā ($p=1,70 \times 10^{-2}$). Aloksāna izraisīta diabēta gadījumā *Psmc6* gēna ekspresiju statistiski ticami paaugstināja AV-153-Ca (deva 0,05 mg/kg: $p=7,00 \times 10^{-3}$; deva 0,5 mg/kg: $p=5,00 \times 10^{-4}$).



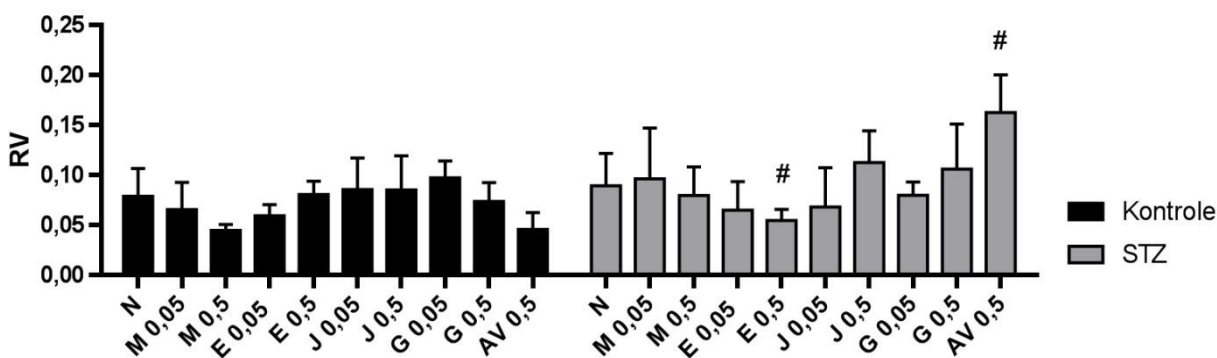
3.22. attēls. *Psmc6* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Aknās diabēta ietekmē *Psmc6* gēna ekspresija statistiski ticami nemainījās (3.23. att.). *Psmc6* gēna ekspresijas statistiski ticamu pieaugumu izraisīja AV-153-Na: kontroles grupā lielākajā devā ($p=1,00 \times 10^{-3}$), STZ grupā lielākajā devā ($p=1,50 \times 10^{-3}$) un aloksāna grupā mazākajā devā ($p=4,93 \times 10^{-2}$).



3.23. attēls. *Psmc6* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu; \$ $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar aloksāna N grupu.

Asinīs nebija vērojamas statistiski ticamas izmaiņas *Psmc6* gēna ekspresijas līmenī pēc STZ inducēta diabēta (3.24. att.).

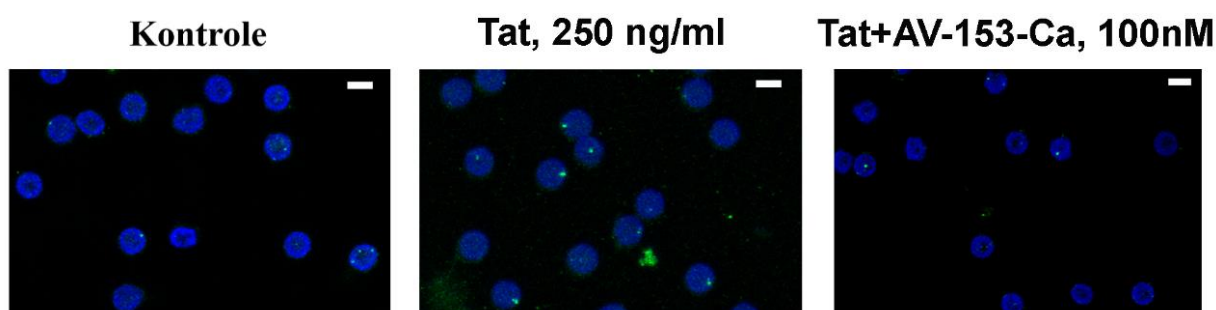


3.24. attēls. *Psmc6* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna (STZ) inducētā 1. tipa cukura diabēta modelī. N – bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD); * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar kontroles N grupu; # $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar STZ N grupu.

Kontroles grupu asinīs 1,4-DHP atvasinājumu izmantošana statistiski ticami neietekmēja *Psmc6* gēna ekspresiju, savukārt diabēta grupās to statistiski ticami samazināja etkarbatons lielākajā devā ($p=3,22 \times 10^{-2}$), bet palielināja AV-153-Na ar devu 0,5 mg/kg ($p=1,00 \times 10^{-4}$).

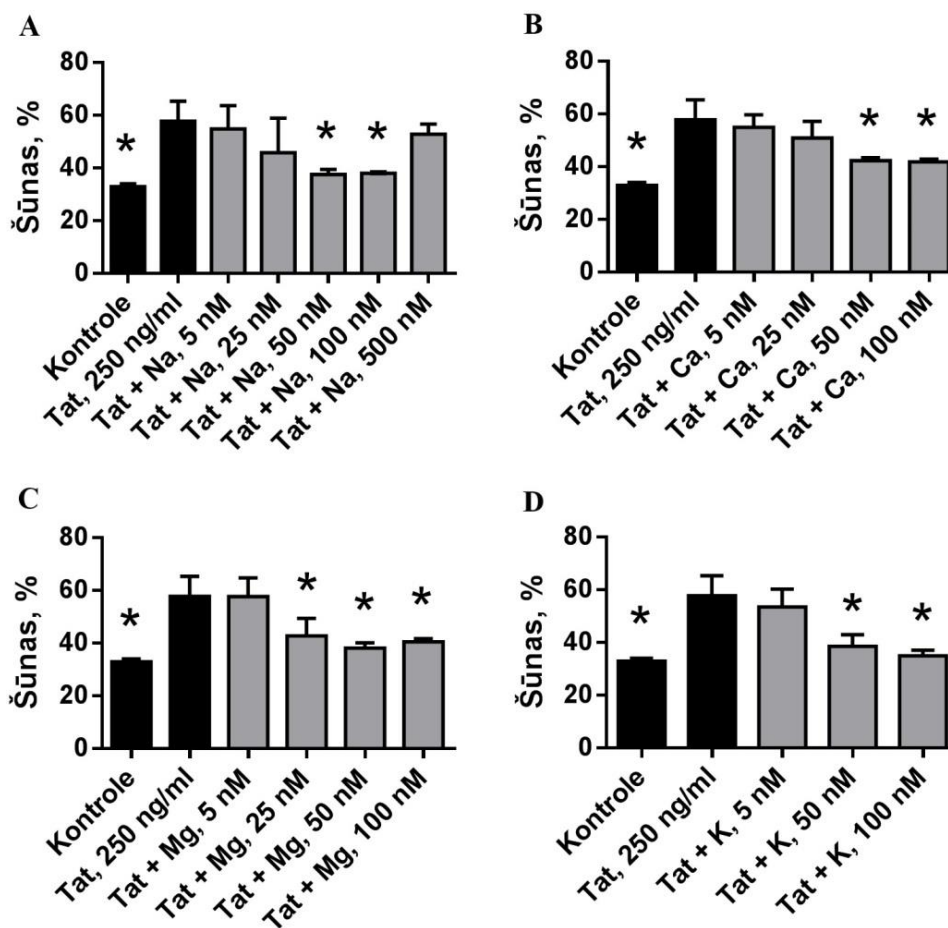
3.2. B-limfocītu transfekcija ar Tat proteīnu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu klātbūtnē

B-limfocītus 6 h vienlaicīgi transficēja ar Tat proteīnu un apstrādāja ar 1,4-DHP atvasinājumiem dažādās koncentrācijās. Imunocitoķīmiski analizēja γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu procentuālo daudzumu paraugos (3.25. att). Rezultātu skaitliskās vērtības ir atainotas 29. pielikumā.



3.25. attēls. **Reprezentatīvi attēli pēc B-limfocītu imunocitoķīmiskas krāsošanas ar antivielām pret γ H2AX.** Attiecīgi: kontroles šūnas bez apstrādes, šūnas pēc 6 h transfekcijas ar Tat proteīnu (250 ng/ml), šūnas pēc 6 h vienlaicīgas transfekcijas ar Tat proteīnu (250 ng/ml) un apstrādes ar 100 nM AV-153-Ca. γ H2AX ir attēlots zaļā krāsā; šūnu kodoli, krāsoti ar DAPI, ir attēloti zilā krāsā. Līnijas skala – 10 μ m.

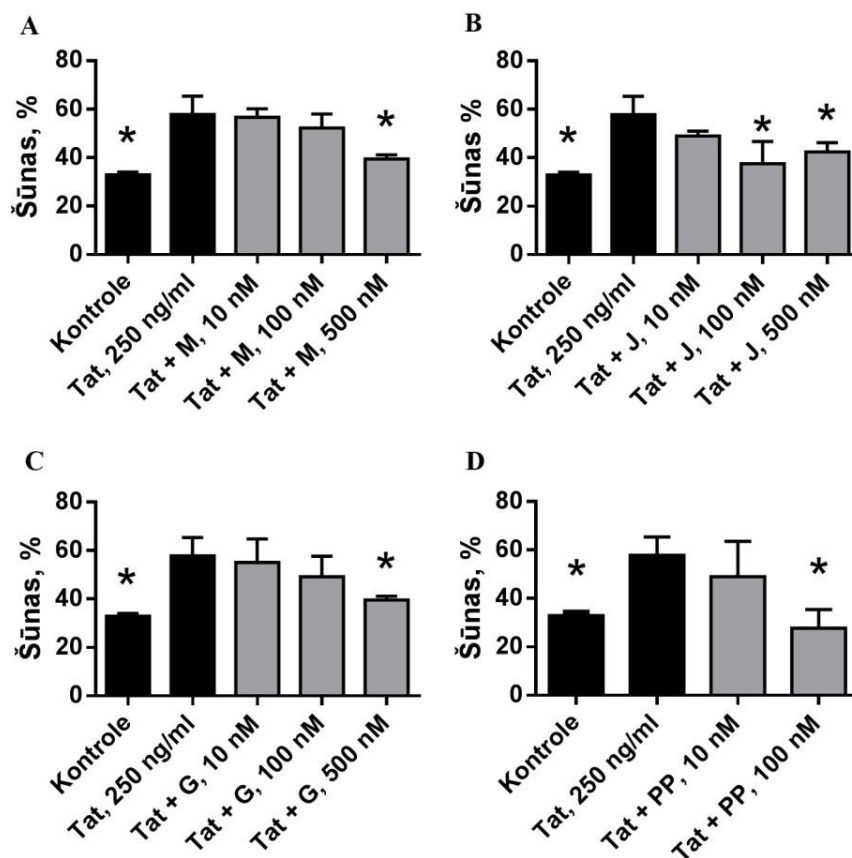
Šūnu transficēšana ar Tat proteīnu izraisīja statistiski ticamu γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu skaita procentuālo pieaugumu ($p=6,80 \times 10^{-3}$). Vienlaicīgi inkubējot ar AV-153-Na, γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu daudzums pret Tat paraugu statistiski ticami samazinājās pie 50 nM un 100 nM koncentrācijās (attiecīgi $p=4,60 \times 10^{-3}$ un $p=4,07 \times 10^{-2}$; 3.26. A att.). Savukārt lielākā koncentrācijā, 500 nM, AV-153-Na statistiski ticamas izmaiņas neuzrādīja. AV-153-Ca, līdzīgi kā AV-153-Na, samazināja γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu daudzumu pie 50 nM un 100 nM koncentrācijās (attiecīgi $p=2,66 \times 10^{-2}$ un $p=2,25 \times 10^{-2}$; 3.26. B att.).



3.26. attēls. Proteīna γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu procentuālais daudzums pēc 6 h vienlaicīgas transfekcijas ar 250 ng/ml Tat un apstrādes ar (A) AV-153-Na, (B) AV-153-Ca, (C) AV-153-Mg, (D) AV-153-K. Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; Mg – AV-153-Mg; K – AV-153-K. Procentuālais γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu daudzums aprēķināts no minimums 100 šūnām. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD) no vismaz 3 redzeslaukiem. * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar Tat grupu.

Izmantojot AV-153-Mg, γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu statistiski ticams samazinājums bija vērojams jau pie 25 nM koncentrācijas ($p = 1,03 \times 10^{-2}$; 3.26. C att.). Palielinot koncentrāciju līdz 50 nM, tas bija vēl izteiktāks ($p = 2,60 \times 10^{-3}$). Arī koncentrācija 100 nM statistiski ticami samazināja šo šūnu procentuālo skaitu ($p = 1,79 \times 10^{-2}$). Savukārt AV-153-K γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu statistiski ticami samazinošu efektu uzrādīja koncentrācijās 50 nM un 100 nM (attiecīgi $p = 6,00 \times 10^{-3}$ un $p = 3,00 \times 10^{-4}$; 3.26. D att.).

Transfēcējot B limfocītus ar Tat proteīnu un apstrādājot ar metkarbatonu vai glutapironu, γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu daudzums pret šūnām, kas transficētas tikai ar Tat, statistiski ticami samazinājās pie koncentrācijas 500 nM (metkarbatons: $p = 1,40 \times 10^{-3}$; 3.27. A att.; glutapirons: $p = 1,65 \times 10^{-2}$; 3.27. C att.).



3.27. attēls. Proteīna γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu procentuālais daudzums pēc 6 h vienlaicīgas transfekcijas ar 250 ng/ml Tat un apstrādes ar (A) metkarbatonu, (B) J-9-125, (C) glutapironu, (D) PP-544-Na. M – metkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; PP – PP-544-Na. Procentuālais γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu daudzums aprēķināts no minimums 100 šūnām. Vērtības ir izteiktas kā vidējais aritmētiskais (SD) no vismaz 3 redzeslaukiem. * $p < 5,00 \times 10^{-2}$, salīdzinot ar Tat grupu.

J-9-125 gadījumā γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu daudzums statistiski ticami samazinājās pie koncentrācijām 100 nM un 500 nM (attiecīgi $p = 3,00 \times 10^{-4}$ un $p = 1,39 \times 10^{-2}$; 3.27. B att.). Izmantojot PP-544-Na, γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu statistiski ticams samazinājums bija vērojams pie 100 nM koncentrācijas ($p < 1,00 \times 10^{-4}$; 3.27. D att.).

4. DISKUSIJA

4.1. Streptozotocīna un aloksāna izraisīts 1. tipa cukura diabēts

Viena no izplatītākajām CD komplikācijām ir diabētiskā nefropātija, kas skar ap 30 % diabēta pacientu (Gross *et al.*, 2005). Esošās terapijas spēj tikai atvieglot simptomus un aizkavēt slimības attīstību, bet ne to novērst. Šis pētījums ir vērsts galvenokārt uz *Parp1* gēna, PARP1 un c-PARP1 proteīna, *H2ax* gēna un γ H2AX proteīna, kā arī ksantīna dehidrogenāzes gēna (*Xdh*) un četrus proteolīzes enzīmu gēnus (*Psm3*, *Psm6*, *Psm5* un *Psmc6*) ekspresijas izmaiņu noteikšanu inducētā cukura diabēta modeļos žurku nierēs. Papildus tam gēnu ekspresiju noteicām arī žurku aknās un asinīs. Aknas ir orgāns, kurā noris dažādas metabolas funkcijas, un tās cieš no paaugstinātā cukura daudzuma asinīs diabēta gadījumā. Turklāt izmaiņas aknās, piemēram, nealkohola taukaino aknu slimība, kas skar diabēta pacientus, ir cieši saistītas ar diabēta komplikāciju attīstību nierēs (Targher *et al.*, 2014). Asins analīzes kā vispārējā veselības stāvokļa raksturotājs tiek plaši izmantotas medicīnā un tās nereti var lietot biomarkieru atlasē. Diabēta pacientu asinīs var novērot pastiprinātu oksidatīvo stresu (Francescato *et al.*, 2014).

PARP1, šķeltā PARP1 un fosforilētā H2AX proteīnu ekspresiju noteicām žurku nierēs, sirdī, acīs un nervos. Visi šie orgāni ir pakļauti diabētisko komplikāciju attīstības riskam – jau minētajai nefropātijai, kardiovaskulārām slimībām, retinopātijai un neiropātijai (American Diabetes Association, 2014).

Lai novērtētu dažādu modeļu ietekmi uz gēnu ekspresiju, daļa eksperimentu tika veikti, ITCD izraisot gan ar STZ, gan ar aloksānu, kas abi ir toksiski glikozes analogi insulīnu producējošajām aizkuņģa dziedzera β -šūnu salīnām. STZ gadījumā trīs galvenie insulīna atkarīgā diabēta rašanās mehānismi ir (1) DNS alkilēšana, (2) slāpekļa oksīda atbrīvošana no STZ molekulas, kas satur nitrozo grupu un (3) ROS veidošana hipoksantīna metabolismā. Rezultātā notiek DNS bojāšana. Aloksānam ir divi neatkarīgi diabēta izraisīšanas mehānismi: (1) ROS ģenerēšana cikliskā reakcijā ar dialurīnskābi un (2) β -šūnu glikozes sensora glikokināzes inhibēšana, kas selektīvi traucē glikozes inducētai insulīna sekrēcijai (Lenzen, 2008). Lai gan kopumā 1,4-DHP atvasinājumu efekts uz pētīto gēnu ekspresiju šajos modeļos bija līdzīgs, konstatējām nesakritības starp dažām vienādi apstrādātām grupām. Tā kā abiem modeļiem ir atšķirīgs diabēta izraisīšanas mehānisms, tas varētu skaidrot šīs tālāk aprakstītās nesakritības.

Oksidatīvais stress ir nozīmīgs faktors diabētiskās nefropātijas attīstībā (Lindblom *et al.*, 2015). Antioksidanti ir potenciāli medikamenti ITCD un tā komplikāciju ārstēšanai (Matough *et al.*, 2012). No otras puses, antioksidanta E vitamīna pielietošana 4,5 gadu garumā diabēta

pacientu ārstēšanai neietekmēja diabētiskās nefropātijas iznākumu (Lonn *et al.*, 2002). Tam par iemeslu tiek minēta E vitamīna nespecifiskā iedarbība uz ROS avotiem. Tāpēc deģeneratīvu slimību ārstēšanā terapeitisks potenciāls varētu piemist uz mitohondrijiem mērķētām vielām (Smith *et al.*, 2003). Diabētiskās nefropātijas gadījumā mitohondriji ir nozīmīgākais reaktīvo skābekļa un slāpekļa radikāļu avots (Lindblom *et al.*, 2015). Vairāk nekā 40 gadu ilgi pētījumi par 1,4-DHP ietekmi uz mitohondrijiem, to bioenerģētiku un jonu plūsmu liecina par 1,4-DHP mitohondriotropiskajām īpašībām (Velena *et al.*, 2016). Mūsu pētījumā analizējām LOSI sintezētus 1,4-DHP atvasinājumus bez Ca^{2+} kanālu antagonistu aktivitātes, gan tādus, kuriem piemīt antioksidantu īpašības, gan arī vājus brīvo radikāļu savācējus. Savienojumus pārbaudījām mazās devās – 0,05 mg/kg –, un tās palielinot līdz 0,5 mg/kg. Ir zināms, ka aminoskābes saturošie 1,4-DHP atvasinājumi, piemēram, glutapirons, uzrāda neiroaizsargājošas īpašības žurkās devās jau no 0,005 mg/kg un 0,05 mg/kg, atšķirībā no tradicionālajiem dihidropiridīniem, kurus parasti lieto devās 5–20 mg/kg (Klusa, 2016).

4.2. *Parp1* un *H2ax* gēnu un to proteīnu ekspresijas izmaiņas inducēta cukura diabēta modelī 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē

Gan 1. tipa, gan 2. tipa cukura diabēta gadījumā DNS bojājumus izraisa paaugstinātās glikozes koncentrācijas ietekmē radušies brīvie radikāļi: ūdeņraža peroksīds, superoksīda anjoni un peroksinitrīts. Tie stimulē pastiprinātu DNS pārrāvumu marķiera PARP1 aktivitāti (Garcia-Soriano *et al.*, 2001). H2AX proteīns ir iesaistīts DNS divpavedienu pārrāvumu reparācijā. Ja DNS ir bojāta, H2AX tiek fosforilēts, izmaina lokālo hromatīna struktūru un nodrošina DNS reparācijas faktoru piesaisti (Paull *et al.*, 2000).

Pētījumā apskatītajās modeļsistēmās novērojām *Parp1* gēna ekspresijas statistiski ticamu pieaugumu žurku nierēs aloksāna diabēta gadījumā, bet STZ izraisīta diabēta modelī statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nekonstatējām. Diabētisko žurku nierēs bija palielināta gan PARP1 proteīna ekspresija, gan šķeltā PARP1 proteīna ekspresija, kas ir jutīgs apoptozes marķieris. Tas sakrīt ar citu autoru datiem (Xu *et al.*, 2008). *H2ax* gēna ekspresija statistiski ticami nemainījās žurku nierēs. Arī fosforilētā H2AX proteīna ekspresija bija bez statistiski ticamām izmaiņām nierēs STZ inducēta diabēta gadījumā, tomēr ar tendenci palielināties. Līdzīgi, citi autori ziņo par γ H2AX līmeņa pieaugumu diabētisku peļu nieru glomerulās un kortikālajos tubuļos (Zhu *et al.*, 2015).

Aknās *Parp1* gēna ekspresija bija bez statistiski ticamām izmaiņām. Citi autori ir novērojuši, ka hepatocītu šūnu kultūrā paaugstināts glikozes līmenis neietekmē PARP1

proteīna un gēna ekspresiju, bet stimulē PARP1 aktivēšanu (Pang *et al.*, 2012). Savukārt *H2ax* gēna ekspresija aknās samazinājās. Ir pētījumi, kas norāda, ka pazemināta *H2ax* gēna ekspresija ir saistāma ar traucētu DNS bojājumu reparāciju (Yoshida and Morita, 2004). Pacientiem ar nealkoholisko steatohepatītu, kas var attīstīties arī 1TCD un 2TCD pacientiem, aknās var novērot pazeminātu γ H2AX proteīna līmeni (Schults *et al.*, 2012).

Asinīs pēc STZ inducēta diabēta bija vērojama statistiski ticami paaugstināta gan *H2ax*, gan *Parp1* gēna ekspresija. Tas korelē ar datiem par DNS vienpavediena pārrāvumu skaita pieaugumu diabētisku žurku asinīs (Rostoka, 2015). Līdzīgi, diabēta pacientu asinīs ir vērojams augstāks oksidatīvā stresa līmenis nekā veseliem cilvēkiem, un tas ir saistāms ar DNS bojājumu veidošanos (Francescato *et al.*, 2014). Citi autori žurku perifērajās asins šūnās pēc radiācijas izraisītiem bojājumiem novēroja paaugstinātu *H2ax* mRNS līmeni, kas pozitīvi korelē ar γ H2AX pieaugumu un palielinājās līdz ar starojuma dozu (Zhang *et al.*, 2016). Tas saskan ar mūsu datiem par *H2ax* gēna ekspresiju asinīs. Pacientiem ar 2TCD ir novērots paaugstināts γ H2AX proteīna līmenis limfocītos (Khan *et al.*, 2011) un fibroblastos (Bitar *et al.*, 2013).

Pārējos pētītajos orgānos – sirdī, acīs un nervos – diabēta modeļa gadījumā bija statistiski ticami palielināta c-PARP1 proteīna ekspresija. Savukārt PARP1 ekspresija bija palielināta sirdī un nervos. Citi autori ir novērojuši PARP1 proteīna ekspresijas un aktivitātes pieaugumu diabētisku peļu miokardā (Qin *et al.*, 2016). PARP1 aktivēšanai kardiomiocītos seko šo šūnu nāve, kas var rezultēties ar diabētisko kardiomiopātiju (Puthanveetil *et al.*, 2012). Ir ziņots par pastiprinātu *PARP1* mRNS ekspresiju tīklenes audos diabēta laikā; arī PARP1 proteīna līmenis ir statistiski ticami paaugstināts un var vērot apoptotisko šūnu pieaugumu (Wu *et al.*, 2015). Sēžas nervā PARP1 proteīna ekspresijas pieaugums pēc diabēta izraisīšanas norāda uz PARP1 lomu diabētiskās neiropatijas attīstībā (Li *et al.*, 2005).

Pēc diabēta izraisīšanas γ H2AX pieaugums bija vērojams sirdī, bet acīs un nervos tas statistiski ticami nemainījās. Citi autori ziņo par paaugstinātu γ H2AX proteīna ekspresiju visos trīs orgānos (Liu *et al.*, 2017; Chakrabarti *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015), kas liecina par pastiprinātu DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos.

Kopumā iegūtie dati par paaugstināto *Parp1* un *H2ax* gēnu un to kodēto proteīnu ekspresiju cukura diabēta gadījumā atsevišķos orgānos liecina par iespējamiem intensīvākiem DNS reparācijas procesiem, salīdzinot ar kontroles grupu. Tomēr jāņem vērā, ka papildus DNS aizsargājošai funkcijai PARP1 proteīnam ir proapoptotiska loma. STZ un aloksāna izraisīta diabēta laikā notiek būtiski DNS bojājumi, kā rezultātā pārmērīga PARP1 aktivitāte izsmel intracelulārā NAD^+ rezerves aizkuņģa dziedzera salīnās un noved pie β -šūnu nāves (Yamamoto *et al.*, 1981). PARP1 aktivēšana piedalās iekaisuma slimību attīstībā, jo PARP1 ir

nozīmīgs enzīms transkripcijas regulēšanā, ko tas veic, tieši saistoties pie transkripcijas faktoriem vai caur PAR1lēšanu, tādējādi kontrolējot NF-κB, p53, aktivatoru proteīnu 1, *fos* u.c. Rezultātā PARP1 var veicināt ar iekaisuma procesiem saistītu gēnu ekspresiju, piemēram, iNOS, ciklooksigenāzes-2, dažādu pirmsiekaisuma citokīnu u.c. Diabēta gadījumā PARP1 aktivēšana izraisa oksidatīvo-nitrozatīvo stresu, kas ir saistīts ar diabētisko nefropātiju (Drel *et al.*, 2009). PARP1 ir bagātīgi ekspresēts nieru garozas kanāliņos, kur tas aktivizējas STZ izraisīta diabēta laikā. Tas savukārt izraisa endotelīna receptoru un paša endotelīna 1 pārekspresiju, bet izmaiņas šī proteīna ekspresijā ietekmē asins plūsmu un ir raksturīgas hroniskām diabēta komplikācijām (Minchenko *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008). Arī mūsu pētījumā novērotais c-PARP1 pieaugums diabēta modelī liecina par pastiprinātu apoptozi audos.

PARP1 inhibitori spēj koriģēt endotelīna sistēmas darbību un kopumā uzlabot diabētisko stāvokli organismā (Minchenko *et al.*, 2003). Tie novērš superoksīda veidošanos un iNOS pārekspresiju cilvēka Švāna šūnu kultūrā, kas pakļauta paaugstinātai glikozes iedarbībai (Obrosova *et al.*, 2005). Papildus tam, PARP1 inhibitori neļauj notikt PARP1 auto-PAR1lēšanai un tādējādi stimulē transkripcijas kompleksa stabilizāciju *Reg* gēnam. β-šūnās producētais *Reg* proteīns darbojas kā autokrīns/parakrīns augšanas faktors, veicinot β-šūnu reģenerāciju (Akiyama *et al.*, 2001).

Mūsu pētījumā novērtējām 1,4-DHP atvasinājumu ierosinātās izmaiņas *Parp1* un *H2ax* gēnu un to proteīnu ekspresijā gan diabētiskā žurkā, gan veselos dzīvniekos.

4.2.1. Karbatonīdu ietekme uz *Parp1* un *H2ax* gēnu un to proteīnu ekspresiju

Darbā apskatītie karbatonīdi – metkarbatons, etkarbatons un J-9-125 – statistiski ticami paaugstināja *Parp1* gēna, bet ne *H2ax* gēna ekspresiju žurku nierēs kontroles un diabētiskajās grupās. Asinīs kontroles grupās izmaiņas nebija vērojamas, bet žurkām ar STZ izraisītu diabētu abu gēnu paaugstināto ekspresiju samazināja etkarbatons. Metkarbatons un J-9-125 žurku asinīs uzrādīja tendenci samazināt *H2ax* gēna ekspresiju, tomēr nesasniedzot statistiskās ticamības līmeni. Ja skatās šo karbatonīdu ietekmi uz DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni asinīs baltajās šūnās, metkarbatons to samazina, savukārt etkarbatons stimulē DNS pārrāvumu veidošanos. Interesanti, ka J-9-125 efekts uz DNS pārrāvumu daudzumu asinīs diabēta gadījumā bija divējāds, no koncentrācijas atkarīgs – devā 0,05 mg/kg tam bija pārrāvumus mazinošs efekts, bet devā 0,5 mg/kg J-9-125 stimulēja DNS vienpavediena pārrāvumu veidošanos (Rostoka, 2015). Arī *H2ax* gēna gadījumā ekspresiju izteiktāk samazināja J-9-125 mazākajā devā. Savukārt *Parp1* gēna ekspresiju žurku asinīs J-9-125 mūsu pētījumā

neietekmēja. Metkarbatona pozitīvā ietekme uz asins šūnām varētu būt skaidrojama ar tā labāku spēju savākt brīvos radikāļus, salīdzinot ar pārējiem karbatonīdiem (Ošiņa *et al.*, 2017).

Etkarbatons diabētisku žurku nieru un sirds audos pastiprināja γ H2AX ekspresiju, liecinot par DNS bojājumu veidošanos. No otras puses, etkarbatons samazināja diabēta palielināto c-PARP1 proteīna ekspresiju trijos no četriem analizētajiem orgāniem – nierēs, sirdī un nervos. Var spriest, ka tas mazina apoptozi, vienlaicīgi palielinot *Parp1* gēna ekspresiju, kā novērots nierēs. Tomēr diabētisku žurku acīs un kontroles grupu nierēs etkarbatons ievērojami pastiprināja apoptotiskā c-PARP1 proteīna ekspresiju.

Metkarbatons uzrādīja pozitīvu efektu mazākajā devā sirdī, samazinot diabēta paaugstināto c-PARP1 ekspresiju, bet citos orgānos, kā arī uz γ H2AX ekspresiju tā ietekme bija bez statistiski ticamām izmaiņām.

4.2.2. Glutapirona ietekme uz *Parp1* un *H2ax* gēnu ekspresiju

Glutapironam nepiemīt antioksidatīvā aktivitāte (Milkovic *et al.*, 2018) un tas jau iepriekš ir uzrādījis audu specifisku darbību, kas ļautu iedarboties uz konkrētiem orgāniem slimību gadījumā. Peļu sirdīs glutapirons pazemināja azidotimidīna (mitohondrijus bojājošs medikaments HIV ārstēšanai) inducētu kaspāzes 3 ekspresijas pieaugumu, bet neietekmēja tās aktivēšanu, kas ir saistīta ar apoptozi. Savukārt smadzeņu audos glutapirons kombinācijā ar azidotimidīnu neizmainīja kaspāzes 3 proteīna ekspresiju, bet stimulēja tās aktivēšanu (Pupure *et al.*, 2008).

Mūsu pētījumā glutapirons palielināja *Parp1* un *H2ax* gēnu ekspresiju diabētisku žurku nierēs, bet samazināja to asinīs. *Parp1* ekspresiju tas paaugstināja arī kontroles grupu nierēs. Citi autori ziņo, ka diabētisku žurku asinīs glutapirons devā 0,05 mg/kg stimulē DNS bojājumu veidošanos, bet, palielinot devu līdz 0,5 mg/kg, tas neietekmē diabēta paaugstināto DNS pārrāvumu līmeni (Rostoka, 2015).

4.2.3. AV-153 sāļu ietekme uz *Parp1* un *H2ax* gēnu un to proteīnu ekspresiju

AV-153 ir uzrādījis spēju veicināt DNS reparāciju ūdeņraža peroksīda, alkilējošu aģentu vai jonizējošas radiācijas izraisītu DNS bojājumu gadījumā šūnu kultūrā. AV-153 palielina poli(ADP-ribozes) līmeni un, visticamāk, stimulē DNS reparāciju, veicinot PARilēšanu (Ryabokon *et al.*, 2005; 2008).

Diabētisku žurku nierēs, sirdī un nervos AV-153-Na spēja samazināt paaugstināto PARP1 proteīna ekspresiju līdz kontroles līmenim, savukārt uz γ H2AX proteīna ekspresijas

līmeni šim savienojumam ietekme bija tikai sirds audos, kur tas samazināja diabēta paaugstināto ekspresiju, un kontroles grupu acs audos, kur ekspresijas līmenis pieauga. No otras puses, AV-153-Na statistiski ticami palielināja gan *Parp1*, gan *H2ax* gēna ekspresiju žurku nierēs un asinīs STZ inducēta diabēta modelī. Ir ziņots, ka asins šūnās DNS vienpavediena pārrāvumu līmeni AV-153-Na palielināja kontroles dzīvniekiem un diabētiskām žurkām (Rostoka, 2015). AV-153-Ca stimulēja abu gēnu ekspresiju nierēs gan STZ, gan aloksāna modelī. Diabētisku žurku aknās abos modeļos AV-153-Na ievērojami palielināja *Parp1* gēna ekspresiju, bet neizmainīja *H2ax* ekspresiju. Savukārt AV-153-Ca dzīvnieku aknās tikai aloksāna modelī palielināja *Parp1* un pazemināto *H2ax* ekspresiju. Iespējams, AV-153-Ca ietekme ir labvēlīga; savienojums varētu veicināt DNS reparāciju aknās.

Domājams, diabēta izraisīšana un AV-153 sāļu pielietošana stimulēja vairāku veidu iedarbību uz PARP1 – paaugstinātais glikozes līmenis inducēja PARP1 aktivitāti, AV-153 saistījās pie DNS un, iespējams, vienlaicīgi inhibēja PARP1 enzīmu. AV-153 struktūra ļauj tam saistīties pie PARP1 aktīvajiem centriem līdzīgi, kā to dara PARP1 inhibitori (Buraka *et al.*, 2014). Šo notikumu un mijiedarbību rezultātā palielinājās *Parp1* gēna ekspresija, kas varētu būt kā atbildes reakcija samazinātajai proteīna ekspresijai. Arī citos gadījumos ir novērots, ka proteīnu ekspresijas inhibēšana ir tiešā veidā saistīta ar gēnu pārekspressiju. Tam par iemeslu ir minēti transkripcijas un translācijas atšķirīgie regulatorie mehānismi (Radulovic and Tronson, 2008).

4.3. *Xdh* gēna ekspresijas izmaiņas inducēta cukura diabēta modelī 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē

ROS ir nozīmīga loma vaskulārā iekaisuma attīstībā un endotēlija disfunkcijā cukura diabēta pacientiem. Pastiprinātā superoksīda radikāļu ģenerēšana ir saistīta ar palielinātu XOR enzīma aktivitāti, kas purīnu degradācijas noslēdzošajos soļos piedalās hipoksantīna oksidācijā par ksantīnu un ksantīna oksidācijā par urīnskābi (Matsumoto *et al.*, 2003; Battelli *et al.*, 2014).

Mūsu pētījumā žurku nierēs *Xdh* gēna ekspresija bija statistiski ticami paaugstināta aloksāna diabēta modelī. Savukārt STZ diabēta modelī varēja novērot šī gēna ekspresijas pieaugšanas tendenci. Citi autori ziņo par statistiski ticami palielinātu *Xdh* gēna un XO proteīna ekspresiju nierēs un paaugstinātu urīnskābes līmeni serumā žurkām ar STZ izraisītu diabētu. Urīnskābes līmenis cieši korelē ar albuminūriju diabētiskās žurkās, liecinot, ka traucētais purīnu metabolisms ir saistīts ar diabētiskās nefropātijas attīstību. Turklāt šo žurku

nierēs ir palielināts oksidatīvais stress un iekaisuma reakcijas, ko stimulē aktivētais NF-κB ceļš (Liu *et al.*, 2015). XO un XDH aktivitāšu inhibēšana ar febuksostatu, kas ir XO specifisks inhibitors, mazina iekaisumu, oksidatīvo stresu un diabētisku nieru bojājumus (Lee *et al.*, 2014).

Kontroles grupu nierēs *Xdh* gēna ekspresiju stimulēja etkarbatons, J-9-125 un glutapirons. Diabētisku žurku nierēs *Xdh* gēna ekspresijas pastiprinošu efektu uzrādīja metkarbatons, J-9-125, glutapirons un abi AV-153 sāļi. No vienas puses, palielināta *XDH* mRNS ekspresija nierēs ir vērojama dažādu patoloģiju gadījumā, kas saistāmas arī ar paaugstinātu XO aktivitāti, piemēram, diabēta laikā (Liu *et al.*, 2015) un nefropatogēnā infekciozā bronhīta vīrusa infekcijas gadījumā (Lin *et al.*, 2015). Tomēr ir jāņem vērā, ka, piemēram, proteīnu sintēzes inhibitori stimulē *XDH* gēna ekspresiju, bet samazina proteīna ekspresiju, kā tas ir cikloheksamīda ietekmē (Seymour *et al.*, 2006). Līdz ar to nevar izslēgt iespējamību, ka 1,4-DHP atvasinājumi, no vienas puses, palielina *Xdh* gēna ekspresiju nierēs, bet, no otras puses, samazina XOR proteīna ekspresiju un XO aktivitāti, kam būtu labvēlīgs efekts diabētiskās nefropātijas gadījumā.

Žurku aknās aloksāna un STZ diabēta gadījumā nenovērojām statistiski ticamas atšķirības *Xdh* gēna ekspresijā no kontroles grupas. Pelēm pēc 10 nedēļu diabēta, kas izraisīts ar STZ, ir novērota nemainīga XO proteīna ekspresija aknās un sirdī, kā arī nemainīga *Xdh* gēna ekspresija sirdī, bet pastiprināta XO aktivitāte šajos orgānos. Allopurinols, kas ir XO inhibitors, samazina XO aktivitāti, bet neietekmē XO proteīna ekspresiju aknās un sirdī vai *Xdh* mRNS līmeni sirdī (Rajesh *et al.*, 2009). Līdzīgi kā pelēs, arī žurku aknās gan pēc STZ, gan pēc aloksāna diabēta izraisīšanas ir novērota pastiprināta XO aktivitāte, kas stimulē NF-κB ceļa darbību. Aknās palielinās interleikīna 1β, interleikīna 6 un iNOS proteīnu līmeņi, norādot uz iekaisuma stāvokļa attīstību. Savukārt XO inhibīcija pasargā no oksidatīvā stresa un ar to saistītajiem fizioloģiskajiem un patoloģiskajiem procesiem (Romagnoli *et al.*, 2010). Mūsu darbā abi aknās analizētie 1,4-DHP atvasinājumi, AV-153-Na un AV-153-Ca, neietekmēja *Xdh* gēna ekspresiju diabētiskiem dzīvniekiem, bet šis fakts pats par sevi vēl neļauj spriest par iespējamo ietekmi uz XO aktivitāti.

Žurku asinīs ar STZ inducētu diabētu novērojām paaugstinātu *Xdh* gēna ekspresiju. To varētu skaidrot ar literatūrā aprakstīto palielināto XO un XDH līmeni diabētisku peļu asinīs. Šo peļu asins plazmā ir pastiprināta arī XO aktivitāte (Matsumoto *et al.*, 2003). Arī diabēta pacientiem plazmā var novērot paaugstinātu XOR aktivitāti, turklāt kopumā populācijā tā norāda uz augstu metabolo un kardiovaskulāro slimību risku (Furuhashi *et al.*, 2018). XO aktivitātes pieaugums plazmā zināmā mērā ir saistīts ar XO atbrīvošanu no aknām (Descio *et al.*, 2002). Līdzīgu XO atbrīvošanu var novērot arī, piemēram, hepatiskās išēmijas gadījumā

(Yokoyama *et al.*, 1990). Purīnu katabolisma galaprodukta urīnskābes līmenis serumā ir paaugstināts diabētiskām pelēm (Matsumoto *et al.*, 2003). Tam varētu būt saistība ar palielināto XO, XDH un *Xdh* līmeni. Cukura diabēta pacientiem seruma urīnskābes līmenis korelē ar diabētiskās nefropātijas attīstību tālākā slimības gaitā (Hovind *et al.*, 2009).

Kontroles grupu asinīs 1,4-DHP atvasinājumi neietekmēja *Xdh* gēna ekspresiju. Savukārt diabētisko žurku asinīs vairāki 1,4-DHP atvasinājumi, etkarbatons, J-9-125 un glutapirons, statistiski ticami samazināja *Xdh* gēna ekspresiju, kaut arī J-9-125 un glutapirons to bija palielinājuši nierēs. *Xdh* gēna ekspresijas samazinājums varētu liecināt par XO un XDH proteīnu līmeņa samazināšanos asinīs, kas tālāk normalizētu oksidatīvā stresa līmeni un tam varētu būt terapeitisks efekts cukura diabēta gadījumā.

Citi autori ziņo, ka antioksidantu izmantošana diabētisku žurku ārstēšanā samazina pastiprināto XO aktivitāti nierēs, aknās un sirdī (Ghaffari *et al.*, 2012). Tas ļauj domāt, ka arī 1,4-DHP atvasinājumi, kuriem piemīt antioksidatīvas īpašības, varētu samazināt šī enzīma aktivitāti diabēta gadījumā un nodrošināt potenciāli labvēlīgu ietekmi uz organismu.

4.4. Proteasomu gēnu ekspresijas izmaiņas 1. tipa cukura diabēta un 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē

Šajā darbā 1. tipa cukura diabēta modeļos noteicām četru proteasomu gēnu ekspresiju. Izvēlēti bija 20S proteasomas divu α subvienību gēni *Psm3* un *Psm6*, un viens β subvienības gēns *Psm5*, kam piemīt himotripsīnam līdzīga aktivitāte, kā arī viena no 19S regulatorā kompleksa subvienībām – AAA-ATPāzes subvienība *Psmc6* ar šaperonam līdzīgo aktivitāti. Šo gēnu polimorfismiem ir atrastas asociācijas ar dažādām autoimūnajām slimībām (Kalnina *et al.*, 2014; Kupca *et al.*, 2013; Paramonova *et al.*, 2014; Sjakste *et al.*, 2007, 2014, 2016; Wang *et al.*, 2013).

Izraisot žurkām 1TCD ar STZ un aloksānu, novērojām palielinātu *Psm3*, *Psm6* un *Psmc6* gēnu ekspresiju nierēs. *Psm3* gēna ekspresija bija palielināta arī asinīs, savukārt aknās tā bija samazināta. *Psm6* un *Psmc6* gēnu ekspresija ne aknās, ne asinīs statistiski ticami nemainījās pēc cukura diabēta izraisīšanas. Citi autori ir novērojuši, ka žurku muskuļos STZ inducēta cukura diabēta modelī notiek intensīvāka vairāku proteasomu subvienību gēnu ekspresija, piemēram, *Psm1*, *Psm5*, *Psmc4* un *Psm11* (Lecker *et al.*, 2004), kā arī *Psm2*, *Psm1* un *Psm4* (Price *et al.*, 1996). Paaugstinātais proteasomu subvienību mRNS daudzums atspoguļo transkripcijas aktivitāti, kas nepieciešama proteasomu *de novo* biogēnēzei (Merforth *et al.*, 2003). Attiecībā uz PSMA6 proteīna ekspresiju, ir novērots tās kritums gan nieru garozā diabēta žurku modeļos, gan diabētiskās nefropātijas pacientu nieru audos. Šūnu

kultūras diabētiskās nefropātijas modelī arī ir vērojams šī proteīna ekspresijas samazinājums, savukārt *PSMA6* gēna ekspresija ir bez statistiski ticamām izmaiņām, tomēr ar tendenci palielināties (Feng *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2010). Mūsu rezultāti ir līdzīgi. Citi autori norāda, ka *PSMA6* proteīna ekspresija diabētiskās nefropātijas gadījumā tiek kontrolēta jau pēc transkripcijas, turklāt par to atbildīgs ir miRNS-4490, kas inhibē *PSMA6* proteīna ekspresiju (Feng *et al.*, 2018).

Psm5 subvienības gēna ekspresija nebija statistiski ticami atšķirīga STZ un kontroles grupu nierēs, aknās vai asinīs. Pētot proteasomu peptidāžu aktivitātes ilgtermiņā, citi autori konstatēja, ka sirds audos sākotnēji palielinās visas trīs aktivitātes, bet, diabētam progresējot, tās ievērojami samazinās (Li *et al.*, 2017). Arī citos darbos ir vērojams, ka īstermiņa pētījumos (mazāk kā divas nedēļas) proteasomu aktivitāte ir palielināta, bet ilgtermiņa pētījumos (vairāk kā mēnesis) tā ir samazināta. STZ diabēta modeļa peļu sirds muskuļos desmit dienas pēc diabēta ierosināšanas ir palielināta ubikvitīna mRNS ekspresija un himotripsīnam līdzīgā aktivitāte (Hu *et al.*, 2008). Savukārt hiperglikēmijas stāvoklī peļu aortā pēc vairāku mēnešu diabēta proteasomām ir samazināta himotripsīna aktivitāte, bet nemainīgas kaspāzei un tripsīnam līdzīgās aktivitātes. Nierēs ir samazinātas visas trīs aktivitātes, bet sirds audos izmaiņas nav konstatētas (Queisser *et al.*, 2010).

Mēs analizējām 1,4-DHP atvasinājumu ietekmi uz proteasomu gēnu ekspresiju žurkās. Kopumā 1,4-DHP atvasinājumiem bija stimulējošs efekts uz proteasomu gēnu ekspresiju žurku nierēs. Kontroles grupu nierēs visi savienojumi palielināja apskatīto gēnu ekspresiju, izņemot AV-153-Ca. *Psm3* gadījumā, neskaitot AV-153-Ca, arī glutapirons bija bez ietekmes. Pretstatā nierēm, kontroles grupu žurku asinīs pētītie savienojumi statistiski ticamas izmaiņas neieviesa, un tikai glutapirons palielināja *Psm6* un *Psm5* gēnu ekspresiju. Kontroles grupu žurku aknās, kur tika pētīti divi savienojumi, AV-153-Na un AV-153-Ca, gēnu ekspresijas stimulējošu efektu varēja novērot *Psm6* gadījumā, kur to palielināja abi savienojumi, un *Psmc6* gadījumā, kur to palielināja tikai AV-153-Na.

Žurku nierēs ar STZ izraisītu diabētu 1,4-DHP atvasinājumu ietekme nebija tik izteikta kā kontroles grupās. Vienīgi *Psm5* gēna gadījumā visi apskatītie savienojumi palielināja ekspresiju. Metkarbatons, glutapirons un AV-153-Na palielināja visu četru gēnu ekspresiju. J-9-125 palielināja *Psm6*, *Psm5* un *Psmc6* gēnu ekspresiju. Etkarbatons šādu efektu uzrādīja *Psm3* un *Psm5* gēniem, bet AV-153-Ca pastiprināja *Psm3*, *Psm6* un *Psm5* ekspresiju. Alokšana grupās AV-153-Ca palielināja visu četru gēnu ekspresiju, bet AV-153-Na – *Psm3* un *Psm6* gēnu ekspresiju.

Viena no pētījumos aprakstītajām diabētiskās nefropātijas ārstēšanas stratēģijām ir proteasomu inhibitoru lietošana, kuri supresē proteasomālo aktivitāti. Tā, piemēram, MG132

spēj novērst diabētiskās nefropātijas veidošanos pelēs, kurām ārstēšana uzsākta divas nedēļas pēc diabēta izraisīšanas. MG132 inhibē transkripcijas faktora Nrf2 un IκB proteasomālo degradāciju. Nrf2 stimulē antioksidantu gēnu ekspresiju, savukārt IκB saistās pie NF-κB, tādējādi novēršot NF-κB veicinātu iekaisuma gēnu transkripciju. Rezultātā MG132 piedalās oksidatīvā stresa un iekaisuma mazināšanā, nodrošinot nierēm aizsardzību pret diabēta izraisītiem bojājumiem (Kong *et al.*, 2017). Pētot proteasomu inhibitoru ietekmi uz proteasomu gēnu ekspresiju zīdītāju šūnās, atklājās, ka proteasomu inhibēšana veicina proteasomu subvienību gēnu transkripcijas aktivēšanu, kas pastiprina proteasomālo mRNS ekspresiju un tai sekojošu proteasomu *de novo* biogēnēzi. Tas liecina, ka proteasomu homeostāzi zīdītājiem kontrolē pozitīvās autoregulācijas mehānisms. Proteasomu aktivitātes inhibēšana galvenokārt palielina 20S un 19S proteasomu subvienību mRNS ekspresiju, gandrīz neietekmējot imunosubvienības vai PA28 regulatoru (Meiners *et al.*, 2003). Līdzīgi, mūsu novērotā proteasomu ekspresijas stimulēšana nierēs 1,4-DHP atvasinājumu klātbūtnē arī varētu norādīt uz savienojumu labvēlīgu ietekmi.

Diabētisko žurku aknās *Psm3*, *Psm6* un *Psmc6* gēnu ekspresiju stimulējošs efekts bija AV-153-Na, bet *Psm5* gēna ekspresija nemainījās analizēto AV-153 sāļu ietekmē. Alokšana grupās *Psm6* ekspresiju stimulēja arī AV-153-Ca. Literatūrā ir ziņots, ka pēc trīs mēnešu ilga STZ izraisīta diabēta žurku aknās ir samazināta proteolītiskā aktivitāte, kas traucē oksidatīvi bojāto proteīnu aizvākšanu (Portero-Otín *et al.*, 1999). Alokšana izraisīta diabēta gadījumā aknās ir samazināta himotripsīnam līdzīgā aktivitāte un palielināta tripsīnam līdzīgā aktivitāte, bet nemainīga kaspāzei līdzīgā aktivitāte (Alexandrova *et al.*, 2006). Aptaukošanās un 2TCD laikā samazinās proteasomu aktivitāte, bet palielinās UPS gēnu ekspresija. Var novērot poliubikvitinētu proteīnu uzkrāšanos, endoplazmatiskā tīkla stresu, bojātas organellas, rezistenci pret insulīnu (Otodo *et al.*, 2013). Līdzīgi kā nierēs, arī aknās proteasomu gēnu ekspresijas stimulēšanai diabētiskās žurkās varētu būt pozitīvs efekts.

Diabētisko dzīvnieku asinīs izmaiņas izraisīja AV-153-Na, kas pastiprināja visu pētīto proteasomu gēnu ekspresiju, un etkarbatons, kas palielināja *Psm6* gēna ekspresiju, bet pazemināja pārējo trīs proteasomu gēnu ekspresiju. Citi savienojumi nebija efektīvi. Par proteasomu darbību asinīs 1. tipa cukura diabēta laikā literatūrā trūkst datu. Saistībā ar citām slimībām ir novērota dažāda ietekme uz proteasomu aktivitāti atkarībā no slimības. Alzheimeras slimības pacientiem mononukleārajās asinīs šūnās ir palielināta ubikvitīna aktivējošā enzīma E1 koncentrācija un samazināta ubikvitīna konjugējošā enzīma E2 koncentrācija, tomēr pašu proteasomu aktivitāte ir nemainīga. Pārkinsona slimības pacientiem ir samazināta gan E2 koncentrācija, gan proteasomu aktivitāte. Viegļu kognitīvu traucējumu gadījumā E1 un E2 ekspresija, kā arī proteasomu aktivitāte nemainās (Ullrich *et al.*, 2010).

Tā kā ilgtermiņa diabēta pētījumos tika konstatēts, ka sākotnējai proteasomu aktivēšanai seko to darbības traucējumi (Li *et al.*, 2017), tad kopumā var spriest, ka palielinātajai proteasomu gēnu ekspresijai 1,4-DHP atvasinājumu klātbūtnē diabēta modelī varētu būt labvēlīga ietekme uz slimības gaitu. Domājams, 1,4-DHP atvasinājumi ir iesaistīti proteasomu *de novo* bioģenēzē. Tie varētu palīdzēt nomākt, piemēram, PSMA6 proteīna ekspresijas inhibīciju, ko diabētiskās nefropātijas gadījumā veic miRNA-4490 (Feng *et al.*, 2018), un atjaunot proteasomu funkcijas. Turklāt viens no proteolītisko subvienību gēniem – *Psm5* – nierēs tika stimulēts visu apskatīto 1,4-DHP atvasinājumu klātbūtnē. Tas varētu veicināt poliubukvitinēto proteīnu degradēšanu un diabētiskā stāvokļa uzlabošanu.

Ir zināms, ka oksidatīvā stresa laikā notiek saistīšanās starp kodola 20S proteasomām, PARP1 un poli-ADPribozi, kas rezultējas ar proteasomu aktivēšanu un efektīvāku oksidatīvi bojāto histonu likvidēšanu. Turklāt PARP1 aktivitātes inhibitori spēj mazināt pastiprināto proteolītisko aktivitāti kodolā (Ullrich *et al.*, 1999). Analizējot *Parp1* un proteasomu gēnu ekspresiju, novērojām, ka tā ne vienmēr uzrāda kopīgas tendences, īpaši, ņemot vērā katras proteasomas subvienības gēna ekspresijas atšķirības atsevišķos apstākļos. Stimulējošu ietekmi uz visu šo gēnu ekspresiju nierēs novērojām metkarbatona, glutapirona un abu AV-153 sāļu gadījumā. Jāņem vērā, ka PARP1 stimulē proteasomu aktivitāti tieši šūnas kodolā (Ullrich *et al.*, 1999), bet diabēta gadījumā proteasomu darbība ir izmainīta arī citoplazmā.

4.5. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekme uz Tat proteīna izraisītiem DNS bojājumiem

Papildus 1,4-DHP atvasinājumu darbībai cukura diabēta modelī, mēs analizējām vairāku savienojumu ietekmi uz DNS divpavedienu bojājumiem B-limfocītos, kas ir vienlaicīgi transkribēti ar Tat proteīnu. HIV-1 Tat proteīns var iekļūt dažādos šūnu tipos, kur tas aktivizē gan vīrusa, gan šūnas gēnus. Tas varētu būt iesaistīts B-šūnu limfomu attīstībā. Tat izraisa mitohondriālo ROS ģenerēšanu, kas rezultējas ar NF- κ B aktivēšanu, oksidatīvo stresu un DNS bojājumiem. Šādos apstākļos organismam labvēlīgu ietekmi varētu panākt ar antioksidantiem, kas būtu mērķēti uz mitohondrijiem (El-Amine *et al.*, 2018). Dihidropiridīni ir mitohondriotropiski savienojumi. Daži no tiem pasargā mitohondrijus oksidatīvā stresa laikā, piedalās šūnu ultrastruktūru intracelulārajā bojājumu novēršanā un fizioloģiskajā reģenerācijā (Veleno *et al.*, 2016).

Jau iepriekš ir novērota AV-153 spēja veicināt DNS pavedienu pārrāvumu reparāciju (Ryabokon *et al.*, 2005). Šajā pētījumā visi apskatītie AV-153 sāļi novērsa DNS divpavedienu pārrāvumu veidošanos B-limfocītos Tat proteīna ietekmē, kaut arī tiem ir zema

hidroksilradikāļu savākšanas aktivitāte (Leonova *et al.*, nepublicēti dati). AV-153-Mg pozitīvais efekts parādījās pie zemākas koncentrācijas, salīdzinot ar pārējiem AV-153 savienojumiem. Tam iemesls varētu būt tas, ka no šiem savienojumiem AV-153-Mg vislabāk spēj saistīties pie DNS molekulas (Leonova *et al.*, nepublicēti dati). Arī salīdzinot DNS saistošā AV-153-Na un DNS nesaistošā AV-154-Na spēju pasargāt HeLa šūnas no peroksinitrīta izraisītiem bojājumiem, tieši DNS saistošais savienojums izrādījās efektīvs (Leonova *et al.*, 2018).

AV-153-Na pārbaudījām plašākā koncentrāciju diapazonā un konstatējām, ka tā efektivitāte mazinās gan pārāk augstās, gan pārāk zemās koncentrācijās. Tas saskan ar iepriekš aprakstītiem datiem par AV-153, kas spēj samazināt eksogēnu faktoru (ūdeņraža peroksīda, jonizējošās radiācijas, etilmetāna sulfonāta) izraisītus DNS bojājumus gan mononukleārajos limfocītos, gan citos šūnu tipos noteiktā koncentrāciju diapazonā. Palielinot vai samazinot koncentrāciju, šis efekts zūd (Ryabokon *et al.*, 2005). Iespējams, AV-153-Na pārāk augstās koncentrācijās zaudē savas DNS-aizsargājošās īpašības un kļūst toksisks, jo DNS saistošie savienojumi var būt mutagēni (Gurova, 2009).

No pārējiem apskatītajiem savienojumiem metkarbatons un glutapirons DNS aizsargājošu efektu uzrādīja augstākās koncentrācijās, salīdzinot ar AV-153 savienojumiem. Citi autori ir parādījuši, ka glutapirons līdz pat 100 μM koncentrācijai neietekmē mitohondriju bioenerģētiku – elpošanas aktivitāti, mitohondriālo transmembrānu potenciālu, ADP fosforilēšanas efektivitāti. Tas norāda, ka glutapirons nav toksisks mitohondrijiem, kas ir svarīgi, jo mijiedarbība ar mitohondriju membrānām varētu traucēt oksidācijas un fosforilācijas procesus, izraisot bioenerģētikas deficītu un novedot pie vairāku šūnu un organisma izdzīvošanai svarīgu funkciju zaudēšanas. No otras puses, glutapirons neietekmē ADP/Fe²⁺ izraisītu lipīdu peroksidāciju žurku aknu mitohondrijos (Fernandes *et al.*, 2003). Turpretī eritrocītu un sirds mitohondriju membrānās glutapirons inhibē brīvo radikāļu izraisītu lipīdu peroksidāciju. Glutapirons stabilizē membrānu struktūras un saglabā membrānās integrēto proteīnu funkcijas; tam ir kardioaizsargājošs efekts (Utano *et al.*, 1989).

J-9-125 bija nepieciešama zemāka koncentrācija nekā metkarbatonam B-šūnu aizsargājoša efekta sasniegšanai, kaut arī Fentona reakcijā labāku radikāļu savākšanas aktivitāti uzrādīja metkarbatons (Ošiņa *et al.*, 2017). Arī šeit, tā pat kā AV-153 sāļu gadījumā, efekts ātrāk bija vērojams savienojumam, kas labāk saista DNS, respektīvi, J-9-125 (Ošiņa *et al.*, 2017).

Šajā darbā analizēto 1,4-DHP atvasinājumu spēju pasargāt B-limfocītus no Tat proteīna izraisītiem DNS divpavedienu bojājumiem varētu skaidrot ar to mitohondriotropiskajām īpašībām, par ko ziņo citi autori (Velena *et al.*, 2016). Aizsargājošais efekts varētu būt panākts

ne tikai tieši iedarbojoties uz brīvajiem radikāļiem, bet arī aktivizējot DNS reparācijas sistēmu, jo inkubācijas laiks bija pietiekami ilgs, lai varētu izpausties šo savienojumu DNS reparāciju stimulējošās aktivitātes.

4.6. Noslēguma piezīmes

Apkopojot iegūtos rezultātus, varam secināt, ka izvirzītā hipotēze apstiprinās. Eksperimentā ar modeļdzīvniekiem novērojām, ka 1,4-DHP atvasinājumiem ir modulējošs efekts uz DNS reparācijā un proteolīzē iesaistīto enzīmu gēnu un proteīnu ekspresiju cukura diabēta gadījumā, turklāt ietekme ir orgānu specifiska. Žurku nierēs analizētie 1,4-DHP atvasinājumi (metkarbatons, etkarbatons, J-9-125, glutapirons, AV-153-Na un AV-153-Ca) lielākoties pastiprināja *Parp1*, *H2ax*, *Xdh*, *Psm3*, *Psm6*, *Psm5* un *Psm6* gēnu ekspresiju. Gandrīz visu gēnu gadījumā šāds efekts bija vērojams metkarbatonam, glutapironam un AV-153 sāļiem. Aknās un asinīs līdzīga ietekme bija AV-153-Na. Savukārt etkarbatons asinīs samazināja gandrīz visu pētīto gēnu ekspresiju. Tas spēja normalizēt arī diabēta paaugstināto šķeltā PARP1 proteīna ekspresiju nierēs, sirdī un nervos. AV-153-Na samazināja diabēta inducēto PARP1 proteīna ekspresijas pieaugumu šajos orgānos, kā arī palielināto γ H2AX proteīna ekspresiju diabētisku žurku sirds audos.

In vitro eksperimentā novērojām, ka 1,4-DHP atvasinājumiem ir DNS molekulu pasargājoša ietekme pret Tat proteīna izraisītiem bojājumiem. Visi analizētie 1,4-DHP atvasinājumi (AV-153-Na, AV-153-Ca, AV-153-Mg, AV-153-K, metkarbatons, J-9-125, glutapirons un PP-544-Na) normalizēja Tat proteīna palielināto γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu procentuālo daudzumu paraugos.

Kopumā var spriest, ka analizētajai savienojumu grupai ir terapeitisks potenciāls. Šie savienojumi ir perspektīvi tālākai izpētei slimībās, kas ir saistītas ar oksidatīvā stresa izraisītiem bojājumiem.

5. SECINĀJUMI

1. Vairums analizēto 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu modulē *Parp1* gēna ekspresiju žurku nierēs, asinīs un aknās, PARP1 proteīna ekspresiju nierēs, sirdī un nervos, bet c-PARP1 proteīna ekspresiju nierēs, sirdī, acīs un nervos cukura diabēta modelī.

Lielākā daļa analizēto 1,4-DHP atvasinājumu pastiprina *Parp1* gēna ekspresiju nierēs kontroles un modeļa dzīvniekiem. AV-153-Na un AV-153-Ca šī gēna ekspresiju palielina gan STZ modelī, gan aloksāna modelī. Žurku asinīs modeļa dzīvniekiem etkarbatons un glutapirons samazina diabēta paaugstināto *Parp1* gēna ekspresiju, bet AV-153-Na to palielina. Žurku aknās AV-153-Na pastiprina *Parp1* gēna ekspresiju gan kontroles, gan modeļdzīvniekiem. AV-153-Na samazina diabēta paaugstināto PARP1 proteīna ekspresiju nierēs, sirdī, nervos. Metkarbatons samazina diabēta paaugstināto c-PARP1 proteīna ekspresiju sirdī, bet etkarbatons – arī nierēs un nervos. Stimulējošu efektu etkarbatons uzrāda acs audos.

2. Vairums analizēto 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu modulē *H2ax* gēna ekspresiju žurku nierēs, asinīs un aknās, bet γ H2AX proteīna ekspresiju nierēs un sirdī cukura diabēta modelī.

H2ax gēna ekspresija nemainās žurku nierēs pēc 1. tipa cukura diabēta izraisīšanas; to pastiprina glutapirons un AV-153-Ca. Asinīs paaugstināto *H2ax* gēna ekspresiju samazina etkarbatons un glutapirons, bet palielina AV-153-Na. Aknās diabēta izraisīšana samazina šī gēna ekspresiju, bet aloksāna diabēta modelī AV-153-Ca to normalizē. γ H2AX līmenis diabēta modelī paaugstinās sirdī, bet AV-153-Na to mazina. Etkarbatons veicina šī proteīna ekspresiju nierēs un sirdī.

3. Vairums analizēto 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu modulē *Xdh* gēna ekspresiju žurku nierēs un asinīs cukura diabēta modelī.

Xdh gēna ekspresiju diabētisku žurku nierēs palielina metkarbatons, J-9-125, glutapirons, AV-153-Na un AV-153-Ca. Asinīs diabēta palielināto *Xdh* gēna ekspresiju samazina etkarbatons, J-9-125 un glutapirons. Aknās izmaiņas nav novērotas.

4. Vairums analizēto 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu modulē *Psm3*, *Psm6*, *Psm5* un *Psm6* gēnu ekspresiju žurku nierēs, asinīs un aknās cukura diabēta modelī.

Nierēs 1. tipa cukura diabēta modelī palielinās *Psm3*, *Psm6* un *Psm6* gēnu ekspresija. Vairums analizēto 1,4-DHP atvasinājumu stimulē šo proteasomu gēnu

ekspresiju gan kontroles, gan diabētisko dzīvnieku nierēs. Asinīs STZ modelī AV-153-Na palielina visu četru apskatīto proteasomu gēnu ekspresiju. Etkarbatons to palielina tikai *Psmab* gēnam, bet pārējiem gēniem – samazina. Arī diabētisko žurku aknās AV-153-Na palielina proteasomu gēnu ekspresiju, ar izņēmumu *Psmb5* gēna gadījumā.

5. Tat proteīns palielina γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu procentuālo daudzumu, bet visi testētie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi (AV-153-Na, AV-153-Ca, AV-153-Mg, AV-153-K, metkarbatons, J-9-125, glutapirons un PP-544-Na) to spēj normalizēt.

6. AIZSTĀVĒŠANAI IZVIRZĪTĀS TĒZES

1. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi ietekmē ar DNS reparāciju saistītu enzīmu gēnu un proteīnu ekspresijas līmeni cukura diabēta modelī.
2. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi ietekmē proteolīzes enzīmu gēnu ekspresijas līmeni cukura diabēta modelī.
3. 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi normalizē γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu procentuālo daudzumu pēc vienlaicīgas transfekcijas ar Tat proteīnu.

7. PĒTĪJUMA REZULTĀTU PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI

Raksti starptautiski recenzējamās izdevumos:

1. **Ošina K**, Leonova L, Isajevs S, Baumanē L, Rostoka E, Sjakste T, Bisenieks E, Duburs G, Vīgante B, Sjakste N. 2017. Modifications of expression of genes and proteins involved in DNA repair and nitric oxide metabolism by carbatonides [disodium-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-bis(carboxyloxyacetate) derivatives] in intact and diabetic rats. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 68:212–227. doi: 10.1515/aiht-2017-68-2945.
2. **Ošina K**, Rostoka E, Isajevs S, Sokolovska J, Sjakste T, Sjakste N. Effects of an Antimutagenic 1,4-Dihydropyridine AV-153 on Expression of Nitric Oxide Synthases and DNA Repair-related Enzymes and Genes in Kidneys of Rats with a Streptozotocin Model of Diabetes Mellitus. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2016;119(5):458–463. doi: 10.1111/bcpt.12617.
3. **Ošina K**, Rostoka E, Sokolovska J, Paramonova N, Bisenieks E, Duburs G, Sjakste N, Sjakste T. 1,4-Dihydropyridine derivatives without Ca²⁺-antagonist activity up-regulate Psmα6 mRNA expression in kidneys of intact and diabetic rats. Cell Biochem Funct. 2016;34(1):3–6. doi: 10.1002/cbf.3160.

Konferenču tēzes par pētāmo tēmu

Referāti starptautiskās konferencēs:

1. **Ošina K**, Rostoka E, Paramonova N, Sjakste N. Expression of poly(ADP-ribose) polymerase 1 gene in kidneys of diabetic rats treated with AV-153-Na and AV-153-Ca. The 60th International Scientific Conference of Daugavpils University, April 26–27, 2018, Daugavpils, Latvia. In book of abstract (98–99 pp).
2. **Ošina K**, Rostoka E, Sjakste N. Modifications of expression of *Psmα3* gene by 1,4-dihydropyridine derivatives in kidneys of diabetic rats. The 59th International Scientific Conference of Daugavpils University, April 6–7, 2017, Daugavpils, Latvia. In book of abstract (134 pp.).
3. Sjakste T, **Ošina K**, Rostoka E. Modification of genes involved in DNA repair and nitrosative stress by 1,4–dihydropyridienes. International Conference of Environmental and Occupational Health ICOETox, Porto, June 21–23, 2016. In book of abstract (83 pp.).

4. **Ošina K**, Rostoka E, Sjakste T, Sjakste N. *Psmab* gene expression is affected by 1,4-dihydropyridine derivatives in rat kidneys and blood in streptozotocin induced *diabetes mellitus*. The 58th International Scientific Conference of Daugavpils University, April 14–15, 2016, Daugavpils, Latvia. In book of abstract (99–100 pp.).
5. **Ošina K**, Rostoka E, Sjakste T, Sjakste N. Regulation of DNA-repair, nitrosative stress-related and proteasomal gene expression by 1,4-dihydropyridines in diabetic animals. VIII International Meeting from Molecular to Cellular Events in Human Pathologies, October 18–20, 2015, Tbilisi, Georgia: Biopolymers and Cell Supplementary Vol. 31, P. 28
6. **Ošina K**, Rostoka E, Sjakste T, Duburs G, Sjakste N. *In vivo* experiments aimed on search for molecules with both antioxidant and DNA repair enhancing activities. Drug Discovery Conference, August 27–29, 2015, Riga, Latvia. In book of abstract (77 pp.).
7. **Ošina K**, Rostoka E, Sjakste T, Duburs G, Sjakste N. Effects of metcarbatone on iNOS and PARP1 gene expression and DNA integrity in streptozotocin induced diabetes mellitus type 1 in rat. International Conference on Diabetes and Obesity. 2015, July 2–3, 2015, Riga, Latvia. In book of abstract (135 pp.).
8. Sjakste T, **Ošina K**, Rostoka E. Water soluble 1,4-dihydropyridines modify PARP1, eNOS and iNOS gene expression in healthy animals and in streptozotocin-induced model of diabetes mellitus. A Symposium on Diabetes, May 4–7, 2015, Athens, Greece. In book of abstract (98–99 pp.)

Referāti vietējās konferencēs:

1. **Ošina K**, Rostoka E, Sjakste N. Vairāku proteasomu gēnu ekspresija žurku nierēs un aknās streptozotocīna inducēta cukura diabēta apstākļos AV-153-Ca ietekmē. Latvijas Universitātes 76. starptautiskā zinātniskā konference. *Environ Exp Biol.* 2018;16:84.
2. **Ošina K**, Rostoka E, Sjakste N. AV-153-Ca ietekme uz DNS labošanas un slāpekļa oksīda metabolisma saistīto gēnu ekspresiju žurku nierēs aloksāna inducēta cukura diabēta apstākļos. Latvijas Universitātes 75. starptautiskā zinātniskā konference. *Environ Exp Biol.* 2017;15:80.
3. **Ošina K**, Germini D, Botha S, Vassetzky Y, Sjakste T, Sjakste N. 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumi samazina Tat proteīna izraisītu γ -H2AX ekspresiju B limfocītos. Latvijas Universitātes 74. starptautiskā zinātniskā konference. *Environ Exp Biol.* 2016;14:49.

8. PATEICĪBAS

Izsaku lielu pateicību promocijas darba vadītājam prof. Dr. habil. biol. Nikolajam Sjakstem, kā arī visiem Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas laboratorijas, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes, Latvijas Organiskās sintēzes institūta un *Gustave Roussy* institūta (Villejuif, Francija) kolēģiem par palīdzību un atbalstu darbā.

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) un valsts pētījumu programmas „Biomedicīna sabiedrības veselībai (BIOMEDICINE)” atbalstu.

9. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Aghdam SY, Sheibani N. The ubiquitin-proteasome system and microvascular complications of diabetes. *J Ophthalmic Vis Res.* 2013;8(3): 244–256.
2. Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S, Okamoto H. Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing β -cell regeneration: Poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosyl)ation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(1):48–53.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science. 2002. 1463p.
4. Alexandrova A, Petrov L, Kirkova M. Proteasome activity in experimental diabetes. *Open Life Sciences*, 2006;1(2), 289–298.
5. Allard JP, Aghdassi E, Chau J, Salit I, Walmsley S. Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(1):143–147.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014;37(Suppl 1):S81–90.
7. American Diabetes Association 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39 (Suppl. 1):S13–S22.
8. Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. *Vascul Pharmacol.* 2013;58:259–271.
9. Atkinson MA. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11). pii: a007641.
10. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels A. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2014;383:69–82.
11. Battelli MG, Bolognesi A, Polito L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: new emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842:1502–1517.
12. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase in cancer: more than a differentiation marker. *Cancer Med.* 2016;5(3):546–557.
13. Ben-Nissan G, Sharon M. Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway. *Biomolecules.* 2014; 4:862–884.
14. Bennett RA, Pegg AE. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res.* 1981;41: 2786–2790.

15. Bitar MS, Abdel-Halim SM, Al-Mulla F. Caveolin-1/PTRF upregulation constitutes a mechanism for mediating p53-induced cellular senescence: implications for evidence-based therapy of delayed wound healing in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(8):E951–963.
16. Buraka E, Chen CY, Gavare M, Grube M, Makarenkova G, Nikolajeva V, Bisenieks I, Brūvere I, Bisenieks E, Duburs G, Sjakste N. DNA-binding studies of AV-153, an antimutagenic and DNA repair-stimulating derivative of 1,4-dihydropyridine. *Chem Biol Interact.* 2014;220:200–207.
17. Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, Wagner EF, Kolb H. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med.* 1999;5:314–319.
18. Capone C, Cervelli M, Angelucci E, Colasanti M, Macone A, Mariottini P, Persichini T. A role for spermine oxidase as a mediator of reactive oxygen species production in HIV-Tat-induced neuronal toxicity. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:99–107.
19. Cataldi M, Bruno F. 1,4-Dihydropyridines: the multiple personalities of a blockbuster drug family. *Transl Med UniSa.* 2012;4(2):12–26.
20. Chadwick BP1, Lane TF. BRCA1 associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. *Chromosoma.* 2005;114(6):432–439.
21. Chakrabarti R, Chen M, Liu W, Chen S. Preventive effects of benfotiamine in chronic diabetic complications. *J Diabetes Investig.* 2011;2(2):123–131.
22. Chen C, Lü JM, Yao Q. Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Med Sci Monit.* 2016;22:2501–2512.
23. Chen GL, Ye T, Chen HL, Zhao ZY, Tang WQ, Wang LS, Xia JL. Xanthine dehydrogenase downregulation promotes TGF β signaling and cancer stem cell-related gene expression in hepatocellular carcinoma. *Oncogenesis.* 2017;6(9):e382.
24. Chen YL, Chen KH, Yin TC, Huang TH, Yuen CM, Chung SY, Sung PH, Tong MS, Chen CH, Chang HW, Lin KC, Ko SF, Yip HK. Extracorporeal shock wave therapy effectively prevented diabetic neuropathy. *Am J Transl Res.* 2015;7(12):2543–2560.
25. Chew P, Yuen DY, Stefanovic N, Pete J, Coughlan MT, Jandeleit-Dahm KA, Thomas MC, Rosenfeldt F, Cooper ME, de Haan JB. Antiatherosclerotic and renoprotective effects of ebselen in the diabetic apolipoprotein E/GPx1-double knockout mouse. *Diabetes.* 2010;59(12):3198–3207.

26. Chondrogianni N, Petropoulos I, Franceschi C, Friguet B, Gonos ES. Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol.* 2000;35:721–728.
27. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha).* 1997;20(3):127–140.
28. Clark M, Kroger CJ, Tisch RM. Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2017;8:1898.
29. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal.* 2011;5(2):101–110.
30. Cromm PM, Crews CM. The Proteasome in Modern Drug Discovery: Second Life of a Highly Valuable Drug Target. *ACS Cent Sci.* 2017;3(8):830-838.
31. Dawicki-McKenna JM, Langelier MF, DeNizio JE, Riccio AA, Cao CD, Karch KR, McCauley M, Steffen JD, Black BE, Pascal JM. PARP1 activation requires local unfolding of an autoinhibitory domain. *Mol Cell.* 2015;60(5):755–768.
32. Dean PM, Matthews EK. The bioelectrical properties of pancreatic islet cells: effect of diabetogenic agents. *Diabetologia.* 1972;8(3): 173-178.
33. Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, Sastre J, Viña J. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes.* 2002;51(4):1118–1124.
34. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J.* 2002;20:556–563.
35. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 2012 Dec 31;327(1–2):26–47.
36. Drel VR, Xu W, Zhang J, Pavlov IA, Shevalye H, Slusher B, Obrosova IG. Poly(Adenosine 5'-Diphosphate-Ribose) Polymerase Inhibition Counteracts Multiple Manifestations of Experimental Type 1 Diabetic Nephropathy. *Endocrinology.* 2009;150(12):5273–5283.
37. El-Amine R, Germini D, Zakharova VV, Tsfasman T, Sheval EV, Louzada RAN, Dupuy C, Bilhou-Nabera C, Hamade A, Najjar F, Oksenhendler E, Lipinski M, Chernyak BV, Vassetzky YS. HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production. *Redox Biol.* 2018;15:97–108.

38. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000;43(12):1528–1533.
39. Elsner M, Tiedge M, Guldbakke B, Munday R, Lenzen S. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia*. 2002;45:1542–1549.
40. Feng Y, Ming-yue J, Dong-wei L, Wei L. Proteasome subunit- α type-6 protein is post-transcriptionally repressed by the microRNA-4490 in diabetic nephropathy. *Biosci Rep*. 2018;38(5):BSR20180815.
41. Fernandes MA, Santos MS, Vicente JA, Moreno AJ, Veleno A, Duburs G, Oliveira CR. Effects of 1,4-dihydropyridine derivatives (cerebrocrast, gammapyrone, glutapyrone, and diethone) on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress: A comparative study. *Mitochondrion*. 2003;3(1):47–59.
42. Fernandes R, Ramalho J, Pereira P. Oxidative stress upregulates ubiquitin proteasome pathway in retinal endothelial cells. *Mol Vis*. 2006;12:1526–1535.
43. Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell*. 2003;4(4):497–508.
44. Ferrington DA, Gregerson DS. Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog Mol Bio. Transl Sci*. 2012;109:75–112.
45. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 2008;57:1446–54.
46. Francescato MP, Stel G, Geat M, Cauci S. Oxidative stress in patients with type 1 diabetes mellitus: is it affected by a single bout of prolonged exercise? *PLoS One*. 2014;9(6):e99062.
47. Furuhashi M, Matsumoto M, Tanaka M, Moniwa N, Murase T, Nakamura T, Ohnishi H, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Plasma Xanthine Oxidoreductase Activity as a Novel Biomarker of Metabolic Disorders in a General Population. *Circ J*. 2018;82(7):1892–1899.
48. Garcia-Soriano F, Virag L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KGK, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med*. 2001;7:108–113.

49. Ghaffari T, Nouri M, Saei AA, Rashidi MR. Aldehyde and xanthine oxidase activities in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats: effects of vitamin E and selenium supplementation. *Biol Trace Elem Res.* 2012;147(1-3):217–225.
50. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107:1058–1070.
51. Gibson BA, Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(7):411–424.
52. Giovannini C, Piaggi S, Federico G, Scarpato R. High levels of γ -H2AX foci and cell membrane oxidation in adolescents with type 1 diabetes. *Mutat Res.* 2014;770:128–135.
53. Gorus FK, Malaisse WJ, Pipeleers DG. Selective uptake of alloxan by pancreatic B-cells. *Biochem J.* 1982;208(2):513–515.
54. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: Diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care.* 2005;28:164–176.
55. Guo C, Liu Y, Zhao W, Wei S, Zhang X, Wang W, Zeng X. Apelin promotes diabetic nephropathy by inducing podocyte dysfunction via inhibiting proteasome activities. *J Cell Mol Med.* 2015;19(9):2273–85.
56. Gurova K. New hopes from old drugs: Revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. *Future Oncol.* 2009;5(10):1685.
57. Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:13978–13982.
58. Hassoun PM, Yu FS, Cote CG, Zulueta JJ, Sawhney R, Skinner KA, Skinner HB, Parks DA, Lanzillo JJ. Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;158(1):299–305.
59. Henikoff S, Smith MM. Histone variants and epigenetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7:a019364.
60. Higgins GC, Coughlan MT. Mitochondrial dysfunction and mitophagy: the beginning and end to diabetic nephropathy? *Br J Pharmacol.* 2014;171(8):1917–1942.
61. Hishikawa K, Luscher TF. Felodipine inhibits free-radical production by cytokines and glucose in human smooth muscle cells. *Hypertension.* 1998;32:1011–1015.
62. Hockerman GH, Peterson BZ, Johnson BD, Catterall WA. Molecular determinants of drug binding and action on l-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37(1):361–396.

63. Horwitz E, Krogvold L, Zhitomirsky S, Swisa A, Fischman M, Lax T, Dahan T, Hurvitz N, Weinberg-Corem N, Klochendler A, Powers AC, Brissova M, Jörns A, Lenzen S, Glaser B, Dahl-Jørgensen K, Dor Y. β -Cell DNA Damage Response Promotes Islet Inflammation in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2018;67(11):2305–2318.
64. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Johnson RJ, Parving HH. Serum uric acid as a predictor for development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: an inception cohort study. *Diabetes*. 2009;58(7):1668–1671.
65. Hu J, Klein JD, Du J, Wang XH. Cardiac muscle protein catabolism in diabetes mellitus: activation of the ubiquitin-proteasome system by insulin deficiency. *Endocrinology*. 2008;149:5384–5390.
66. Huambachano O, Herrera F, Rancourt A, Satoh MS. Double-stranded DNA binding domain of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and molecular insight into the regulation of its activity. *J Biol Chem* 2011; 286: 7149–7160.
67. Infante J, Sánchez-Juan P, Mateo I, Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Quintana C, Llorca J, Fontalba A, Terrazas J, Oterino A, Berciano J, Combarros O. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) genetic variants are protective against Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2007;256(1–2):68–70.
68. Ioan P, Carosati E, Micucci M, Cruciani G, Broccatelli F, Zhorov BS, Chiarini A, Budriesi R. 1,4-Dihydropyridine scaffold in medicinal chemistry, the story so far and perspectives (part 1): action in ion channels and GPCRs. *Curr Med Chem*. 2011;18(32):4901–4922.
69. Islas-Andrade S, Monsalve MCR, de la Peña JE, Polanco AC, Palomino MA, Velasco AF. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of the Two Models in Rats. *Acta Histochem cytochem*. 2000;33(3):201–208.
70. Jones RA, Johnson VL, Hinton RH, Poirier GG, Chow SC, Kass GE. Liver poly(ADP-ribose)polymerase is resistant to cleavage by caspases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;256(2):436–441.
71. Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet*. 2014;383:1068–1083.
72. Kalnina J, Paramonova N, Sjakste N, Sjakste T. Study of association between polymorphisms in the PSMB5 (rs11543947) and PSMA3 (rs2348071) genes and multiple sclerosis in Latvians. *Biopolym. Cell*. 2014;30(4): 305–309.
73. Kauppinen TM, Gan L, Swanson RA. 2013. Poly(ADP-ribose) polymerase-1-induced NAD⁺ depletion promotes nuclear factor- κ B transcriptional activity by preventing p65 de-acetylation. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(8):1985–1991.

74. Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(4):493–498.
75. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol.* 2003;56(1):1–10.
76. Khan S, Raghuram GV, Bhargava A, Pathak N, Chandra DH, Jain SK, Pradyumna KM. Role and clinical significance of lymphocyte mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Transl Res.* 2011;158:344–359.
77. Khedkar S. A., Auti P. B. 1,4-Dihydropyridines: a class of pharmacologically important molecules. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2014;14(3):282–290.
78. Kim HR, Rho HW, Park BH, Park JW, Kim JS, Kim UH, et al. Role of Ca²⁺ in alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1227(1–2):87–91.
79. Kimura H, Caturegli P, Takahashi M, et al. New Insights into the Function of the Immunoproteasome in Immune and Nonimmune Cells. *J Immunol Res* 2015;2015:541984.
80. Klegeris A, Liutkevicius E, Mikalauskiene G, Duburs G, McGeer PL, Klusa V. Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells. *Eur J Pharmacol.* 2002;441:203–208.
81. Klusa V. Atypical 1,4-dihydropyridine derivatives, an approach to neuroprotection and memory enhancement. *Pharmacol Res.* 2016;113(Part B): 754–759.
82. Kluša V, Ćermane S. Alcoholised maternal rat offspring: model for testing of physical and psycho emotional neurodeficit. *Scand J Lab Anim Sci.* 1996;23: 403–409.
83. Ko HL, Ren EC. Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules.* 2012;2:524–548.
84. Kong L, Wang Y, Luo M, Tan Y, Cui W, Miao L. Prevention of Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy by MG132: Possible Roles of Nrf2 and IκB. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3671751.
85. Konrad RJ, Mikolaenko I, Tolar JF, Liu K, Kudlow JE. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochem J.* 2001;12:31–41.
86. Kooij. A re-evaluation of the tissue distribution and physiology of xanthine oxidoreductase. *Histochem J.* 1994;26(12):889–915.
87. Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:294–302.

88. Kupca S, Sjakste T, Paramonova N, Sugoka O, Rinkuza I, Trapina I, Daugule I, Sipols A, Rumba-Rozenfelde I. Association of Obesity with Proteasomal Gene Polymorphisms in Children. *J Obes.* 2013;2013:638154.
89. Lal A, Pan Y, Navarro F, Dykxhoorn DM, Moreau L, Meire E, Bentwich Z, Lieberman J, Chowdhury D. miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(5):492–498.
90. Lecker SH, Goldberg AL, Mitch WE. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:1807–1819.
91. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 2004;18(1):39–51.
92. Lecoeur H, Borgne-Sanchez A, Chaloin O, El-Khoury R, Brabant M, Langonné A, Porceddu M, Brière JJ, Buron N, Rebouillat D, Péchoux C, Deniaud A, Brenner C, Briand JP, Muller S, Rustin P, Jacotot E. HIV-1 Tat protein directly induces mitochondrial membrane permeabilization and inactivates cytochrome c oxidase. *Cell Death & Disease.* 2012;3(3):e282.
93. Lee HJ, Jeong KH, Kim YG, Moon JY, Lee SH, Ihm CG, Sung JY, Lee TW. Febuxostat ameliorates diabetic renal injury in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Am J Nephrol.* 2014;40(1):56–63.
94. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51(2):216–226.
95. Lenzen S, Freytag S, Panten U. Inhibition of glucokinase by alloxan through interaction with SH groups in the sugar-binding site of the enzyme. *Mol pharmacol.* 1988;34(3):395–400.
96. Lenzen S, Munday R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its n-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(7):1385–1391.
97. Leonova E, Rostoka E, Sauvaigo S, Baumane L, Selga T, Sjakste N. Study of interaction of antimutagenic 1,4-dihydropyridine AV-153-Na with DNA-damaging molecules and its impact on DNA repair activity. *PeerJ.* 2018;6:e4609.
98. Li F, Drel VR, Szabó C, Stevens MJ, Obrosova IG. Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2005;54(5):1514–1522.

99. Li J, Dou D, Li P, Luo W, Lv W, Zhang C, Song X, Yang Y, Zhang Y, Xu Y, Xiao F, Wei Y, Qin J, Li H, Yang X. PARP-1 serves as a novel molecular marker for hepatocellular carcinoma in a Southern Chinese Zhuang population. *Tumour Biol.* 2017;39(7):1010428317706914.
100. Li J, Ma W, Yue G, Tang Y, Kim IM, Weintraub NL, Wang X, Su H. Cardiac proteasome functional insufficiency plays a pathogenic role in diabetic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;102:53–60.
101. Li X, Meng X, Gao X, Pang X, Wang Y, Wu X, Deng X, Zhang Q, Sun C, Li Y. Elevated serum xanthine oxidase activity is associated with the development of type 2 diabetes: a prospective cohort study. *Diabetes Care.* 2018;41(4):884–890.
102. Li Z, Zhang H, Dong X, et al. Proteomic profile of primary isolated rat mesangial cells in high-glucose culture condition and decreased expression of PSMA6 in renal cortex of diabetic rats. *Biochem Cell Biol.* 2010;88:635–648.
103. Lin H, Huang Q, Guo X, Liu P, Liu W, Zou Y, Zhu S, Deng G, Kuang J, Zhang C, Cao H, Hu G. Elevated level of renal xanthine oxidase mRNA transcription after nephropathogenic infectious bronchitis virus infection in growing layers. *J Vet Sci.* 2015;16(4):423–429.
104. Lindblom R, Higgins G, Coughlan M, de Haan JB. Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy. *Rev Diabet Stud.* 2015;12(1-2):134–156.
105. Liu H, Yu S, Xu W, Xu J. Enhancement of 26s proteasome functionality connects oxidative stress and vascular endothelial inflammatory response in diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(9):2131–2140.
106. Liu H, Zhu H, Shi W, Lin Y, Ma G, Tao G, Gong W, Zhao Q, Du M, Wang M, Chu H, Zhang Z. Genetic variants in XDH are associated with prognosis for gastric cancer in a Chinese population. *Gene.* 2018;663:196–202.
107. Liu HP, Lin WY, Wu BT, Liu SH, Wang WF, Tsai CH, Lee CC, Tsai FJ. Evaluation of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene variants in Alzheimer's disease. *J Clin Lab Anal.* 2010;24(3):182–186.
108. Liu J, Wang C, Liu F, Lu Y, Cheng J. Metabonomics revealed xanthine oxidase-induced oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(9):2569–2579.
109. Liu P, Su J, Song X, Wang S. Activation of nuclear β -catenin/c-Myc axis promotes oxidative stress injury in streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(4):1573–1580.

110. Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, Bosch J, Dagenais G, Mann JF, Gerstein HC. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care*. 2002;25(11):1919–1927.
111. López-Avalos MD, Duvivier-Kali VF, Xu G, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC. Evidence for a role of the ubiquitin-proteasome pathway in pancreatic islets. *Diabetes*. 2006;55(5):1223–1231.
112. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1997; 389:251–260.
113. Martire S, Mosca L, d'Erme M. PARP-1 involvement in neurodegeneration: A focus on Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Mech Ageing Dev*. 2015;146–148:53–64.
114. Marzluff WF, Wagner EJ, Duronio RJ. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet*. 2008;9(11):843–854.
115. Matern AI, Charushin VN, Chupakhin ON. Progress in the studies of oxidation of dihydropyridines and their analogues. *Russian Chemical Reviews*. 2007;76(1):23–40.
116. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2012;12:5–18.
117. Matsumoto S, Koshiishi I, Inoguchi T, Nawata H, Utsumi H. Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice. *Free Radic Res*. 2003;37:767–772.
118. McCarthy MK, Weinberg JB. The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation. *Front Microbiol*. 2015;6:21.
119. Meiners S, Heyken D, Weller A, Ludwig A, Stangl K, Kloetzel PM, Kruger E. Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of mammalian proteasomes. *J Biol Chem*. 2003;278(24):21517–21525.
120. Merforth S, Kuehn L, Osmers A, Dahlmann B. Alteration of 20S proteasome-subtypes and proteasome activator PA28 in skeletal muscle of rat after induction of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35(5):740–748.
121. Milkovic L, Vukovic T, Zarkovic N, Tatzber F, Bisenieks E, Kalme Z, Bruvere I, Ogle Z, Poikans J, Velena A, Duburs G. Antioxidative 1,4-Dihydropyridine Derivatives Modulate Oxidative Stress and Growth of Human Osteoblast-Like Cells *In Vitro*. *Antioxidants*. 2018;7:123.

122. Min W, Wang ZQ. Poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) and its therapeutic potential. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:1619–1626.
123. Minchenko AG, Stevens MJ, White L, Abatan OI, Komjáti K, Pacher P, Szabó C, Obrosova IG. Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP-ribose) polymerase activation. *FASEB J*. 2003;17(11):1514–1516.
124. Miric DJ, Kusic BM, Filipovic-Danic S, Grbic R, Dragojevic I, Miric MB, Puhalo-Sladoje D. Xanthine Oxidase Activity in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with and without Diabetic Peripheral Neuropathy. *J Diabetes Res*. 2016;2016:4370490.
125. Misane I, Klusa V, Dambrova M, Germane S, Duburs G, Bisenieks E, Rimondini R, Ogren SO. "Atypical" neuromodulatory profile of glutapyrone, a representative of a novel 'class' of amino acid-containing dipeptide-mimicking 1,4-dihydropyridine (DHP) compounds: in vitro and in vivo studies. *Eur Neuropharmacol*. 1998;8(4):329–347.
126. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):104–115.
127. Muthurajan UM, Hepler MR, Hieb AR, Clark NJ, Kramer M, Yao T, Luger K. Automodification switches PARP1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(35):12752–12757.
128. Novik KL, Spinelli JJ, Macarthur AC, Shumansky K, Sipahimalani P, Leach S, Lai A, Connors JM, Gascoyne RD, Gallagher RP, Brooks-Wilson AR. Genetic variation in H2AFX contributes to risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(6):1098–1106.
129. Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn*. 1990;13:259–262.
130. Obrosova IG, Drel VR, Pacher P, Ilnytska O, Wang ZQ, Stevens MJ, Yorek MA. Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. *Diabetes*. 2005;54(12):3435–3441.
131. Obrosova IG, Li F, Abatan OI, Forsell MA, Komjáti K, Pacher P, Szabó C, Stevens MJ. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2004a;53(3):711–720.
132. Obrosova IG, Minchenko AG, Frank RN, Seigel GM, Zsengeller Z, Pacher P, Stevens MJ, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors counteract diabetes- and

- hypoxia-induced retinal vascular endothelial growth factor overexpression. *Int J Mol Med*. 2004b;14(1):55–64.
133. Okamura T, Tawa M, Geddawy A, Shimosato T, Iwasaki H, Shintaku H, Yoshida Y, Masada M, Shinozaki K, Imamura T. Effects of atorvastatin, amlodipine, and their combination on vascular dysfunction in insulin-resistant rats. *J Pharmacol Sci*. 2014;124:76–85.
 134. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. *Oman Med J*. 2012;27:269–273.
 135. Ortiz ME, Núñez-Vergara LJ, Camargo C, Squella JA. Oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines of pharmacological significance by electrogenerated superoxide. *Pharmaceutical Research*. 2004;21(3):428–435.
 136. Ošiņa K, Leonova E, Isajevs S, Baumane L, Rostoka E, Sjakste T, Bisenieks E, Duburs G, Vīgante B, Sjakste N. Modifications of expression of genes and proteins involved in DNA repair and nitric oxide metabolism by carbanionides [disodium-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-bis(carboxyloxyacetate) derivatives] in intact and diabetic rats. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2017;68:212–227.
 137. Ošiņa K, Rostoka E, Isajevs S, Sokolovska J, Sjakste T, Sjakste N. Effects of an antimutagenic 1,4-dihydropyridine AV-153 on expression of nitric oxide synthases and DNA repair-related enzymes and genes in kidneys of rats with a streptozotocin model of diabetes mellitus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016;119:458–463.
 138. Otoda T, Takamura T, Misu H, Ota T, Murata S, Hayashi H, Takayama H, Kikuchi A, Kanamori T, Shima KR, Lan F, Takeda T, Kurita S, Ishikura K, Kita Y, Iwayama K, Kato K, Uno M, Takeshita Y, Yamamoto M, Tokuyama K, Iseki S, Tanaka K, Kaneko S. Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Diabetes*. 2013;62(3):811–824.
 139. Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabó E, Szabó C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes*. 2002;51(2):514–521.
 140. Pacher P, Szabó C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in the pathogenesis of diabetic complications: endothelial dysfunction, as a common underlying theme. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:1568–1580.
 141. Pacher P, Szabó C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev*. 2007;25(3):235–260.

142. Pang J, Xi C, Dai Y, Gong H, Zhang TM. Altered expression of base excision repair genes in response to high glucose-induced oxidative stress in HepG2 hepatocytes. *Med Sci Monit.* 2012;18(7):BR281–285.
143. Paramonova N, Shi-Shin Wu L, Rumba-Rozenfelde I, Wang J.-Y, Sjakste N, Sjakste T. Genetic variants in the PSMA6, PSMC6 and PSMA3 genes associated with childhood asthma in Latvian and Taiwanese populations. *Biopolym. Cell.* 2014;30(5):377–387.
144. Parikh RA, White JS, Huang X, Schoppy DW, Baysal BE, Baskaran R, Bakkenist CJ, Saunders WS, Hsu LC, Romkes M, Gollin SM. Loss of distal 11q is associated with DNA repair deficiency and reduced sensitivity to ionizing radiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(8):761–775.
145. Paul S. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: Therapeutic approaches. *Bioessays.* 2008;30:1172–1184.
146. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.* 2000;10:886–895.
147. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem.* 2000;275:40974–40980.
148. Portero-Otín M, Pamplona R, Ruiz MC, Cabisco E, Prat J, Bellmunt MJ. Diabetes induces an impairment in the proteolytic activity against oxidized proteins and a heterogeneous effect in nonenzymatic protein modifications in the cytosol of rat liver and kidney. *Diabetes.* 1999;48(11):2215–2220.
149. Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkowitz C, England BK, Ding X, et al. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest.* 1996;98(8):1703–1708.
150. Price TO, Ercal N, Nakaoka R, Banks WA. HIV-1 viral proteins gp120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells. *Brain Research.* 2005;1045(1-2):57–63.
151. Pupure J, Isajevs S, Gordjushina V, Taivans I, Rumaks J, Svirskis S, Kratovska A, Dzirkale Z, Pilipenko J, Duburs G, Klusa V. Distinct influence of atypical 1,4-dihydropyridine compounds in azidothymidine-induced neuro- and cardiotoxicity in mice *ex vivo*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(5):401–406.
152. Puthanveetil P, Zhang D, Wang Y, Wang F, Wan A, Abrahani A, Rodrigues B. Diabetes triggers a PARP1 mediated death pathway in the heart through participation of FoxO1. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(5):677–686.

153. Qin Q, Lu J, Zhu H, Xu L, Cheng H, Zhan L, Yang X, Zhang C, Sun X. PARP-1 Val762Ala polymorphism and risk of cancer: a meta-analysis based on 39 case-control studies. *PLoS One*. 2014;9(5):e98022.
154. Qin WD, Liu GL, Wang J, Wang H, Zhang JN, Zhang F, Ma Y, Ji XY, Li C, Zhang MX. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition protects cardiomyocytes from inflammation and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Oncotarget*. 2016;7(24):35618–35631.
155. Queisser MA, Yao D, Geisler S, Hammes HP, Lochnit G, Schleicher ED, Brownlee M, Preissner KT. Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes*. 2010;59(3): 670–678.
156. Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016;78:13–31.
157. Radulovic J, Tronson NC. Protein synthesis inhibitors, gene superinduction and memory: too little or too much protein? *Neurobiol Learn Mem*. 2008;89(3):212–218.
158. Rajawat J, Shukla N, Mishra DP. Therapeutic Targeting of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Cancer: Current Developments, Therapeutic Strategies, and Future Opportunities. *Med Res Rev*. 2017;37(6):1461–1491.
159. Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Mukhopadhyay B, Patel V, Haskó G, Szabó C, Mabley JG, Liaudet L, Pacher P. Xanthine oxidase inhibitor allopurinol attenuates the development of diabetic cardiomyopathy. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8B):2330–2341.
160. Redon CE, Nakamura AJ, Martin OA, Parekh PR, Weyemi US, Bonner WM. Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(2):168–174.
161. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev*. 1970;12:485–518.
162. Reusser F. Mode of Action of Streptozotocin. *J of Bact*. 1971;12:580–588.
163. Rice AP. The HIV-1 Tat protein: mechanism of action and target for HIV-1 cure strategies. *Curr Pharm Des*. 2017;23(28):4098–4102.
164. Romagnoli M, Gomez-Cabrera MC, Perrelli MG, Biasi F, Pallardo FV, Sastre J, Poli G, Viña J. Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(2):171–177.
165. Rostoka E. Brīvo radikāļu un DNS pārrāvumu farmakoloģiskā korekcija. Promocijas darbs. Rīga: Latvijas Universitāte, 2015.

166. Rubnitz JE, Behm FG, Downing JR. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia*. 1996;10(1):74–82.
167. Ruf A, Mennissier de Murcia J, de Murcia G, Schulz GE. Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:7481–7485.
168. Ryabokon NI, Goncharova RI, Duburs G, Hancock R, Rzeszowska-Wolny J. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining. *Mutat Res*. 2008;637:173–181.
169. Ryabokon NI, Goncharova RI, Duburs G, Rzeszowska-Wolny J. A 1,4-dihydropyridine derivative reduces DNA damage and stimulates DNA repair in human cells in vitro. *Mutat Res*. 2005;587(1–2):52–58.
170. Sadatomi D, Tanimura S, Ozaki K, Takeda K. Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling. *Int J Mol Sci*. 2013;14:4596–4612.
171. Sall FB, El Amine R, Markozashvili D, Tsfasman T, Oksenhendler E, Lipinski M, Vassetzky Y, Germini D. HIV-1 Tat protein induces aberrant activation of AICDA in human B-lymphocytes from peripheral blood. *J Cell Physiol*. 2019.
172. Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(1):13–25.
173. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes*. 1994;43:1326–1333.
174. Schults MA, Nagle PW, Rensen SS, Godschalk RW, Munnia A, Peluso M, Claessen SM, Greve JW, Driessen A, Verdam FJ, Buurman WA, van Schooten FJ, Chiu RK. Decreased nucleotide excision repair in steatotic livers associates with myeloperoxidase-immunoreactivity. *Mutat Res*. 2012;736(1–2):75–81.
175. Schurman SH, Dunn CA, Greaves R, Yu B, Ferrucci L, Croteau DL, Seidman MM, Bohr VA. Age-related disease association of endogenous γ -H2AX foci in mononuclear cells derived from leukapheresis. *PloS One*. 2012;7(9):e45728.
176. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol*. 2004;6(2):168–170.
177. Seymour KJ, Roberts LE, Fini MA, Parmley LA, Oustitch TL, Wright RM. Stress activation of mammary epithelial cell xanthine oxidoreductase is mediated by p38 MAPK and CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *J Biol Chem*. 2006;281(13):8545–8558.

178. Shrayyef MZ, Gerich JE, Normal Glucose Homeostasis. In Poretzky. L (ed), Principles of Diabetes Mellitus. Boston, MA: Springer US. 2010;19–35.
179. Sjakste T, Paramonova N, Osina K, Dokane K, Sokolovska J, Sjakste N. Genetic variations in the PSMA3, PSMA6 and PSMC6 genes are associated with type 1 diabetes in Latvians and with expression level of number of UPS-related and T1DM-susceptible genes in HapMap individuals. *Mol Genet Genomics*. 2016;291(2):891–903.
180. Sjakste T, Paramonova N, Rumba-Rozenfelde I, Trapina I, Sugoka O, Sjakste N. Juvenile idiopathic arthritis subtype- and sex-specific associations with genetic variants in the PSMA6/PSMC6/PSMA3 gene cluster. *Pediatr Neonatol*. 2014;55(5):393–403.
181. Sjakste T, Poudziunas I, Ninio E, Perret C, Pirags V, Nicaud V, Lazdins M, Evanss A, Morrison C, Cambien F, Sjakste N. SNPs of PSMA6 gene--investigation of possible association with myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus. *Genetika*. 2007;43(4):553–559.
182. Smith RA, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5407–5412.
183. Snider ME, Nuzum DS, Veverka A. Long-acting nifedipine in the management of the hypertensive patient. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(6):1249–1257.
184. Sokolovska J, Isajevs S, Sugoka O, Sharipova J, Lauberte L, Svirina D, Rostoka E, Sjakste T, Kalvinsh I, Sjakste N. Correction of glycaemia and GLUT1 level by mildronate in rat streptozotocin diabetes mellitus model. *Cell Biochem Funct* 2011;29(1):55–63.
185. Soldani C, Scovassi. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*. 2002;7(4):321–328.
186. Soriano FG, Mabley JG, Pacher P, Liaudet L, Szabó C. Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Circ Res*. 2001;89:684–691.
187. Spinass GA. The dual role of nitric oxide in islets β -cells. *News Physiol Sci*. 1999;12:49–54.
188. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*. 2005;123:1213–1226.
189. Sultanov D, Gerasimova N, Kudryashova K, Maluchenko N, Kotova E, Langelier MF, Pascal J, Kirpichnikov M, Feofanov A, Studitsky V. Unfolding of core nucleosomes by PARP1 revealed by spFRET microscopy. *AIMS Genetics*. 2017;4(1):21–31.

190. Swarnalatha G, Prasanthi G, Sirisha N, Madhusudhana Chetty C. 1,4-Dihydropyridines: a multifunctional molecule— a review. *Int J ChemTech Res.* 2011;3(1):75–89.
191. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res.* 2001;50:536–546.
192. Tachiwana H, Shimura M, Nakai-Murakami C, Tokunaga K, Takizawa Y, Sata T, Kurumizaka H, Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 2006;66(2):627-631.
193. Targher G, Mantovani A, Pichiri I, Mingolla L, Cavalieri V, Mantovani W, Pancheri S, Trombetta M, Zoppini G, Chonchol M, Byrne CD, Bonora E. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of chronic kidney disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2014;37(6):1729–1736.
194. Toleman C, Paterson AJ, Shin R, Kudlow JE. Streptozotocin inhibits O-GlcNAcase via the production of a transition state analog. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340(2):526–534.
195. Tornovsky-Babeay S, Dadon D, Ziv O, Tzipilevich E, Kadosh T, Schyr-Ben Haroush R, Hija A, Stolovich-Rain M, Furth-Lavi J, Granot Z, Porat S, Philipson LH, Herold KC, Bhatti TR, Stanley C, Ashcroft FM, In't Veld P, Saada A, Magnuson MA, Glaser B, Dor Y. Type 2 diabetes and congenital hyperinsulinism cause DNA double-strand breaks and p53 activity in β cells. *Cell Metab.* 2014;19(1):109–121.
196. Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;197:1458–1464.
197. Ullrich C, Mlekusch R, Kuschnig A, Marksteiner J, Humpel C. Ubiquitin enzymes, ubiquitin and proteasome activity in blood mononuclear cells of MCI, Alzheimer and Parkinson patients. *Curr Alzheimer Res.* 2010;7(6):549–555.
198. Ullrich O, Reinheckel T, Sitte N, Hass R, Grune T, Davies KJ. Poly-ADP ribose polymerase activates nuclear proteasome to degrade oxidatively damaged histones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(11):6223–6228.
199. Utno LI, Lipsberga ZE, Silova AA, Girgensone MI, Bisenieks EA, Ia GI. Cardioprotective properties of a 1,4-dihydropyridine derivative, glutapyrone, in deep hypothermia. *Biulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny.* 1989;108(11):558–561. (Russian).
200. Valente S, Mellini P, Spallotta F, Carafa V, Nebbioso A, Polletta L, Carnevale I, Saladini S, Trisciuglio D, Gabellini C, Tardugno M, Zwergel C, Cencioni C, Atlante S, Moniot S, Steegborn C, Budriesi R, Tafani M, Del Bufalo D, Altucci L, Gaetano C,

- Mai A. 1,4-Dihydropyridines active on the SIRT1/AMPK pathway ameliorate skin repair and mitochondrial function and exhibit inhibition of proliferation in cancer cells. *J Med Chem.* 2016;59:1471–1491.
201. Veleno A, Skujiņš A, Svirskis S, Bisenieks E, Uldriķis J, Poikans J, Duburs G, Klusa V. Modification of swellingcontraction-aggregation processes in rat muscle mitochondria by the 1,4-dihydropyridines, cerebrocrast and glutapyrone, themselves and in the presence of azidothymidine. *Cell Biochem Funct* 1997;15:211–220.
202. Veleno A, Zarkovic N, Gall Troselj K, Bisenieks E, Krauze A, Poikans J, Duburs G. 1,4-Dihydropyridine derivatives: Dihyronicotinamide analogues—Model compounds targeting oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1892412.
203. Voltarelli JC, Couri CE. Stem cell transplantation for type 1 diabetes mellitus. *Diabetol Metabol Syndr.* 2009;1(1):4.
204. Wang CY, Li CY, Hsu HP, Cho CY, Yen MC, Weng TY, Chen WC, Hung YH, Lee KT, Hung JH, Chen YL, Lai MD. PSMB5 plays a dual role in cancer development and immunosuppression. *Am J Cancer Res.* 2017;7(11):2103–2120.
205. Wang H, Jiang M, Zhu H, Chen Q, Gong P, Lin J, Lu J, Qiu J. Quantitative assessment of the influence of PSMA6 variant (rs1048990) on coronary artery disease risk. *Mol Biol Rep.* 2013;40:1035–1041.
206. Wang L, Kumar S, Fridley BL, Kalari KR, Moon I, Pellemounter LL, Hildebrandt MA, Batzler A, Eckloff BW, Wieben ED, Greipp PR. Proteasome beta subunit pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res.* 2008;14(11):3503–3513.
207. Weinstein AL, Lalezarzadeh FD, Soares MA, Saadeh PB, Ceradini DJ. Normalizing dysfunctional purine metabolism accelerates diabetic wound healing. *Wound Repair Regen.* 2015;23(1):14–21.
208. Winterbourn CC, Munday R. Glutathionemediated redox cycling of alloxan. Mechanisms of superoxide dismutase inhibition and of metal-catalyzed OH. formation. *Biochem Pharmacol* 1989;38:271–277.
209. Wu Y, Chen Y, Wu Q, Jia L, Du X. Minocycline inhibits PARP-1 expression and decreases apoptosis in diabetic retinopathy. *Mol Med Rep.* 2015;12(4):4887-4894.
210. Xiao H, Li Y, Qi J, Wang H, Liu K. Peroxynitrite plays a key role in glomerular lesions in diabetic rats. *J Nephrol.* 2009;22(6):800–808.
211. Xu B, Chiu J, Feng B, Chen S, Chakrabarti S. PARP activation and the alteration of vasoactive factors and extracellular matrix protein in retina and kidney in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(5):404–412.

212. Xu P, Huecksteadt TP, Hoidal JR. Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase gene (XDH). *Genomics*. 1996;34(2):173–180.
213. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*. 1981;294:284–286.
214. Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA. Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol*. 1990;258(4 Pt 1):G564–570.
215. Yoon SR, Song J, Lee JH, Kim OY. Phosphorylation of Histone H2A.X in Peripheral Blood Mononuclear Cells May Be a Useful Marker for Monitoring Cardiometabolic Risk in Nondiabetic Individuals. *Dis Markers*. 2017;2017:2050194.
216. Yoshida K, Morita T. Control of radiosensitivity of F9 mouse teratocarcinoma cells by regulation of histone H2AX gene expression using a tetracycline turn-off system. *Cancer Res*. 2004;64(12):4131–4136.
217. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297: 259–263.
218. Zajac J, Shrestha A, Patel P, Poretzky L. The main events in the history of diabetes mellitus. In: *Principles of diabetes mellitus*. Springer, Boston, MA, 2010;3–16.
219. Zhang J, He Y, Shen X, Jiang D, Wang Q, Liu Q, Fang W. γ -H2AX responds to DNA damage induced by long-term exposure to combined low-dose-rate neutron and γ -ray radiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2016;795:36–40.
220. Zhang Y, Wang J, Li Y, Wang F, Yang F, Xu W. Synthesis and radioprotective activity of mitochondria targeted dihydropyridines in vitro. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):E2233.
221. Zhu K, Kakehi T, Matsumoto M, Iwata K, Ibi M, Ohshima Y, Zhang J, Liu J, Wen X, Taye A, Fan C, Katsuyama M, Sharma K, Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase NOX1 is involved in activation of protein kinase C and premature senescence in early stage diabetic kidney. *Free Radic Biol Med*. 2015;83:21–30.
222. Ziegler-Birling C, Helmrich A, Tora L, Torres-Padilla ME. Distribution of p53 binding protein 1 (53BP1) and phosphorylated H2A.X during mouse preimplantation development in the absence of DNA damage. *Int J Dev Biol*. 2009;53(7):1003–1011.
223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

PIELIKUMI

1. pielikums. Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja dzīvnieku izmantošanai izmēģinājumos.



3. pielikums
procedūrai KR.10.P.068
versija 02
lpp.1 no 1

PĀRTIKAS UN VETERINĀRĀ DIENESTA
ATĻAUJA Nr. 51
DZĪVNIEKU IZMANTOŠANAI IZMĒGINĀJUMĀ

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 izmantojamie dzīvnieki

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



2. pielikums. *Parp1* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,68 (0,16)			0,63 (0,12)	–	ns	0,97 (0,15)	↑	1,10x10 ⁻³
M 0,05	1,27 (0,37)	↑	1,00x10 ⁻⁴	1,42 (0,20)	↑	<1,00x10 ⁻⁴			
M 0,5	1,19 (0,10)	↑	6,00x10 ⁻⁴	1,55 (0,36)	↑	<1,00x10 ⁻⁴			
E 0,05	1,67 (0,48)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	0,99 (0,18)	↑	5,60x10 ⁻³			
E 0,5	1,59 (0,14)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	0,85 (0,22)	–	ns			
J 0,05	1,45 (0,31)	↑	7,00x10 ⁻⁴	1,53 (0,40)	↑	<1,00x10 ⁻⁴			
J 0,5	1,72 (0,79)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	2,37 (0,24)	↑	<1,00x10 ⁻⁴			
G 0,05	1,78 (0,61)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	2,12 (0,50)	↑	<1,00x10 ⁻⁴			
G 0,5	1,78 (0,23)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	2,54 (0,68)	↑	<1,00x10 ⁻⁴			
Na 0,05	0,78 (0,16)	–	ns	1,04 (0,11)	–	ns	1,14 (0,09)	–	ns
Na 0,5	1,05 (0,28)	↑	3,81x10 ⁻²	1,58 (0,63)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	0,79 (0,06)	–	ns
Ca 0,05	0,60 (0,15)	–	ns	1,08 (0,13)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	1,15 (0,16)	–	ns
Ca 0,5	0,68 (0,13)	–	ns	1,13 (0,05)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	1,24 (0,10)	↑	5,60x10 ⁻³

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

3. pielikums. *Parp1* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,27 (0,04)			0,27 (0,04)	–	ns	0,24 (0,05)	–	ns
Na 0,05	0,29 (0,04)	–	ns	0,30 (0,02)	–	ns	0,28 (0,06)	–	ns
Na 0,5	0,38 (0,03)	↑	1,00x10 ⁻³	0,34 (0,02)	↑	9,40x10 ⁻³	0,32 (0,07)	↑	1,22x10 ⁻²
Ca 0,05	0,24 (0,01)	–	ns	0,24 (0,04)	–	ns	0,31 (0,03)	↑	5,60x10 ⁻³
Ca 0,5	0,29 (0,05)	–	ns	0,31 (0,02)	–	ns	0,26 (0,03)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

4. pielikums. *Parp1* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modelī.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,055 (0,021)			0,089 (0,040)	↑	$2,13 \times 10^{-2}$
M 0,05	0,032 (0,017)	–	ns	0,093 (0,043)	–	ns
M 0,5	0,023 (0,003)	–	ns	0,086 (0,039)	–	ns
E 0,05	0,023 (0,006)	–	ns	0,036 (0,019)	↓	$1,70 \times 10^{-3}$
E 0,5	0,036 (0,005)	–	ns	0,033 (0,010)	↓	$1,00 \times 10^{-3}$
J 0,05	0,062 (0,033)	–	ns	0,069 (0,030)	–	ns
J 0,5	0,055 (0,017)	–	ns	0,110 (0,045)	–	ns
G 0,05	0,045 (0,016)	–	ns	0,037 (0,006)	↓	$1,90 \times 10^{-3}$
G 0,5	0,028 (0,002)	–	ns	0,058 (0,020)	↓	$4,10 \times 10^{-2}$
Na 0,5	0,056 (0,018)	–	ns	0,138 (0,049)	↑	$1,90 \times 10^{-2}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

5. pielikums. PARP1 proteīna ekspresija žurku nierēs, sirdī, acīs un nervos AV-153-Na ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modelī.

Orgāns	Viela	Kontrole, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
Nieres	N	9,60 (2,88)			75,00 (17,12)	↑	1,80x10 ⁻³
	Na 0,5	19,20 (9,65)	–	ns	14,80 (11,28)	↓	1,40x10 ⁻³
Sirds	N	12,60 (3,29)			42,00 (12,27)	↑	8,00x10 ⁻⁴
	Na 0,5	25,60 (7,02)	↑	3,70x10 ⁻²	12,20 (6,02)	↓	<1,00x10 ⁻⁴
Acis	N	5,60 (3,78)			6,80 (3,35)	–	ns
	Na 0,5	2,80 (1,30)	–	ns	7,40 (2,97)	–	ns
Nervi	N	5,25 (2,63)			21,00 (10,61)	↑	2,80x10 ⁻²
	Na 0,5	6,25 (3,86)	–	ns	6,00 (4,08)	↓	9,60x10 ⁻³

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar AV-153-Na apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

6. pielikums. Šķeltā PARP1 proteīna ekspresija žurku nierēs, sirdī, acīs un nervos metkarbatona un etkarbatona ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modelī.

Orgāns	Vielā	Kontrole, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
Nieres	N	11,80 (2,86)			45,40 (13,56)	↑	6,00x10 ⁻⁴
	M 0,05	16,40 (4,28)	–	ns	55,60 (24,39)	–	ns
	M 0,5	18,60 (8,79)	–	ns	37,60 (14,35)	–	ns
	E 0,05	25,40 (8,38)	↑	3,96x10 ⁻²	10,20 (3,27)	↓	<1,00x10 ⁻⁴
	E 0,5	28,20 (10,13)	↑	1,27x10 ⁻²	20,40 (9,13)	↓	3,00x10 ⁻⁴
Sirds	N	10,20 (3,49)			37,60 (17,77)	↑	9,60x10 ⁻³
	M 0,05	11,80 (5,26)	–	ns	18,00 (5,05)	↓	1,81x10 ⁻²
	M 0,5	9,20 (2,68)	–	ns	25,60 (18,47)	–	ns
	E 0,05	21,00 (10,10)	–	ns	10,80 (3,90)	↓	3,00x10 ⁻⁴
	E 0,5	8,20 (2,59)	–	ns	19,40 (8,56)	↓	9,80x10 ⁻³
Acis	N	11,40 (5,81)			32,80 (10,01)	↑	3,30x10 ⁻³
	M 0,05	9,00 (2,83)	–	ns	29,40 (9,45)	–	ns
	M 0,5	12,20 (0,45)	–	ns	28,60 (13,46)	–	ns
	E 0,05	13,80 (4,02)	–	ns	75,00 (14,21)	↑	<1,00x10 ⁻⁴
	E 0,5	15,80 (8,50)	–	ns	66,80 (13,10)	↑	<1,00x10 ⁻⁴
Nervi	N	10,00 (3,16)			32,20 (10,92)	↑	2,40x10 ⁻³
	M 0,05	18,60 (6,02)	–	ns	33,00 (21,15)	–	ns
	M 0,5	15,40 (4,72)	–	ns	18,40 (8,91)	–	ns
	E 0,05	24,80 (13,31)	↑	1,51x10 ⁻²	7,400 (3,29)	↓	1,00x10 ⁻⁴
	E 0,5	17,20 (4,38)	–	ns	10,60 (7,54)	↓	6,00x10 ⁻⁴

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

7. pielikums. *H2ax* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,20 (0,06)			0,21 (0,07)	–	ns	0,24 (0,07)	–	ns
M 0,05	0,19 (0,04)	–	ns	0,21 (0,03)	–	ns			
M 0,5	0,21 (0,05)	–	ns	0,25 (0,02)	–	ns			
E 0,05	0,24 (0,07)	–	ns	0,24 (0,07)	–	ns			
E 0,5	0,20 (0,04)	–	ns	0,18 (0,06)	–	ns			
J 0,05	0,24 (0,04)	–	ns	0,18 (0,04)	–	ns			
J 0,5	0,28 (0,17)	–	ns	0,28 (0,04)	–	ns			
G 0,05	0,25 (0,08)	–	ns	0,31 (0,07)	↑	$3,38 \times 10^{-2}$			
G 0,5	0,25 (0,07)	–	ns	0,41 (0,10)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$			
Na 0,05	0,20 (0,06)	–	ns	0,20 (0,03)	–	ns	0,28 (0,04)	–	ns
Na 0,5	0,19 (0,02)	–	ns	0,28 (0,10)	↑	$3,54 \times 10^{-2}$	0,26 (0,04)	–	ns
Ca 0,05	0,14 (0,03)	–	ns	0,31 (0,08)	↑	$1,54 \times 10^{-2}$	0,36 (0,07)	↑	$7,20 \times 10^{-3}$
Ca 0,5	0,20 (0,08)	–	ns	0,28 (0,03)	–	ns	0,43 (0,11)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

8. pielikums. *H2ax* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,053 (0,010)			0,038 (0,015)	↓	$3,77 \times 10^{-2}$	0,036 (0,010)	↓	$2,90 \times 10^{-3}$
Na 0,05	0,039 (0,008)	–	ns	0,039 (0,003)	–	ns	0,050 (0,010)	–	ns
Na 0,5	0,042 (0,002)	–	ns	0,041 (0,008)	–	ns	0,052 (0,017)	–	ns
Ca 0,05	0,049 (0,006)	–	ns	0,047 (0,005)	–	ns	0,053 (0,011)	↑	$2,39 \times 10^{-2}$
Ca 0,5	0,059 (0,020)	–	ns	0,043 (0,005)	–	ns	0,054 (0,012)	↑	$1,73 \times 10^{-2}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

9. pielikums. *H2ax* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeli.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,035 (0,019)			0,056 (0,028)	↑	$3,27 \times 10^{-2}$
M 0,05	0,027 (0,011)	–	ns	0,041 (0,013)	–	ns
M 0,5	0,019 (0,001)	–	ns	0,039 (0,017)	–	ns
E 0,05	0,021 (0,002)	–	ns	0,034 (0,014)	↓	$4,05 \times 10^{-2}$
E 0,5	0,024 (0,001)	–	ns	0,029 (0,007)	↓	$3,28 \times 10^{-2}$
J 0,05	0,033 (0,015)	–	ns	0,034 (0,014)	–	ns
J 0,5	0,037 (0,014)	–	ns	0,049 (0,019)	–	ns
G 0,05	0,046 (0,018)	–	ns	0,030 (0,009)	↓	$4,31 \times 10^{-2}$
G 0,5	0,029 (0,004)	–	ns	0,035 (0,011)	–	ns
Na 0,5	0,031 (0,012)	–	ns	0,110 (0,081)	↑	$1,27 \times 10^{-2}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

10. pielikums. Proteīna γ H2AX ekspresija žurku nierēs metkarbatona, etkarbatona un AV-153-Na ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modelī.

Viela	Kontrole, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P	Streptozotocīns, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P
N	7,00 (2,00)			11,00 (3,46)	–	ns
M 0,05	8,20 (5,22)	–	ns	8,67 (6,28)	–	ns
M 0,5	5,40 (2,97)	–	ns	7,80 (4,09)	–	ns
E 0,05	6,80 (1,92)	–	ns	33,00 (10,32)	↑	1,30x10 ⁻³
E 0,5	6,40 (4,04)	–	ns	40,00 (18,17)	↑	<1,00x10 ⁻⁴
Na 0,5	10,20 (8,38)	–	ns	5,40 (11,78)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

11. pielikums. Proteīna γ H2AX ekspresija žurku sirdī metkarbatona, etkarbatona un AV-153-Na ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeli.

Viela	Kontrole, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P	Streptozotocīns, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P
N	11,40 (5,81)			32,80 (10,01)	↑	3,30x10 ⁻³
M 0,05	9,00 (2,83)	–	ns	29,40 (9,45)	–	ns
M 0,5	12,20 (0,45)	–	ns	28,60 (13,46)	–	ns
E 0,05	13,80 (4,02)	–	ns	75,00 (14,21)	↑	<1,00x10 ⁻⁴
E 0,5	15,80 (8,50)	–	ns	66,80 (13,10)	↑	<1,00x10 ⁻⁴
Na 0,5	9,80 (4,15)	–	ns	8,60 (4,67)	↓	<1,00x10 ⁻⁴

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

12. pielikums. Proteīna γ H2AX ekspresija žurku acīs metkarbatona, etkarbatona un AV-153-Na ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeli.

Viela	Kontrole, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P	Streptozotocīns, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P
N	5,00 (1,00)			3,00 (2,55)	–	ns
M 0,05	6,40 (3,91)	–	ns	5,20 (2,17)	–	ns
M 0,5	6,60 (3,36)	–	ns	3,80 (1,48)	–	ns
E 0,05	6,20 (5,81)	–	ns	5,20 (4,60)	–	ns
E 0,5	6,80 (8,79)	–	ns	5,40 (4,28)	–	ns
Na 0,5	10,40 (2,19)	↑	1,18x10 ⁻²	4,80 (4,09)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

13. pielikums. Proteīna γ H2AX ekspresija žurku nervos metkarbatona, etkarbatona un AV-153-Na ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modelī.

Viela	Kontrole, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P	Streptozotocīns, šūnas/mm ² (SD)	Ekspresijas izmaiņas	P
N	8,20 (3,90)			6,60 (4,51)	–	ns
M 0,05	4,60 (2,19)	–	ns	3,40 (2,30)	–	ns
M 0,5	3,60 (1,67)	↓	$3,84 \times 10^{-2}$	4,00 (1,87)	–	ns
E 0,05	7,60 (3,85)	–	ns	4,20 (2,49)	–	ns
E 0,5	6,40 (9,45)	–	ns	6,80 (8,07)	–	ns
Na 0,5	10,20 (7,85)	–	ns	5,40 (4,93)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; Na – AV-153-Na; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

14. pielikums. *Xdh* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	1,39 (0,36)			1,78 (1,00)	–	ns	1,85 (0,22)	↑	3,00x10 ⁻³
M 0,05	2,04 (0,22)	–	ns	2,60 (0,53)	–	ns			
M 0,5	2,38 (0,42)	–	ns	3,35 (1,21)	↑	8,00x10 ⁻⁴			
E 0,05	2,43 (0,52)	↑	4,39x10 ⁻²	1,89 (0,30)	–	ns			
E 0,5	2,57 (0,50)	↑	9,20x10 ⁻³	1,71 (0,44)	–	ns			
J 0,05	2,55 (0,52)	↑	1,13x10 ⁻²	1,58 (0,33)	–	ns			
J 0,5	2,45 (0,17)	↑	4,28x10 ⁻²	2,72 (0,60)	↑	2,37x10 ⁻²			
G 0,05	2,29 (1,04)	–	ns	2,76 (0,39)	↑	2,67x10 ⁻²			
G 0,5	2,66 (0,29)	↑	9,60x10 ⁻³	3,26 (0,59)	↑	8,00x10 ⁻⁴			
Na 0,05	1,61 (0,52)	–	ns	2,31 (0,26)	–	ns	2,89 (0,26)	↑	<1,00x10 ⁻⁴
Na 0,5	1,84 (0,21)	–	ns	2,94 (1,28)	↑	3,20x10 ⁻³	2,52 (0,51)	↑	2,37x10 ⁻²
Ca 0,05	1,06 (0,49)	–	ns	2,78 (0,50)	↑	1,32x10 ⁻²	2,43 (0,39)	↑	1,20x10 ⁻²
Ca 0,5	1,22 (0,32)	–	ns	2,30 (0,26)	–	ns	2,88 (0,41)	↑	<1,00x10 ⁻⁴

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

15. pielikums. *Xdh* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta

1. tipa cukura diabēta modeļos.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	1,13 (0,23)			0,93 (0,18)	–	ns	0,90 (0,21)	–	ns
Na 0,05	0,75 (0,28)	↓	7,40x10 ⁻³	0,89 (0,12)	–	ns	1,04 (0,28)	–	ns
Na 0,5	1,10 (0,27)	–	ns	1,06 (0,12)	–	ns	0,98 (0,10)	–	ns
Ca 0,05	0,89 (0,16)	–	ns	0,69 (0,05)	–	ns	0,95 (0,05)	–	ns
Ca 0,5	0,93 (0,27)	–	ns	0,89 (0,22)	–	ns	1,02 (0,07)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

16. pielikums. *Xdh* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeli.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,31 (0,12)			0,58 (0,30)	↑	$1,06 \times 10^{-2}$
M 0,05	0,29 (0,11)	–	ns	0,35 (0,12)	–	ns
M 0,5	0,17 (0,04)	–	ns	0,41 (0,19)	–	ns
E 0,05	0,25 (0,08)	–	ns	0,28 (0,21)	↓	$1,62 \times 10^{-2}$
E 0,5	0,24 (0,06)	–	ns	0,19 (0,03)	↓	$1,70 \times 10^{-3}$
J 0,05	0,28 (0,16)	–	ns	0,28 (0,17)	↓	$1,96 \times 10^{-2}$
J 0,5	0,32 (0,14)	–	ns	0,42 (0,09)	–	ns
G 0,05	0,52 (0,14)	–	ns	0,36 (0,08)	–	ns
G 0,5	0,37 (0,06)	–	ns	0,31 (0,04)	↓	$4,71 \times 10^{-2}$
Na 0,5	0,20 (0,05)	–	ns	0,71 (0,31)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

17. pielikums. *Psm3* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,54 (0,10)			0,71 (0,22)	↑	$3,67 \times 10^{-2}$	0,75 (0,17)	↑	$3,90 \times 10^{-3}$
M 0,05	0,81 (0,12)	↑	$4,84 \times 10^{-2}$	0,77 (0,12)	–	ns			
M 0,5	0,91 (0,13)	↑	$6,20 \times 10^{-3}$	1,17 (0,36)	↑	$2,00 \times 10^{-4}$			
E 0,05	0,83 (0,17)	↑	$2,04 \times 10^{-2}$	0,95 (0,16)	↑	$1,70 \times 10^{-2}$			
E 0,5	0,76 (0,08)	↑	$4,81 \times 10^{-2}$	0,95 (0,08)	↑	$2,60 \times 10^{-2}$			
J 0,05	0,93 (0,14)	↑	$8,00 \times 10^{-4}$	0,56 (0,17)	–	ns			
J 0,5	0,86 (0,12)	↑	$5,10 \times 10^{-3}$	0,77 (0,16)	–	ns			
G 0,05	0,63 (0,18)	–	ns	0,64 (0,17)	–	ns			
G 0,5	0,69 (0,20)	–	ns	0,94 (0,13)	↑	$3,78 \times 10^{-2}$			
Na 0,05	0,69 (0,08)	–	ns	0,72 (0,05)	–	ns	0,92 (0,15)	↑	$4,53 \times 10^{-2}$
Na 0,5	0,79 (0,12)	↑	$2,86 \times 10^{-2}$	0,93 (0,36)	↑	$3,59 \times 10^{-2}$	0,83 (0,02)	–	ns
Ca 0,05	0,49 (0,14)	–	ns	0,94 (0,10)	↑	$1,62 \times 10^{-2}$	0,98 (0,14)	↑	$9,00 \times 10^{-3}$
Ca 0,5	0,55 (0,10)	–	ns	0,95 (0,13)	↑	$2,10 \times 10^{-2}$	1,07 (0,11)	↑	$7,00 \times 10^{-4}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

18. pielikums. *Psm3* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,088 (0,013)			0,060 (0,014)	↓	$8,00 \times 10^{-4}$	0,068 (0,014)	↓	$9,80 \times 10^{-3}$
Na 0,05	0,084 (0,023)	–	ns	0,067 (0,009)	–	ns	0,092 (0,023)	↑	$1,67 \times 10^{-2}$
Na 0,5	0,107 (0,005)	–	ns	0,088 (0,017)	↑	$4,40 \times 10^{-3}$	0,060 (0,011)	–	ns
Ca 0,05	0,084 (0,005)	–	ns	0,060 (0,006)	–	ns	0,064 (0,008)	–	ns
Ca 0,5	0,078 (0,014)	–	ns	0,063 (0,004)	–	ns	0,065 (0,010)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

19. pielikums. *Psm3* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeli.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,024 (0,010)			0,036 (0,016)	↑	$4,12 \times 10^{-2}$
M 0,05	0,021 (0,014)	–	ns	0,030 (0,013)	–	ns
M 0,5	0,013 (0,002)	–	ns	0,027 (0,010)	–	ns
E 0,05	0,015 (0,004)	–	ns	0,020 (0,013)	↓	$3,49 \times 10^{-2}$
E 0,5	0,021 (0,001)	–	ns	0,014 (0,003)	↓	$2,10 \times 10^{-3}$
J 0,05	0,027 (0,015)	–	ns	0,024 (0,015)	–	ns
J 0,5	0,029 (0,010)	–	ns	0,038 (0,016)	–	ns
G 0,05	0,038 (0,011)	–	ns	0,022 (0,005)	–	ns
G 0,5	0,025 (0,007)	–	ns	0,034 (0,016)	–	ns
Na 0,5	0,019 (0,006)	–	ns	0,067 (0,021)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

20. pielikums. *Psmab* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	1,06 (0,08)			1,27 (0,14)	↑	$7,80 \times 10^{-3}$	1,63 (0,54)	↑	$2,69 \times 10^{-2}$
M 0,05	1,66 (0,16)	↑	$1,31 \times 10^{-2}$	2,20 (0,37)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$			
M 0,5	1,90 (0,39)	↑	$7,00 \times 10^{-4}$	2,62 (0,57)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$			
E 0,05	2,19 (0,33)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	1,61 (0,20)	–	ns			
E 0,5	2,02 (0,32)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	1,47 (0,35)	–	ns			
J 0,05	1,92 (0,43)	↑	$3,00 \times 10^{-4}$	1,52 (0,39)	–	ns			
J 0,5	1,95 (0,28)	↑	$2,00 \times 10^{-4}$	2,43 (0,43)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$			
G 0,05	1,89 (0,67)	↑	$2,60 \times 10^{-3}$	1,67 (0,34)	–	ns			
G 0,5	2,08 (0,50)	↑	$3,00 \times 10^{-4}$	2,33 (0,38)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$			
Na 0,05	2,18 (0,52)	↑	$8,00 \times 10^{-4}$	2,63 (0,43)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	2,55 (0,40)	↑	$3,50 \times 10^{-3}$
Na 0,5	1,81 (0,57)	↑	$6,30 \times 10^{-3}$	2,49 (0,56)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	1,53 (0,14)	–	ns
Ca 0,05	1,10 (0,13)	–	ns	2,45 (0,20)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	2,23 (0,40)	↑	$1,75 \times 10^{-2}$
Ca 0,5	1,03 (0,21)	–	ns	2,35 (0,37)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	2,54 (0,41)	↑	$1,00 \times 10^{-3}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

21. pielikums. *Psm6* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,76 (0,14)			0,92 (0,19)	–	ns	0,77 (0,25)	–	ns
Na 0,05	1,13 (0,27)	↑	$5,10 \times 10^{-3}$	0,94 (0,11)	–	ns	1,42 (0,19)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$
Na 0,5	1,42 (0,06)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	1,31 (0,23)	↑	$2,30 \times 10^{-3}$	1,22 (0,21)	↑	$3,10 \times 10^{-3}$
Ca 0,05	0,65 (0,08)	–	ns	0,81 (0,10)	–	ns	1,01 (0,06)	↑	$3,16 \times 10^{-2}$
Ca 0,5	1,02 (0,20)	↑	$1,43 \times 10^{-2}$	0,97 (0,16)	–	ns	1,04 (0,14)	↑	$1,57 \times 10^{-2}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

22. pielikums. *Psm6* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeli.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,16 (0,03)			0,18 (0,03)	–	ns
M 0,05	0,21 (0,11)	–	ns	0,27 (0,01)	–	ns
M 0,5	0,18 (0,04)	–	ns	0,24 (0,09)	–	ns
E 0,05	0,26 (0,14)	–	ns	0,31 (0,10)	↑	3,21x10 ⁻²
E 0,5	0,27 (0,02)	–	ns	0,20 (0,03)	–	ns
J 0,05	0,21 (0,07)	–	ns	0,24 (0,09)	–	ns
J 0,5	0,24 (0,03)	–	ns	0,25 (0,11)	–	ns
G 0,05	0,44 (0,02)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	0,25 (0,05)	–	ns
G 0,5	0,47 (0,09)	↑	<1,00x10 ⁻⁴	0,25 (0,07)	–	ns
Na 0,5	0,23 (0,05)	–	ns	0,40 (0,10)	↑	<1,00x10 ⁻⁴

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

23. pielikums. *Psm5* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	1,01 (0,25)			0,99 (0,28)	–	ns	1,02 (0,39)	–	ns
M 0,05	1,50 (0,24)	↑	$8,80 \times 10^{-3}$	1,50 (0,26)	↑	$2,60 \times 10^{-3}$			
M 0,5	1,67 (0,19)	↑	$4,00 \times 10^{-4}$	1,92 (0,40)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$			
E 0,05	1,83 (0,46)	↑	$2,00 \times 10^{-4}$	1,20 (0,37)	–	ns			
E 0,5	1,59 (0,19)	↑	$2,70 \times 10^{-3}$	1,46 (0,25)	↑	$8,00 \times 10^{-3}$			
J 0,05	1,66 (0,45)	↑	$1,90 \times 10^{-3}$	1,14 (0,48)	–	ns			
J 0,5	1,40 (0,11)	–	ns	1,57 (0,25)	↑	$2,20 \times 10^{-3}$			
G 0,05	1,40 (0,31)	–	ns	1,58 (0,56)	↑	$5,40 \times 10^{-3}$			
G 0,5	1,76 (0,55)	↑	$1,20 \times 10^{-3}$	2,33 (0,21)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$			
Na 0,05	1,71 (0,29)	↑	$2,00 \times 10^{-4}$	1,49 (0,37)	↑	$3,00 \times 10^{-3}$	1,23 (0,33)	–	ns
Na 0,5	1,50 (0,31)	↑	$8,00 \times 10^{-4}$	1,81 (0,19)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	1,10 (0,15)	–	ns
Ca 0,05	0,66 (0,15)	–	ns	1,39 (0,19)	↑	$7,70 \times 10^{-3}$	1,52 (0,25)	↑	$6,50 \times 10^{-3}$
Ca 0,5	0,90 (0,24)	–	ns	1,66 (0,22)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	1,57 (0,16)	↑	$5,40 \times 10^{-3}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

24. pielikums. *Psm5* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,35 (0,05)			0,31 (0,05)	–	ns	0,28 (0,08)	–	ns
Na 0,05	0,28 (0,06)	–	ns	0,32 (0,02)	–	ns	0,28 (0,12)	–	ns
Na 0,5	0,38 (0,01)	–	ns	0,39 (0,03)	–	ns	0,26 (0,05)	–	ns
Ca 0,05	0,36 (0,02)	–	ns	0,27 (0,04)	–	ns	0,27 (0,02)	–	ns
Ca 0,5	0,30 (0,09)	–	ns	0,35 (0,03)	–	ns	0,26 (0,04)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

25. pielikums. *Psmb5* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modelī.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,041 (0,019)			0,048 (0,030)	–	ns
M 0,05	0,027 (0,021)	–	ns	0,037 (0,013)	–	ns
M 0,5	0,025 (0,007)	–	ns	0,028 (0,016)	–	ns
E 0,05	0,019 (0,006)	–	ns	0,038 (0,024)	–	ns
E 0,5	0,028 (0,007)	–	ns	0,020 (0,007)	↓	4,10x10 ⁻²
J 0,05	0,042 (0,032)	–	ns	0,042 (0,034)	–	ns
J 0,5	0,051 (0,016)	–	ns	0,067 (0,040)	–	ns
G 0,05	0,085 (0,008)	↑	4,00x10 ⁻³	0,037 (0,012)	–	ns
G 0,5	0,069 (0,008)	–	ns	0,051 (0,019)	–	ns
Na 0,5	0,037 (0,015)	–	ns	0,109 (0,068)	↑	<1,00x10 ⁻⁴

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

26. pielikums. *Psmc6* gēna ekspresija žurku nierēs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Vielā	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	2,87 (0,49)			4,14 (1,72)	↑	$4,45 \times 10^{-2}$	3,91 (0,66)	↑	$2,10 \times 10^{-3}$
M 0,05	4,40 (0,67)	↑	$4,46 \times 10^{-2}$	5,67 (0,44)	↑	$2,28 \times 10^{-2}$			
M 0,5	4,38 (0,59)	↑	$4,81 \times 10^{-2}$	5,59 (0,50)	↑	$3,10 \times 10^{-2}$			
E 0,05	5,32 (1,09)	↑	$6,00 \times 10^{-3}$	4,42 (0,50)	–	ns			
E 0,5	4,96 (0,59)	↑	$9,20 \times 10^{-3}$	4,06 (0,92)	–	ns			
J 0,05	6,26 (0,44)	↑	$<1,00 \times 10^{-4}$	3,39 (0,57)	–	ns			
J 0,5	5,59 (0,49)	↑	$8,00 \times 10^{-4}$	6,27 (1,26)	↑	$2,60 \times 10^{-3}$			
G 0,05	4,54 (1,13)	↑	$4,92 \times 10^{-2}$	4,81 (1,14)	–	ns			
G 0,5	4,89 (0,82)	↑	$1,62 \times 10^{-2}$	6,82 (0,89)	↑	$3,80 \times 10^{-3}$			
Na 0,05	4,02 (0,63)	–	ns	4,48 (0,89)	–	ns	4,43 (0,50)	–	ns
Na 0,5	4,16 (0,60)	↑	$4,02 \times 10^{-2}$	5,49 (1,10)	↑	$1,70 \times 10^{-2}$	3,15 (0,46)	–	ns
Ca 0,05	2,44 (0,43)	–	ns	5,05 (0,35)	–	ns	4,87 (0,67)	↑	$7,00 \times 10^{-3}$
Ca 0,5	2,58 (0,37)	–	ns	5,24 (0,38)	–	ns	5,28 (0,29)	↑	$5,00 \times 10^{-4}$

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartkļūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

27. pielikums. *Psmc6* gēna ekspresija žurku aknās AV-153-Na un AV-153-Ca ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna vai aloksāna inducētā 1. tipa cukura diabēta modeļos.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Aloksāns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	1,48 (0,42)			1,50 (0,28)	–	ns	1,51 (0,31)	–	ns
Na 0,05	1,74 (0,38)	–	ns	1,62 (0,19)	–	ns	1,94 (0,41)	↑	$4,93 \times 10^{-2}$
Na 0,5	2,30 (0,03)	↑	$1,00 \times 10^{-3}$	2,18 (0,19)	↑	$1,50 \times 10^{-3}$	1,70 (0,41)	–	ns
Ca 0,05	1,28 (0,10)	–	ns	1,35 (0,27)	–	ns	1,61 (0,23)	–	ns
Ca 0,5	1,40 (0,28)	–	ns	1,53 (0,09)	–	ns	1,50 (0,15)	–	ns

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; Na – AV-153-Na; Ca – AV-153-Ca; 0,05 – deva 0,05 mg/kg; 0,5 – deva 0,5 mg/kg; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna un aloksāna N grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

28. pielikums. *Psmc6* gēna ekspresija žurku asinīs dažādu 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu ietekmē kontroles grupās un streptozotocīna inducēta 1. tipa cukura diabēta modeli.

Viela	Kontrole, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p	Streptozotocīns, RV (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
N	0,078 (0,028)			0,090 (0,032)	–	ns
M 0,05	0,066 (0,027)	–	ns	0,096 (0,051)	–	ns
M 0,5	0,045 (0,006)	–	ns	0,080 (0,029)	–	ns
E 0,05	0,060 (0,011)	–	ns	0,065 (0,029)	–	ns
E 0,5	0,081 (0,013)	–	ns	0,055 (0,011)	↓	3,22x10 ⁻²
J 0,05	0,086 (0,031)	–	ns	0,068 (0,039)	–	ns
J 0,5	0,085 (0,034)	–	ns	0,113 6(0,032)	–	ns
G 0,05	0,097 (0,017)	–	ns	0,080 (0,013)	–	ns
G 0,5	0,074 (0,019)	–	ns	0,106 (0,045)	–	ns
Na 0,5	0,046 (0,017)	–	ns	0,163 (0,037)	↑	1,00x10 ⁻⁴

N – bez apstrādes ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem; M – metkarbatons; E – etkarbatons; J – J-9-125; G – glutapirons; Na – AV-153-Na; RV – relatīvās vienības; SD – standartklūda; ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ar 1,4-DHP atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret N grupu. Streptozotocīna N grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles N grupu. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, ekspresijas izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – statistiski ticami paaugstināta ekspresija; ↓ – statistiski ticami pazemināta ekspresija. “–” – ekspresija nav statistiski ticami izmainīta.

29. pielikums. Proteīna γ H2AX fokusus eksponējošo B-limfocītu procentuālais daudzums pēc 6 h vienlaicīgas transfekcijas ar 250 ng/ml Tat un apstrādes ar dažādiem 1,4-dihidropiridīna atvasinājumiem.

	Šūnas, % (SD)	Ekspresijas izmaiņas	p
Kontrole	32,94 (0,11)		
Tat	57,83 (7,51)	↑	$6,80 \times 10^{-3}$
Tat + AV-153-Na, 5 nM	54,90 (8,80)	–	ns
Tat + AV-153-Na, 25 nM	45,83 (13,11)	–	ns
Tat + AV-153-Na, 50 nM	37,61 (1,89)	↓	$4,60 \times 10^{-3}$
Tat + AV-153-Na, 100 nM	38,02 (0,20)	↓	$4,07 \times 10^{-2}$
Tat + AV-153-Na, 500 nM	52,78 (3,93)	–	ns
Tat + AV-153-Ca, 5 nM	54,98 (4,72)	–	ns
Tat + AV-153-Ca, 25 nM	50,90 (6,33)	–	ns
Tat + AV-153-Ca, 50 nM	42,27 (0,84)	↓	$2,66 \times 10^{-2}$
Tat + AV-153-Ca, 100 nM	41,82 (0,70)	↓	$2,25 \times 10^{-2}$
Tat + AV-153-Mg, 5 nM	57,64 (7,20)	–	ns
Tat + AV-153-Mg, 25 nM	42,79 (6,63)	↓	$1,03 \times 10^{-2}$
Tat + AV-153-Mg, 50 nM	38,08 (2,07)	↓	$2,60 \times 10^{-3}$
Tat + AV-153-Mg, 100 nM	40,56 (1,23)	↓	$1,79 \times 10^{-2}$
Tat + AV-153-K, 5 nM	53,49 (6,80)	–	ns
Tat + AV-153-K, 50 nM	38,59 (4,36)	↓	$6,00 \times 10^{-3}$
Tat + AV-153-K, 100 nM	34,95 (2,14)	↓	$3,00 \times 10^{-4}$
Tat + metkarbatons, 10 nM	56,69 (3,43)	–	ns
Tat + metkarbatons, 100 nM	52,26 (5,76)	–	ns
Tat + metkarbatons, 500 nM	39,47 (1,77)	↓	$1,40 \times 10^{-3}$
Tat + J-9-125, 10 nM	49,00 (2,00)	–	ns
Tat + J-9-125, 100 nM	37,53 (9,24)	↓	$3,00 \times 10^{-4}$
Tat + J-9-125, 500 nM	42,40 (3,86)	↓	$1,39 \times 10^{-2}$
Tat + glutapirons, 10 nM	55,08 (9,77)	–	ns
Tat + glutapirons, 100 nM	49,18 (8,45)	–	ns
Tat + glutapirons, 500 nM	39,61 (1,53)	↓	$1,65 \times 10^{-2}$
Tat + PP-544-Na, 10 nM	48,96 (14,59)	–	ns
Tat + PP-544-Na, 100 nM	27,79 (7,64)	↓	$<1,00 \times 10^{-4}$

Ar 1,4-dihidropiridīna (1,4-DHP) atvasinājumiem apstrādāto grupu p vērtības ir atainotas attiecībā pret Tat grupu bez apstrādes ar 1,4-DHP atvasinājumiem. Tat grupas p vērtība ir atainota attiecībā pret kontroles grupu. Ns – $p \geq 5,00 \times 10^{-2}$. Ja $p < 5,00 \times 10^{-2}$, γ H2AX fokusus eksponējošo šūnu daudzuma izmaiņas ir attēlotas ar bultiņu: ↑ – paaugstināts daudzums; ↓ – pazemināts daudzums. “–” – daudzums nav statistiski ticami izmainīts.