



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Vaistų metabolitų tyrimas sakubitrilu / valsartanu ir rivaroksabanu paveiktose endotelio ląstelėse

Baigiamasis magistro projektas

Ugnė Venckytė

Projekto autorė

vyr. m. d. dr. Vacis Tatarūnas

Vadovas

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas

Farmacijos fakultetas

Vaistų metabolitų tyrimas sakubitrilu / valsartanu ir rivaroksabanu paveiktose endotelio ląstelėse

Baigiamasis magistro projektas

Medicininė chemija (6281CX001)

Ugnė Venckytė

Projekto autorė

vyr. m. d. dr. Vacis Tatarūnas

Vadovas

lekt. dr. Asta Špadienė

Recenzentė

Kaunas, 2021



Kauno technologijos universitetas

Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas

Farmacijos fakultetas

Ugnė Venckytė

Vaistų metabolitų tyrimas sakubitrilu / valsartanu ir rivaroksabanu paveiktose endotelio ląstelėse

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto ir Lietuvos sveikatos mokslų universiteto teisės aktų, reglamentuojančių akademinę etiką, intelektinės nuosavybės teises, jų valdymą ir perdavimą;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjusi;
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Kauno technologijos universitete ir(ar) Lietuvos sveikatos mokslų universitete galiojančią tvarką ir mano studijų sutartis bus nutraukta, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai dėl galimo akademinės etikos pažeidimo.

Ugnė Venckytė

Patvirtinta elektroniniu būdu

Venckytė, Ugnė. Vaistų metabolitų tyrimas sakubitrilo / valsartanu ir rivaroksabanu paveiktose endotelio ląstelėse. Baigiamasis magistro projektas / vadovas vyr. m. d. dr. Vacis Tatarūnas; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: provaistas, metabolitai, HUVEC, sakubitrilas / valsartanas, rivaroksabanas, 13-dokosenamidas.

Kaunas, 2021. 75 p.

Santrauka

Širdies ir kraujagyslių ligos (ŠKL) siejamos su ateroskleroze, kuri išsivysto dėl uždegiminių procesų kraujagyslėse bei endotelio funkcijos praradimo (disfunkcijos). Naujausių tyrimų duomenimis, antikoaguliantas rivaroksabanas ir širdies nepakankamumo gydymui skiriamas dviejų komponentų sakubitrilo / valsartano derinys greta savo tiesioginių indikacijų pasižymi ir endotelio funkciją gerinančiu poveikiu. Nėra aiškus šių vaistų veikimo mechanizmas. Remiantis ankstesniais Molekulinės kardiologijos laboratorijoje gautais tyrimų rezultatais, padaryta prielaida, jog fermento CYP4F2 aktyvumas gali būti susijęs su minėtų vaistų efektyvumu. Šio bandomojo tyrimo tikslas buvo ištirti rivaroksabano ir sakubitrilo metabolizmą, vertinant HUVEC ir HepG2 ląstelių metabolitus paveikus skirtingomis šių vaistų koncentracijomis bei įvertinti sakubitrilo / valsartano ir CYP4F2 inhibitoriaus poveikį fermento CYP4F2 aktyvumui endotelio ląstelių kultūrose. Tyrimui naudotos žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelės (HUVEC) buvo kultivuojamos šešių šulinėlių plokštelėse. Ląstelės buvo paveiktos septyniomis skirtingomis rivaroksabano (0,1 μM, 0,2 μM, 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM) ir sakubitrilo / valsartano (0,05 μM, 0,1 μM, 0,25 μM, 0,5 μM, 1 μM, 2,5 μM, 5 μM) koncentracijomis. Rivaroksabano tirpalas paruoštas tirpinant vaistą jaučio serumo albumine. Sakubitrilo / valsartano tirpalai buvo paruošti ištirpinus vaistą vandeniniame 0,9 proc. NaCl tirpale. Sakubitrilo metabolitų nustatymas buvo atliktas HUVEC ląstelių lizatuose. Lizatai buvo gauti apdorojant ląsteles lizės buferiu. Ląstelių transfekcija buvo atlikta ląsteles paveikiant miRNR-liposomų kompleksu (1:1). Praėjus 24 valandoms, buvo paveikiama vaistu. Transfekcija hsa-miR-24-3p imitatoriumi buvo atlikta siekiant slopinti *CYP4F2* geno, koduojančio CYP4F2 fermentą, raišką ir įvertinti šio fermento poveikį sakubitrilo metabolizmui. Metabolitai surinktose ląstelių terpėse buvo nustatyti naudojant skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskriejimo laiko masių spektrometrijos (UPLC-QTOF-MS) metodą. Kiekybinis susidariusių junginių, esančių ląstelių terpėse ir HUVEC ląstelių lizatuose, įvertinimas buvo atliktas naudojant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos (UPLC-TQD-MS) metodą. Tyrimo metu buvo identifikuoti rivaroksabano M-1, M-2, M-5, M-8, M-10, M-11, M-18 metabolitai ir sakubitrilo / valsartano M1 metabolitas HUVEC ląstelėse paveiktose skirtingomis vaistų koncentracijomis. Nustatytas naujas junginys (Z)-dokos-13-enamidas, kurio koncentracija kito priklausomai nuo rivaroksabano koncentracijos. Gauti duomenys parodė, kad sakubitrilas nėra pilnai metabolizuojamas į aktyvųjį metabolitą (sakubitrilatą) M1, kai HUVEC ląstelės yra veikiamos didesne negu 0,1 μM vaisto koncentracija. CYP4F2 fermento koncentracija padidėjo 2,6 karto, HUVEC ląsteles paveikus 5 μM sakubitrilo / valsartano koncentracija, o CYP4F2 baltymo koncentracija HepG2 ląstelėse mažėjo didėjant vaisto koncentracijai. Hsa-miR-24-3p imitatorius slopino sakubitrilo biotransformaciją į aktyvųjį metabolitą M1 HUVEC ląstelėse.

Venckytė, Ugnė. Study on Drug Metabolites in Endothelial Cells after Treatment with Sacubitril / Valsartan and Rivaroxaban. Master's Final Degree Project / Chief Researcher Dr. Vacis Tatarūnas; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: prodrug, metabolites, HUVEC, sacubitril / valsartan, rivaroxaban, 13-docosenamide.

Kaunas, 2021. 75 pages.

Summary

Cardiovascular disease (CVD) is associated with atherosclerosis, which develops due to inflammatory processes in the blood vessels and loss of endothelial function (dysfunction). Recent studies have shown that anticoagulant rivaroxaban and two-component combination of sacubitril / valsartan used for the treatment of heart failure may also have an endothelial-affecting activity in addition to their direct indications. The mechanism of action of these drugs is still not clear. Based on previous research carried out in the Laboratory of Molecular Cardiology, it has been suggested that the activity of CYP4F2 enzyme may be related to the efficacy of these drugs. The aim of this pilot study was to investigate the metabolism of rivaroxaban and sacubitril by evaluating the metabolites in HUVEC and HepG2 cells treated with different concentrations of drugs and to evaluate the effect of sacubitril / valsartan and inhibitor of CYP4F2 on the activity of CYP4F2 enzyme in endothelial cell cultures. The human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) used in this study were cultivated in a six-well plate. Cells were treated with seven different concentrations of rivaroxaban (0,1 μM, 0,2 μM, 0,5 μM, 1 μM, 2 μM, 5 μM, 10 μM) and sacubitril / valsartan (0,05 μM, 0,1 μM, 0,25 μM, 0,5 μM, 1 μM, 2,5 μM, 5 μM). Rivaroxaban solution was prepared by dissolving the drug in bovine serum albumin. Sacubitril / valsartan solutions were obtained by dissolving the drug in aqueous 0.9 % NaCl solution. Screening for sacubitril metabolites was performed in HUVEC cell lysates. Lysates were obtained by treating cells with lysis buffer. Cell transfection was performed by treating the cells with a miRNA-liposome complex (1:1). Cells were treated with the drug after 24 hours. Transfection with hsa-miR-24-3p mimic was performed to suppress the expression of *CYP4F2* gene encoding the CYP4F2 enzyme and to evaluate the effect of this enzyme on sacubitril metabolism. Metabolites in the collected cell media were identified using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS) method. Quantification of the formed compounds of in cell media and HUVEC cell lysates was performed by ultra-efficient liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-TQD-MS) technique. Metabolites M-1, M-2, M-5, M-8, M-10, M 11, M-18 of rivaroxaban and the M1 metabolite of sacubitril / valsartan have been identified in HUVEC cells exposed to different drugs concentrations. A new compound (Z)-doco-13-enamide was identified, which concentration varied with the concentration of rivaroxaban. The obtained data showed that sacubitril is not completely metabolized to the active metabolite M1 (sacubitrilat) when HUVECs are exposed to concentrations greater than 0.1 μM. CYP4F2 enzyme concentrations increase 2.6-fold with 5 μM sacubitril / valsartan treatment in HUVECs, and CYP4F2 protein concentration decreased in HepG2 cells with increasing drug concentrations. The hsa-miR-24-3p mimic inhibited the biotransformation of sacubitril to the active metabolite M1 in HUVECs.

Turinys

Lentelių sąrašas	8
Paveikslų sąrašas	9
Santrumpų sąrašas	11
Įvadas.....	14
1. Literatūros apžvalga	16
1.1. Širdies ir kraujagyslių ligos	16
1.2. Vaistų metabolizmas	16
1.3. Sakubitrilas	17
1.3.1. Sakubitrilato taikinytis – neprilizinas	17
1.3.2. Neprilizino taikinių klinikinė reikšmė	19
1.3.3. Sakubitrilato struktūros aktyvumo ryšys	19
1.4. Sakubitrilo metabolizmas	20
1.5. Valsartanas ir jo metabolizmas	21
1.6. Sakubitrilo ir valsartano derinys	22
1.7. Rivaroksabanas, jo veikimo mechanizmas ir metabolizmas	23
1.8. Endotelio ląstelės ir HUVEC	25
1.9. CYP4F2 fermentas ir jo sąsaja su ŠKL.....	26
1.10. Mikro-RNR, jų sąsaja su ŠKL ir hsa-miR-24-3p	26
1.11. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	27
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	28
2.1. Tyrimo imtis.....	28
2.2. Medžiagos ir jų laikymo sąlygos	30
2.3. Tyrimų metodai	30
2.3.1. Ląstelių terpės paruošimas	30
2.3.2. Ląstelių užsėjimas	30
2.3.3. Ląstelių mikroskopavimas	31
2.3.4. Ląstelių terpės pakeitimas	32
2.3.5. Ląstelių persėjimas	32
2.3.6. Ląstelių užšaldymas.....	33
2.3.7. Ląstelių gyvybingumo ir koncentracijos nustatymas	33
2.3.8. HepG2 ląstelių analizė dėl mikoplazmų užterštumo PGR metodu	33
2.3.9. Vaistų tirpalų paruošimas	36
2.3.10. Ląstelių veikimas vaisto tirpalu	36
2.3.11. Ląstelių lizavimas	37
2.3.12. CYP4F2 fermento koncentracijos nustatymas ELISA metodu	37
2.3.13. Ląstelių transfekcija hsa-miR-24-3p	38
2.3.14. Terpės koncentravimas ir paruošimas tolimesniems tyrimams	39
2.3.15. Kokybinė mėginių analizė ATR-FTIR spektroskopijos metodu.....	39
2.3.16. Kiekybinė bandinių analizė UV-RŠ spektroskopijos metodu	40
2.3.17. Vaisto ir metabolitų nustatymas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodu (UPLC-TQD-MS).....	41
2.3.18. Vaisto ir jo metabolitų nustatymas skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskiejimo laiko masių spektrometrijos metodu (LC-QTOF-MS)	42
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas.....	43

3.1. Rivaroksabano metabolitų tyrimai HUVEC ląstelėse.....	43
3.1.1. Rivaroksabano metabolizmo charakterizavimas HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu.....	43
3.1.2. (Z)-dokos-13-enamido koncentracijos pokyčiai HUVEC ląstelių terpių mėginiuose paveiktose skirtingomis rivaroksabano koncentracijomis.....	44
3.2. Sakubitrilo metabolitų tyrimai HUVEC ląstelėse	45
3.2.1. Sakubitrilo / valsartano ir metabolitų tyrimas HUVEC ląstelėse LC-QTOF-MS metodu....	45
3.2.2. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinis nustatymas HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu.....	46
3.2.3. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinis nustatymas HUVEC ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu ir CYP4F2 fermento koncentracijos nustatymas ELISA metodu	48
3.3. Sakubitrilo metabolitų tyrimai HepG2 ląstelėse	50
3.3.1. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinė analizė HepG2 ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu.....	50
3.3.2. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinė analizė HepG2 ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu ir CYP4F2 baltymo koncentracijos įvertinimas ELISA metodu	51
3.4. Sakubitrilo metabolitų tyrimai transfekuotose HUVEC ląstelėse	52
3.4.1. Sakubitrilo ir jo metabolitų nustatymas hsa-miR-24-3p paveiktose HUVEC ląstelėse taikant UPLC-TQD-MS metodą	52
3.5. Rezultatų aptarimas	53
3.5.1. Metodo pasirinkimas	53
3.5.2. Rivaroksabano tyrimai.....	55
3.5.3. Tyrimai su sakubitrilu / valsartanu	56
3.5.4. Naujo su vaistų poveikiu susijusio junginio nustatymas.....	56
3.5.5. Tirtų vaistų ir fermento raiškos inhibitorių poveikis CYP4F2 fermentui	57
Išvados	58
Praktinės rekomendacijos.....	59
Literatūros sąrašas	60
Publikacijų sąrašas	75
Priedai.....	76
1 priedas. Tyrime naudotos medžiagos, jų laikymo sąlygos ir gamintojai.....	76
2 priedas. Sakubitrilo, M1 metabolito ir 13-dokosenamido sulaikymo laikai nustatyti HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu.....	77
3 priedas. Identifikuotų junginių sulaikymo laikai nustatyti HUVEC ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu	78
4 priedas. Sakubitrilo ir M1 metabolito sulaikymo laikai nustatyti HepG2 ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu	79
5 priedas. 13-dokosenamido sulaikymo laikai nustatyti HepG2 ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu	80
6 priedas. Sakubitrilo ir jo aktyvaus metabolito sulaikymo laikai nustatyti transfekuotų HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu.....	81

Lentelių sąrašas

1 lentelė. <i>e-MycTM Mycoplasma PCR Detection Kit</i> rinkinio komponentai ir jų sudėtis.....	34
2 lentelė. PGR vykdymo sąlygos mikoplazmų nustatymui HepG2 ląstelių kultūroje.....	34
3 lentelė. Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodo gradientinės eliucijos sąlygos	41
4 lentelė. Sakubitrilo, M1 metabolito ir 13-dokosenamido sulaikymo plotų vertės nustatytos HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu	48
5 lentelė. CYP4F2 fermento koncentracijos pokyčiai ir identifikuotų junginių sulaikymo plotai nustatyti HUVEC ląstelių lizatų mėginiuose.....	50
6 lentelė. Identifikuotų junginių sulaikymo plotai nustatyti HepG2 ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu	51
7 lentelė. CYP4F2 fermento koncentracijos pokyčiai ir identifikuotų junginių sulaikymo plotai nustatyti HepG2 ląstelių lizatų mėginiuose	52
8 lentelė. Sakubitrilo ir jo aktyvaus metabolito sulaikymo plotų vertės nustatytos miRNR imitatoriumi paveiktų HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu	53

Paveikslų sąrašas

1 pav. Struktūrinė sakubitrilo formulė	17
2 pav. Neprilizino ekstraląstelinio domeno struktūra [41].....	18
3 pav. Neprilizino aktyvaus centro struktūra [41].....	18
4 pav. Sakubitrilo ir neprilizino virtualus sąveikų modeliavimas [52]	19
5 pav. NEP ir sakubitrilato sąveika [53]	20
6 pav. Sakubitrilo metabolizmas [54]	21
7 pav. Valsartano cheminė struktūra	21
8 pav. Valsartano metabolizmas į valeril-4-hidroksi-valsartaną.....	22
9 pav. Sakubitrilo / valsartano natrio hidratas.....	22
10 pav. Sakubitrilo / valsartano poveikio mechanizmas [65]	23
11 pav. Rivaroksabano cheminė struktūra	24
12 pav. Rivaroksabano veikimo mechanizmas [75]	24
13 pav. Rivaroksabano metabolizmas [77]	25
14 pav. Tyrimo imtis, HUVEC ląstelių tiriamųjų ir kontrolinių mėginių skaičius.....	28
15 pav. Atliktos instrumentinės analizės schema ir tirtų bei kontrolinių mėginių skaičius.....	29
16 pav. Tyrimo imtis, HepG2 ląstelių tiriamųjų ir kontrolinių mėginių skaičius	30
17 pav. Kriomėgintuvėlis – mėgintuvėlis skirtas laikyti biologines medžiagas ar ląsteles žemoje temperatūroje. Mėgintuvėlis su HUVEC ląstelėmis.....	31
18 pav. 75 cm ² paviršiaus ploto (T-75) flakonas užsėtas HUVEC ląstelėmis	31
19 pav. HUVEC (dešinėje) ir HepG2 (kairėje) ląstelių vaizdas per transmisinį mikroskopą (<i>EVOS XL Core Cell Imaging System, ThermoFisherScientific, JAV</i>).....	32
20 pav. Elektroforezės vonelė su agarozės geliu. Juodas elektrodas – katodas, raudonas – anodas. Neigiamai įkrautos molekulės juda teigiamai įkrauto anodo link (iš kairės į dešinę).....	35
21 pav. HepG2 ląstelių užterštumo mikoplazmomis įvertinimas po PGR ir elektroforezės metodų rezultatą vizualizuojant po UV šviesos šaltiniu. Užterštumo mikoplazmomis įvertinimas neigiamas – analizuojamo mėginio fragmentas sutampa su neigiamos kontrolės fragmentu	36
22 pav. Šešių šulinėlių plokštelė. Kairiajame viršutiniame šulinėlyje yra kontrolė – terpė be vaisto. HUVEC ląstelės paveiktos sakubitrilo / valsartano tirpalu atitinkamos koncentracijomis: viršutiniame viduriniame šulinėlyje – 0,05 μM, dešiniajame – 0,1 μM, apatiniame kairiajame – 0,25 μM, viduriniame – 0,5 μM, dešiniajame – 1 μM.	37
23 pav. CYP4F2 koncentracijos nustatymas HepG2 ląstelių lizatuose (pirma juostelė) ELISA metodu 96 šulinėlių mikroplokštelėje. Stebimas spalvos pokytis į geltoną po reakcijos sustabdymo pridėjus stabdančiojo tirpalo (sieros rūgšties)	38
24 pav. HUVEC ląstelių transfekcija hsa-miR-24-3p šešių šulinėlių plokštelėje. Viršutiniuose šulinėliuose yra kontrolės – HUVEC ląstelės paveiktos atitinkamai iš kairės į dešinę 0,05 μM, 0,5 μM ir 5 μM koncentracijų sakubitrilo / valsartano tirpalu. Apatiniuose šulinėliuose transfekuotos HUVEC ląstelės paveiktos sakubitrilo / valsartano tirpalu atitinkamos koncentracijomis: iš kairės į dešinę 0,05 μM, 0,5 μM ir 5 μM.....	39
25 pav. HUVEC ląstelių, paveiktų sakubitrilo / valsartano tirpalu, ir kontrolės terpių IR spektrai .	40
26 pav. HUVEC ląstelių, paveiktų sakubitrilo / valsartano tirpalu, ir kontrolės lizatų IR spektrai ..	40
27 pav. UV-RŠ spektrai (viršutinis dešinysis spektras – 5 μM sakubitrilo / valsartano tirpalas, likusieji – HUVEC ląstelių, paveiktų vaistu, terpių mėginių spektrai)	41
28 pav. Rivaroksabano metabolitų M-2, M-1 ir M-5 chromatogramos.....	43
29 pav. Identifikuotų rivaroksabano metabolitų M-8, M-10, M-11, M-18 chromatogramos.....	44

30 pav. HUVEC ląstelių terpių paveiktų rivaroksabanu ir kontrolinės terpės chromatograma, kurioje pastebimas 13-dokosenamidas sumažėjimas didinant rivaroksabano koncentraciją	45
31 pav. Identifikuoti junginiai HUVEC ląstelių terpėse paveiktose didžiausia 5 μ M sakubitrilo / valsartano koncentracija. Oranžine spalva pažymėtas valsartanas, mėlyna – sakubitrilas, žalia – 13-dokosenamidas	46
32 pav. Identifikuoti junginiai (sakubitrilas, sakubitrilatas) HUVEC ląstelių terpėje	47
33 pav. Identifikuotas (Z)-dokus-13-enamidas HUVEC ląstelių terpėje	48
34 pav. Nustatytas 13-dokosenamidas HUVEC ląstelių lizatuose.....	49
35 pav. Sakubitrilo ir M1 metabolito chromatogramos žemiau aparato detekcijos ribos HUVEC ląstelių lizatuose	49
36 pav. Nustatyti junginiai (sakubitrilas, sakubitrilatas) HepG2 ląstelių terpėje.....	51
37 pav. 13-dokosenamido, identifikuoto HepG2 ląstelių lizatuose, chromatograma	52

Santrumpų sąrašas

- [M+H]⁺ – protonizuotas molekulinis jonas;
- 20-HETE – 20-hidroksieikozatetraenoinė rūgštis;
- 5'-UTR – 5' netransliuojamas regionas (angl. *5' untranslated region*);
- 8-MOP – 8-metoksipsoralenas;
- AKF – angiotenziną konvertuojantis fermentas;
- AngII – angiotenzinas II;
- ANP - prieširdžių natriuretiniai peptidai;
- ARB – angiotenzino receptorių blokatoriai;
- ARNI – angiotenzino receptorių-nepirilizino inhibitoriai;
- AT1 – angiotenzino II 1 tipo receptoriai;
- AT2 – angiotenzino II 2 tipo receptoriai;
- ATR-FTIR – susilpninta bendrojo pobūdžio Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopija;
- BMR – branduolių magnetinis rezonansas;
- BNP – smegenų (arba B tipo) natriuretiniai peptidai;
- bp – bazių poros;
- CES – karboksilesterazės;
- cGMP – ciklinis guanozino monofosfatas;
- CYP – citochromai P450;
- CNP – C tipo natriuretiniai peptidai;
- DMEM – Dulbeko modifikuota Igljo terpė (angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*);
- DMSO – dimetilsulfoksidai;
- DNR – deoksiribonukleorūgštis;
- EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;
- ELISA – imunofermentinės analizės tyrimo metodas (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*);
- ET-1 – endotelinas-1;

FBS – veršiuko embriono serumas (angl. *fetal bovine serum*);

FII – II krešėjimo faktorius;

FIIa – aktyvuotas II krešėjimo faktorius;

FVa – aktyvuotas V krešėjimo faktorius;

FXa – aktyvuotas X krešėjimo faktorius;

GC – dujų chromatografija (angl. *gas chromatography*);

HepG2 – žmogaus hepatoblastomos ląstelių kultūra;

HEXXH – histidinas-glutamato rūgšts-x-x-glutamato rūgštis aminorūgščių seka;

HUVEC – žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelių kultūra (angl. *human umbilical vein endothelial cells*);

IL-6 – interleukinas 6;

IR – infraraudonieji spinduliai;

IUPAC – Tarptautinė bendrosios ir taikomosios chemijos sąjunga (angl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*);

LC-QTOF-MS – skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskiejimo laiko masių spektrometrija (angl. *liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry*);

MAS1R – Mas1 receptorius;

miRNP – mikroribonukleoproteinas;

miRNR (miR) – mikroribonukleorūgštis;

MRM – daugialypių reakcijų stebėjimo režimas (angl. *Multiple reaction monitoring*);

NEP – neprilizinas, neutrali endopeptidazė;

NO – azoto monoksidas;

NP – natriuretiniai peptidai;

PBS – fosfatinis buferinis druskos tirpalas (angl. *phosphate buffered saline*);

PGR – polimerazės grandininė reakcija (angl. *polymerase chain reaction, PCR*);

PK – pokytis kartais;

RAAS – renino-angiotenzino-aldosterono sistema;

RNR – ribonukleorūgštis;

ROS – reaktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*);

ŠKL – širdies ir kraujagyslių sistemos ligos;

ŠN – širdies nepakankamumas;

TBE – Tris / borato / EDTA buferinis tirpalas;

UPLC-TQD-MS – ultraefektyviosios skysčių chromatografijos – trigubo kvadrupolio masių spektrometrija (angl. *ultra performance liquid chromatography – triple quadrupole mass spectrometry*);

UV – ultravioletiniai spinduliai;

UV-RŠ – ultravioletinių spindulių – regimosios šviesos spektroskopija;

VEGF – kraujagyslių endotelio augimo faktorius (angl. *Vascular endothelial growth factor*);

VEGFR-1 – kraujagyslių endotelio augimo faktorių 1 tipo receptoriai (angl. *Vascular endothelial growth factor receptor 1*);

VKL – vainikinių kraujagyslių liga;

VTE – venų tromboembolija.

Įvadas

Širdies ir kraujagyslių sistemos ligos (ŠKL) yra pagrindinė sergamumo bei mirtingumo priežastis pasaulyje [1]. ŠKL priskiriamos tokios ligos kaip vainikinių kraujagyslių liga, miokardo infarktas, giliųjų venų trombozė, plaučių embolija ir reumatinė širdies liga [2]. Dažnai šioms ligoms gydyti yra skiriami antihipertenziniai vaistai [3] ir antikoagulantai [4]. Šiuo metu skiriami ir vaistai, kurie koreguoja metabolizmą. Vienas iš tokių vaistų yra sakubitrilas / valsartanas, kuris yra priskiriamas naujai angiotenzino receptorių-neprilizino inhibitorių (ARNI) klasei ir yra skiriamas gydyti širdies nepakankamumą (ŠN) [5]. Remiantis naujausiais tyrimais nustatyta, kad ARNI gali pasižymėti ir priešūždegiminėmis, oksidacinį stresą slopinančiomis savybėmis [6], todėl gali pagerinti endotelio funkciją [7], mažina kraujospūdį [8], hipertrofiją ir fibrozę [9] bei sumažina žmonių mirtingumą [10]. Naujausių mokslinių tyrimų duomenimis, rivaroksabanas taip pat gali pasižymėti visa eile pleotropinių efektų. Rivaroksabanas yra naujos kartos antikoaguliantas, kuris slopindamas Xa krešėjimo faktorių, slopina kraujo krešėjimo sistemos funkciją ir trombų susidarymą. Jis yra skiriamas siekiant išvengti plaučių embolijos ar insulto, vartojamas tromboembolijos gydymui ir prevencijai [11]. Buvo nustatyta, kad rivaroksabanas silpnina endotelio ląstelių degeneraciją [12] bei pasižymi priešūždegiminėmis savybėmis [13]. Šie vaistai klinikinėje praktikoje pradėti taikyti neseniai, todėl jų veikimo mechanizmas ir metabolizmas nėra plačiai išnagrinėti.

Vaisto metabolizmas yra svarbus rodiklis norint nustatyti vaisto efektyvumą, galimas sąveikas su kitais vaistais organizme, šalutinius ir toksinius poveikius, kurie gali atsirasti vykstant vaistinės medžiagos cheminiams kitimams [14]. Yra žinoma, kad daugelį ksenobiotikų metabolizuoja citochromo P450 šeimos fermentai [15], o vienas iš jų – CYP4F2 siejamas su širdies ir kraujagyslių ligomis dėl gebėjimo metabolizuoti arachidono rūgštį į 20-hidroksieikozatetraenoinę rūgštį (20-HETE), kuri gali sukelti oksidacinį stresą ir endotelio ląstelių pažeidimą [16].

Nustatyta, kad CYP fermentų raišką reguliuoja trumpos nekoduojančios mikroribonukleorūgštys (miRNR) [17]. Šių molekulių raiška stebima įvairiose ląstelėse, kuriose miRNR atlieka svarbų vaidmenį kontroliuojant daugelį biologinių procesų, tokių kaip ląstelių diferenciacija, proliferacija ir apoptozė [18]. Žinoma, jog miRNR gali nulemti uždegiminių procesų ir aterosklerozės eigą [19].

Šiame baigiamajame magistro projekte buvo siekiama nustatyti dviejų kliniškai reikšmingų vaistų – antikoagulianto rivaroksabano ir naujai ARNI klasei priklausančio vaisto sakubitrilo / valsartano metabolitus endotelio ląstelėse bei ištirti hsa-miR-24-3p, žinomo kaip CYP4F2 fermento inhibitoriaus ir siejamo su ŠKL, įtaką sakubitrilo metabolizmui.

Darbo tikslas – ištirti rivaroksabano ir sakubitrilo metabolizmą, vertinant HUVEC ir HepG2 ląstelių metabolitus paveikus skirtingomis šių vaistų koncentracijomis bei įvertinti sakubitrilo / valsartano ir CYP4F2 inhibitoriaus poveikį fermento CYP4F2 aktyvumui endotelio ląstelių kultūrose.

Darbo uždaviniai:

1. nustatyti rivaroksabano metabolitus žmogaus virkštelės venų endotelio ląstelių (HUVEC) terpių mėginiuose paveikus skirtingomis rivaroksabano koncentracijomis ir įvertinti šio vaisto poveikį metabolitų koncentracijoms tirtuose mėginiuose;

2. identifikuoti sakubitrilo / valsartano metabolitus ir (Z)-dokus-13-enamido kiekio pokyčius HUVEC ir HepG2 ląstelių terpių ir lizatų mėginiuose paveikus skirtingomis vaisto koncentracijomis;
3. įvertinti CYP4F2 fermento koncentracijos pokyčius ELISA metodu HUVEC ir HepG2 ląstelių lizatų mėginiuose paveikus skirtingomis sakubitrilo / valsartano koncentracijomis;
4. įvertinti sakubitrilo metabolizmo pokyčius HUVEC ląstelių terpių mėginiuose, jas paveikus hsa-miR-24-3p imitatoriumi, slopinančiu CYP4F2 fermento raišką.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Širdies ir kraujagyslių ligos

ŠKL yra pagrindinė mirties priežastis tiek išsivysčiusiose, tiek besivystančiose pasaulio šalyse, kuri lemia dideles ekonomines sveikatos priežiūros išlaidas [20]. Pagal Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenis 2015 m. nuo ŠKL mirė 20 mln. žmonių. Manoma, kad metinis mirtingumas dėl širdies ir kraujagyslių ligų iki 2030 metų pasieks 23,6 mln. [21]. ŠKL yra ligų grupė apimanti vainikinę kraujagyslių ligą (VKL), smegenų kraujagyslių ligas, periferinių arterijų ligą, reumatinę širdies ligą, giliųjų venų trombozę ir plaučių emboliją [22]. Šių sutrikimų metu pažeidžiamos kraujagyslės, kuriomis teka kraujas į širdies raumenį, smegenis ir galūnes, pažeidžiamas širdies raumuo dėl bakterinės infekcijos arba kojų venose susiformuoja trombai, kurie gali patekti į širdį ir plaučius. VKL yra priskiriama išeminė širdies liga ir ūmus miokardo infarktas.

Šių ligų patogenezė ir progresavimas yra glaudžiai susiję su ateroskleroze [23]. Aterosklerozė yra vainikinių arterijų sienelių lėtinis uždegimas ir patologinis lipidų nusėdimas ant jų (formuojasi aterosklerozinė plokštelė) [24]. Nustatyta, kad oksidacinis stresas ir uždegimas yra hipertenzijos ir aterosklerozės patofiziologijos dalis [25]. Oksidacinis stresas gali sukelti uždegimą, o šis – oksidacinį stresą. Abu veiksniai sukelia ląstelių pažeidimus, ypač endotelio. Fiziologinėmis sąlygomis endotelis sudaro barjerą, kuris selektyviai riboja makromolekulių judėjimą [26]. Barjeras yra gyvybiškai svarbus reguliuojant kraujagyslių tonusą, skysčių homeostazę, organizmo imunitetą [27] ir trombozę [28]. Suaktyvintos endotelio ląstelės gali išskirti įvairius citokinus, chemokinus ir augimo faktorius, kurie skatina endotelio ląstelių dauginimąsi, migraciją ir pralaidumą [29]. Endotelio ląstelės su uždegiminiu fenotipu sukelia kraujagyslių uždegimą, trombozę, dėl kurių progresuoja širdies ir kraujagyslių ligos [30], pavyzdžiui, plyšus aterosklerozinei plokštelei įvyksta ūminė arterijų trombozė, kuri yra pagrindinė miokardo infarkto ir insulto priežastis [31]. Dažnai po miokardo pažeidimų išsivysto širdies nepakankamumas, kadangi dėl mirusio širdies audinio susidaro randai, vyksta kompensacinis renino-angiotenzino bei simpatinės nervų sistemos aktyvinimas ir skilvelių persitvarkymas [32].

1.2. Vaistų metabolizmas

Vaistų metabolizmas yra molekulių cheminė modifikacija patekus į organizmą [33]. Dažnai metabolizmas susilpnina vaisto terapinį poveikį tam, kad padidėtų jų tirpumas vandenyje ir greičiau būtų pašalinami su šlapimu ar tulžimi. Tačiau yra tokių vaistų, kurie pirmiausia yra metabolizuojami į aktyvias formas prieš juos pašalinant. Tokios vaistinės medžiagos yra vadinamos provaistais.

Šiame procese dalyvauja daugelis organų [34], įskaitant virškinamojo trakto gleivinę, plaučius, inkstus, cirkuliuojančius plazmos fermentus, tokius kaip esterazės. Vis dėlto, kepenys yra svarbiausias organas, kuriame vyksta ksenobiotikų biokonversija.

Kepenų hepatocitų endoplazminio tinklo mikrosomose gausu įvairių fermentų. Pagrindinė fermentų grupė yra citochromo P450 šeima, tačiau yra ir šiai grupei nepriklausančių fermentų kaip esterazės, flavino monooksigenazės.

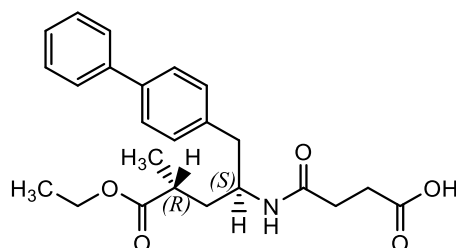
Vaistų biotransformacija vyksta dviem fazėmis [35]. I fazės metu vyksta oksidacijos, redukcijos ir hidrolizės reakcijos, kurių metu modifikuojamos, pašalinamos ar įvedamos naujos funkcinės

grupės. Oksidacijos ir redukcijos reakcijas vykdo P450 fermentai, o hidrolizės reakcijas vykdo esterazės ir amidazės. II fazės metu vyksta konjugacija su hidrofiliniu ligandu, kuris sumažina vaisto aktyvumą, padidina molekulės tirpumą vandenyje ir pagerina pašalinimą iš organizmo. Šios biokonversijos proceso metu vyksta konjugacija su gliukurono rūgštimi, sulfatu, aminorūgštimis, acetilinimas bei metilinimas. Fermentai vykdantys šio tipo reakcijas žinomi kaip transferazės.

Vaistų metabolizmo tyrimai yra svarbūs, siekiant optimizuoti junginius su optimalioms farmakokinetinėmis ir farmakodinaminėmis savybėmis, nustatyti naujus cheminius taikinius, pagrįstus aktyvių metabolitų radimu, sumažinti galimus šalutinius poveikius dėl reaktyviųjų ar toksiškų metabolitų susidarymo, palyginti ikiklinikinį gyvūnų metabolizmą su žmonėmis ir atitinkamai nustatyti vaisto dozes žmogui [36].

1.3. Sakubitrilas

Sakubitrilo cheminis pavadinimas yra 4-(((2*S*,4*R*)-1-(4-bifenilil)-5-etoksi-4-metil-5-okso-2-pentanol)amino)-4-oksobutano rūgštis (žr. 1 pav.). Šio junginio struktūros pagrindą sudaro amino butirilamidas [37]. Molekulinė sakubitrilo formulė yra C₂₄H₂₉NO₅, molinė masė – 411,49 g/mol. Sakubitrilas yra provaistas esteris, kuris hidrolizės metu paverčiamas karboksirūgštimi – sakubitrilatu, pasižyminčiu farmakologiniu aktyvumu.

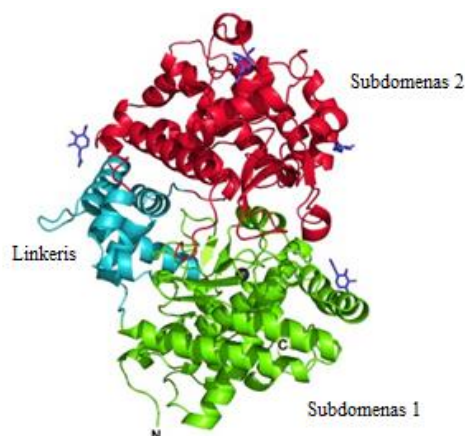


1 pav. Struktūrinė sakubitrilo formulė

1.3.1. Sakubitrilato taikinytis – neprilizinas

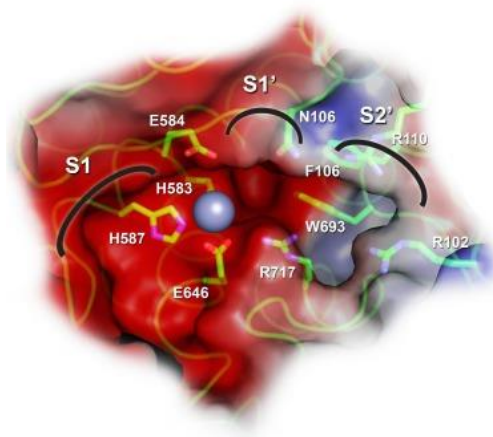
Neprilizinas (NEP) dar vadinamas neutralia endopeptidaze arba metalo-proteaze, kadangi pasižymi fermentiniu aktyvumu ir savo struktūroje turi cinko joną [38]. Tai yra integralinis membranos baltymas, kurio didžiausia koncentracija randama inkstuose, virškinimo trakte, kepenyse, plaučiuose ir riebaliniame audinyje, šiek tiek mažiau randama smegenyse ir širdyje [39]. NEP yra ekspresuojamas įvairiose ląstelėse, įskaitant epitelio, endotelio ląsteles, fibroblastus, lygiųjų raumenų ląsteles ir širdies miocitus [40].

NEP yra ekspresuojamas ant plazminės membranos paviršiaus ir yra sudarytas iš trijų domenų – intraląstelinio, transmembraninio ir ekstraląstelinio domenų, iš kurių pastarasis pasižymi kataliziniu aktyvumu [41]. Nustatyta, kad neutralios endopeptidazės ekstraląstelinis domenas yra α -spiralinės pavidalo elipsės formos (žr. 2 pav.), kurį sudaro subdomenas 1 (žalia spalva), sudarytas iš N-galo liekanos, subdomenas 2 (raudona spalva), sudarytas iš C-galo liekanos, ir linkeris (mėlyna spalva) jungiantis abi subdomenų sritis. Subdomenas 1 yra susietas su viena N-acetilgliukozamino liekana (violetinė spalva), o subdomenas 2 – su trimis. Kartu šie subdomenai uždengia centinę ertmę prie kurios jungiasi substratai [42].



2 pav. Neprilizino ekstraląstelinio domeno struktūra [41]

Neprilizino aktyvusis centras (žr. 3 pav.) yra virš subdomeno 1 [43]. Aktyviajame centre randamas konformaciškai suvaržytas HEXXH motyvas, kurio dvi histidino šoninių grandinių liekanos išlaiko cinko jono padėtį. Metalo jono padėtį taip pat padeda išlaikyti glutamatas, kuris yra virš cinko jono bei yra būtinas katalizei. Toks cinko jono ir aminorūgščių išsidėstymas sukuria ertmę su trimis poskyriais – S1, S1' ir S2'. Nustatyta, kad S1 ir S2' poskyriai nepasižymi specifiškumu ir neturi įtakos jungimosi giminingumui, tačiau pastarasis poskyris gali talpinti dideles šonines grandines. Įrodyta, kad S1' poskyris pasižymi specifiškumu didelėms aromatinėms ir hidrofobinėms šoninėms grandinėms sudarydamas hidrofobinę kišenę.



3 pav. Neprilizino aktyvaus centro struktūra [41]

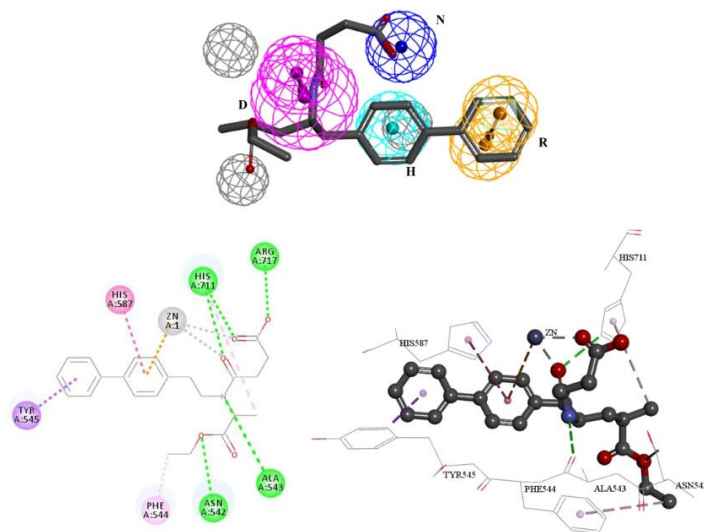
Taip pat yra su membrana nesusijusios arba tirpios formos neprilizino, kuris buvo aptinkamas kraujyje, šlapime ir smegenų skystyje. Nustatyta, kad kraujotakoje esantis NEP išlaiko savo katalizinį aktyvumą. [44, 45]. Įrodyta, kad cirkuliuojančios neutralios endopeptidazės koncentracijos ir aktyvumo pokyčiai yra susiję su įvairiomis ligomis, tokiomis kaip metaboliniai sindromai, plaučių, lėtinės reumatoidinės ir Alzheimerio ligos [46–48]. Tyrimai parodė, kad širdies nepakankamumu sergančių stabilių pacientų NEP koncentracija plazmoje yra kardiovaskulinės mirties rizikos veiksnys [49].

1.3.2. Neprilizino taikinių klinikinė reikšmė

Cinko metalo-proteazė yra atsakinga už daugelio substratų, tokių kaip natriuretiniai peptidai (NP), adrenomedulino, endotelino-1 (ET-1), P medžiagos ir angiotenzino II (AngII), skaidymą, kurie yra susiję su širdies ir kraujagyslių sistemos homeostazės palaikymu [50]. Svarbiausi neutralios endopeptidazės substratai yra prieširdžių NP (ANP), smegenų (arba B tipo) NP (BNP) ir C tipo NP (CNP) [51]. ANP ekspresuojamas ir randamas širdies prieširdžiuose ir išsiskiria kaip atsakas į prieširdžių tempimą, atsirandantį dėl intravaskulinio skysčių perkrovimo. ANP ir BNP apsaugo širdies ir kraujagyslių sistemą skatindami natriurezę ir diurezę, slopindami renino-angiotenzino-aldosterono sistemą (RAAS) ir skatindami kraujagyslių išsiplėtimą. CNP randami inkstuose, širdyje ir plaučiuose, tačiau jų koncentracija kraujagyslių endotelio ląstelėse yra didesnė. CNP išsiskiria reaguojant į kraujagyslių apkrovimo stresą ir gali apsaugoti nuo remodeliavimosi poveikio po miokardo infarkto dėl savo antifibrozinio ir antitrombozinio poveikio. C tipo natriuretiniai peptidai pasižymi minimaliomis diuretinėmis ir natriuretinėmis savybėmis.

1.3.3. Sakubitrilato struktūros aktyvumo ryšys

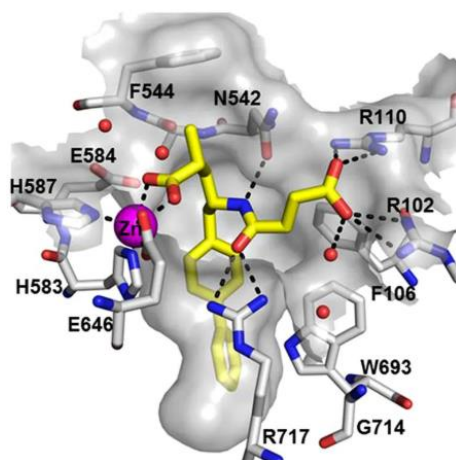
Vieno tyrimo metu buvo išsiaiškintas neutralios endopeptidazės inhibitoriaus farmakoforas [52]. Virtualios atrankos metodu buvo nustatyta, kad siekiant užtikrinti NEP fermento slopinimą, sąveikos su histidinu ir cinko jonu yra būtinos. Taip pat inhibitorius turi sudaryti hidrofobines ir aromatinį žiedų sąveikas, joninį ir vandenilinį ryšius. Virtualaus modeliavimo tarp sakubitrilo ir neprilizino tyrimo metu buvo nustatyta, kad junginys geba sudaryti visus šiuos ryšius, savo struktūroje turėdamas funkcines grupes būtinas farmakoforui. Sakubitrilas su cinko jonu gali sudaryti elektrostatines sąveikas ir su vandenilinio ryšio akceptorinėmis karbonilinėmis grupėmis (žalios spalvos brūkšninės linijos) sąveikauti su histidinu. Šis NEP inhibitorius taip pat gali sudaryti hidrofobines (žydra spalva) ir aromatinės (geltona spalva) sąveikas, joninį ryšį (mėlyna spalva) ir turi vandenilinio ryšio donorinę grupę (rausva spalva) (žr. 4 pav.).



4 pav. Sakubitrilo ir neprilizino virtualus sąveikų modeliavimas [52]

Ištirus inhibitoriaus ir neutralios endopeptidazės kristalinę struktūrą rentgeno spinduliais, nustatyta, kad sakubitrilatas grįžtamai inhibuoja nepriliziną dėl tarp junginio ir neprilizino aktyvaus centro poskyrių susidarančių įvairių nekovalentinių ryšių ir sąveikų (žr. 5 pav.) [53]. Hidrofobinės sąveikos susidaro sąveikaujant bifenilo grupei su S1' kišene ir metilo grupei su šiame poskyryje

esančiu fenilalaninu. Su cinko jonu sąveikauja karboksilato deguonies atomai sudarydami koordinacinius ryšius. Vandenilinius ryšius su asparagino ir arginino aminorūgščių šoninėmis grandinėmis sudaro sakubitrilato struktūroje esanti amidinė grupė.



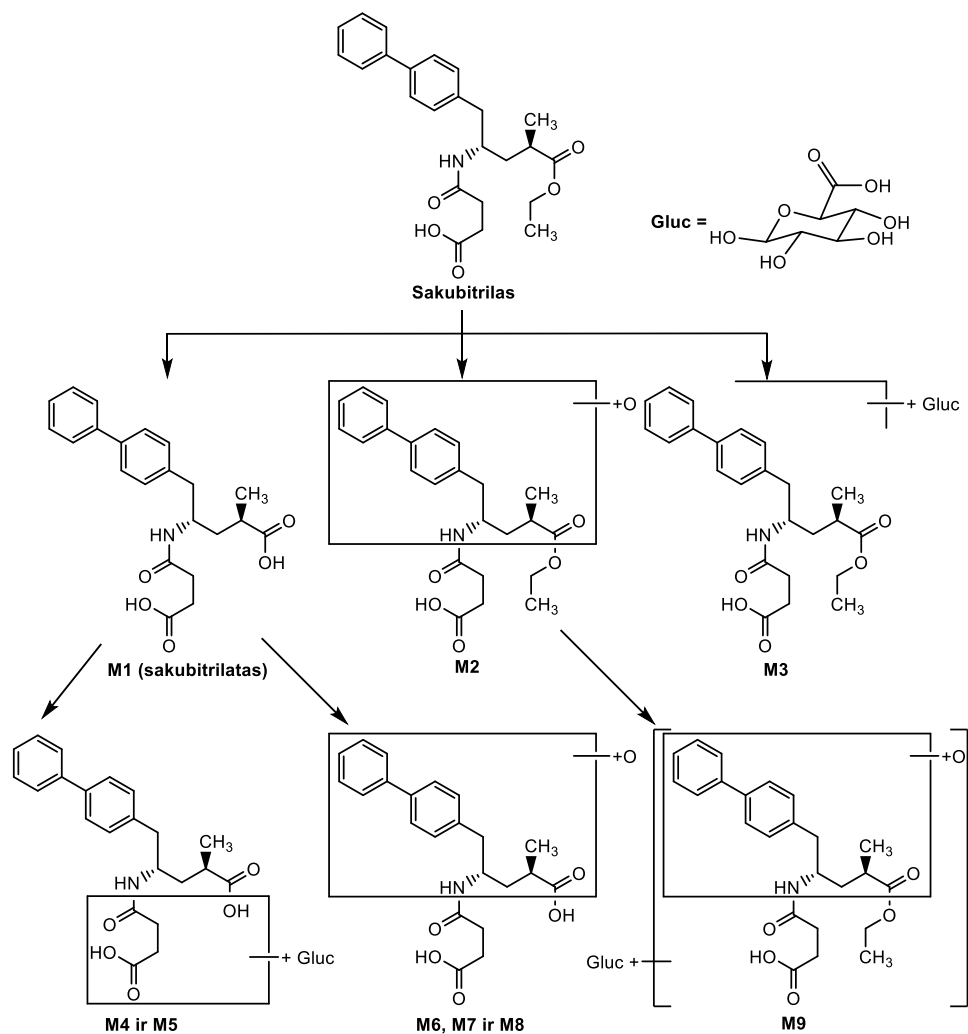
5 pav. NEP ir sakubitrilato sąveika [53]

To paties tyrimo metu, buvo nustatyta junginio aktyvumo priklausomybė nuo funkcinių grupių ryšių ir grandinių ilgio. Nustatyta, jog junginio aktyvumas sumažėja 10 ir 20 kartų, jei metilo grupė prijungta prie chiralinio anglies atomo yra pakeičiama į metoksi grupę arba yra visiškai pašalinama. Ištirta, kad optimalią sąveiką tarp arginino ir karboksilinės rūgšties užtikrina gintaro rūgšties šoninė grandinė. Optimali hidrofobinė sąveika užtikrinama sukeliant neprilizino konformacinius pokyčius sąveikaujant benzilo grupei su S1` poskyriu. Manoma, kad būtent dėl šios priežasties sakubitrilatas yra selektyvesnis NEP negu kitoms struktūriškai homologiškoms cinko metalo-peptidazėms.

1.4. Sakubitrilo metabolizmas

Sakubitrilo cheminiai kitimai buvo ištirti žmonių kraujyje, šlapime ir išmatose [54]. Sakubitrilas patekęs į organizmą yra greitai metabolizuojamas į aktyvųjį metabolitą M1 – sakubitrilatą (žr. 6 pav.). Nustatyta, kad šią hidrolizės reakciją kepenyse selektyviai vykdo karboksilesterazės-1 (CES1) fermentas, bet ne CES2 [55], todėl sakubitrilas nesąveikauja su citochromo P450 fermentais ir neturi jiems įtakos.

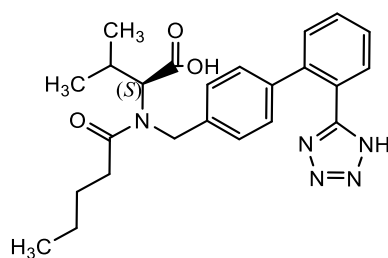
Sakubitrilatas (M1) buvo nustatytas kaip pagrindinis metabolitas, daugiausiai randamas kraujo plazmoje. Labai minimalia koncentracija kraujo plazmoje taip pat buvo identifikuoti kiti du metabolitai M6 ir M7, kurie susidaro dėl M1 metabolito oksigenacijos. Kiti galimi metabolitai buvo nustatyti pagal identifikuotų metabolitų jonų fragmentaciją, kurių koncentracija šlapime ir išmatose buvo mažesnė nei 1 proc. Šie metabolitai gali būti gliukuronidacijos (M3, M4, M5), oksigenacijos (M2, M6-M8) ir abiejų pastarųjų cheminių kitimų derinių (M9) metabolitai. Gliukuronidacijos metu vyksta gliukurono rūgšties konjugacija su metabolitu. Šis endogeninis ligandas pagerina metabolitų pašalinimą iš organizmo padidindamas tirpumą vandenyje, sumažindamas ksenobiotikų aktyvumą ir tirpumą lipiduose.



6 pav. Sakubitrilo metabolizmas [54]

1.5. Valsartanas ir jo metabolizmas

Valsartanas pagal IUPAC nomenklaturą yra 3-metil-2-(pentanoil-((4-(2-(2*H*-tetrazoil-5-il)fenil)fenil)metil)amino)-butano rūgštis (žr. 7 pav.). Vaistinės medžiagos pagrindą sudaro bifeniltetrazolo žiedas [56]. Šios vaistinės medžiagos molekulinė formulė yra $C_{24}H_{29}N_5O_3$, o molinė masė 435,52 g/mol. Valsartanas yra baltos spalvos milteliai, kurie yra labai tirpūs alkoholiuose ir menkai tirpūs vandenyje [57].

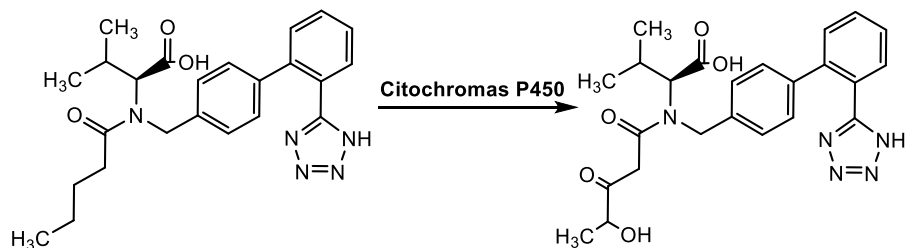


7 pav. Valsartano cheminė struktūra

Valsartanas yra nepeptidinis, selektyvus angiotenzino II pirmo tipo receptorių (AT1) antagonistas, kuris priskiriamas angiotenzino receptorių blokatorių (ARB) klasei. Valsartanas neleidžia

prisijungti AngII ir taip mažina angiotenzino II sukeltą vazokonstriktinį poveikį bei aldosterono gamybą [58]. Valsartanas yra skiriamas gydyti hipertenziją, lėtinį širdies nepakankamumą ir būklę po miokardo infarkto [59].

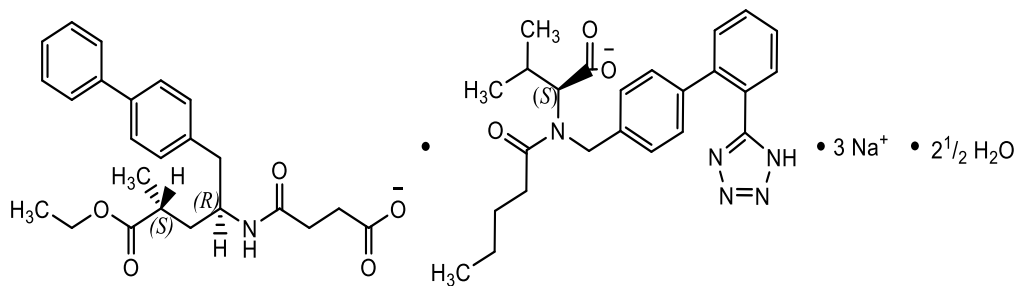
Valsartano cheminis kitimas organizme yra nežymus, metabolizuojama tik 20 proc. suvartotos dozės. Ištyrus valsartano biotransformaciją žmogaus kepenų mikrosomose buvo nustatyta, kad valsartanas yra metabolizuojamas į vieną pagrindinį neaktyvų metabolitą valeril-4-hidroksi-valsartaną. (žr. 8 pav.) [60]. *In vitro* tyrimais nustatyta, kad šią biokonversiją vykdo CYP2C9 fermentas [61].



8 pav. Valsartano metabolizmas į valeril-4-hidroksi-valsartaną

1.6. Sakubitrilo ir valsartano derinys

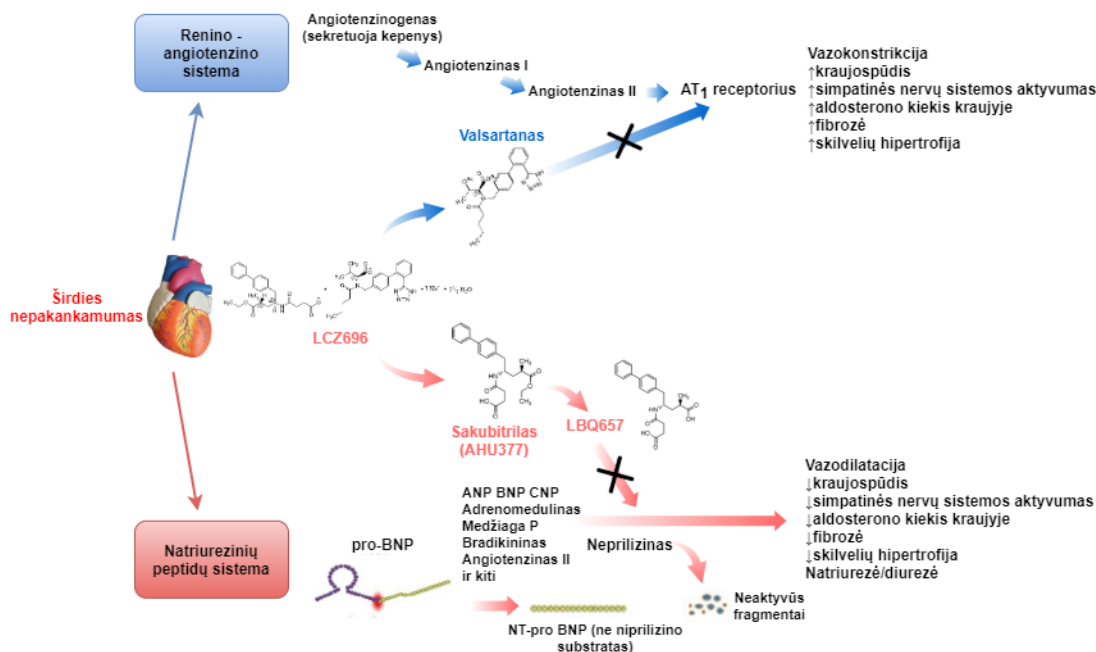
Sakubitrilas / valsartanas yra priskiriamas naujai angiotenzino receptorių-neprilizino inhibitorių vaistų klasei. Vaistas parduodamas *Entresto* komerciniu pavadinimu, natrio hidrato pavidalu (žr. 9 pav.) ir yra neseniai pradėtas taikyti klinikinėje praktikoje gydant ilgalaikį širdies nepakankamumą su sumažėjusia širdies išstūmimo frakcija. Šių junginių derinys pasižymi sinergistiniu poveikiu, kadangi tuo pačiu metu inhibuoja NEP ir AT1 receptorius.



9 pav. Sakubitrilo / valsartano natrio hidratas

Vaistinių medžiagų junginys patekęs į organizmą išsiskirsto į valsartaną ir sakubitrilą (žr. 10 pav.). Pastarasis yra provaistas, todėl yra metabolizuojamas į aktyvųjį metabolitą sakubitrilatą, kuris prisijungia prie neprilizino ir neleidžia jam katalizuoti natriuretinių peptidų. Šie NP tuomet susijungia su natriuretinių peptidų receptoriais, įvyksta guanilato ciklazės aktyvacija, dėl kurios padidėja intraląstelinio ciklinio guanozino monofosfato (cGMP) kiekis [62]. Padidėjęs cGMP kiekis sukelia vazodilataciją, dėl to sumažėja kraujospūdis, padidinamas endotelio pralaidumas, skatinama natriurezė ir diurezė, kurios sumažina širdžiai tenkanti krūvį ir slopinama hipertrofija bei fibrozė, kuri vystosi esant ŠN [63]. NEP slopinimas padidina AngII ir ET-1 kiekius, kurie sukelia kraujagyslių lygiųjų raumenų susitraukimą, skatina fibrozę ir hipertrofiją. Dėl šios priežasties sakubitrilas yra kombinuojamas su RAAS inhibitoriumi – valsartanu. Ši vaistinė medžiaga neleidžia

angiotenzinui II prisijungti prie receptorių, esančių kraujagyslių endotelyje, ir sužadinti nuo kalcio priklausomą miozino fosforilinimą [64], dėl kurio būtų sukeltas vazokonstrikcinis poveikis. Taip pat yra blokuojamas AngII prisijungimas prie receptorių esančių nefronuose, todėl neįvyksta natrio reabsorbcija. Skatinama natriurezė ir diurezė, kadangi angiotenzinas II nebegali skatinti aldosterono išsiskyrimo antinksčių žievės glomerulų zonoje.



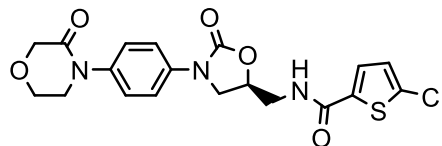
10 pav. Sakubitrilo / valsartano poveikio mechanizmas [65]

ARNI yra siejama su mažesne kosulio ir angioneurozinės edemos rizika, kadangi bradikininio metabolizmas slopinamas tik inhibuojant nepriliziną.[66] Kito tyrimo metu buvo įrodyta, kad sakubitrilas / valsartanas yra daug pranašesnis vaistas mažinantis širdies raumens remodeliavimąsi lyginant su kitais pavieniais ARB ir NEP inhibitoriais dėl sukeliama antihipertrofinio ir antifibrozinio poveikio širdies ląstelėms [67]. Taip pat nustatyta, kad pacientams sergantiems sistoliniu širdies nepakankamumu gydant sakubitrilu / valsartanu pagerėjo kraujagyslių funkcija, padidėjo jų funkcinis pajėgumas ir sumažėjo uždegiminis procesas [68]. Įrodyta, kad ARNI sumažina kardiomiocitų ląstelių mirtį [69].

Naujausių tyrimų metu buvo išsiaiškinta, kad sakubitrilo ir valsartano derinys, aktyvinant MAS1R, pagerina endotelio funkciją ir padeda atkurti endotelį, dėl to šis vaistas pagerina širdies ir kraujagyslių sistemos funkcionalumą [70].

1.7. Rivaroksabanas, jo veikimo mechanizmas ir metabolizmas

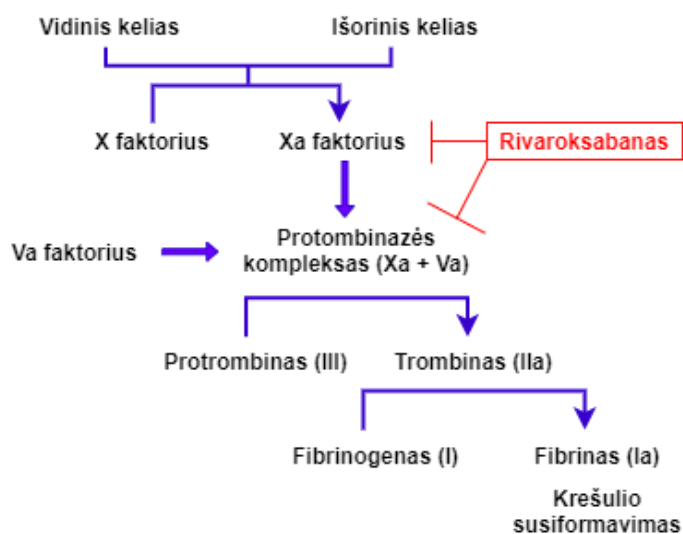
Rivaroksabano cheminis pavadinimas yra 5-chlor-N-(((5S)-2-okso-3-(4-(3-oksomorfolin-4-il)fenil)-1,3-oksazolidin-5-il)metil)tiufen-2-karboksamidas. Jo molekulinė formulė C₁₉H₁₈ClN₃O₅S, molinė masė – 435,88 g/mol. Rivaroksabanas yra baltos arba gelsvos spalvos milteliai, kurie yra tirpūs organiniuose tirpikliuose, bet netirpūs vandenyje [71]. Vaistinės medžiagos struktūros pagrindą sudaro oksazolidinono fragmentas (žr. 11 pav.).



11 pav. Rivaroksabano cheminė struktūra

Rivaroksabanas, registruotas vaistinio preparato *Xarelto* pavadinimu, yra per burną vartojamas antikoaguliantas. Šis vaistas skiriamas vartoti esant įvairioms tromboembolinėms indikacijoms, įskaitant suaugusiesiems po klubo ar kelio sąnario operacijos VTE profilaktikai, insulto ir sisteminės embolijos profilaktikai, kuriems nėra vožtuvų prieširdžių virpėjimo su vienu ar keliais rizikos veiksniais ir antrinei aterotrombozinių reiškinių prevencijai suaugusiesiems pacientams po ūminio koronarinio sindromo su padidėjusiais širdies biožymenimis, skiriant kartu su aspirinu ir (arba) tienopiridinu [72].

Rivaroksabanas veikia kaip tiesioginis, grįžtamasis Xa faktoriaus konkurencinis inhibitorius (žr. 12 pav.). FXa randamas tiek išoriniame, tiek vidiniame krešėjimo kaskados kelyje. Suaktyvintas X faktorius kartu su FVa sudaro protrombinazės kompleksą, kuris katalizuoja protrombino (FII) skilimą, kad susidarytų trombinas (FIIa). Šis faktorius lemia fibrino krešulio susidarymą ir trombocitų virtimą trombu [73]. Rivaroksabanas greitai, konkurencingai, selektyviai ir grįžtamai jungiasi prie Xa faktoriaus per S1 ir S4 kišenes ir taip nutraukia trombino gamybą [74].

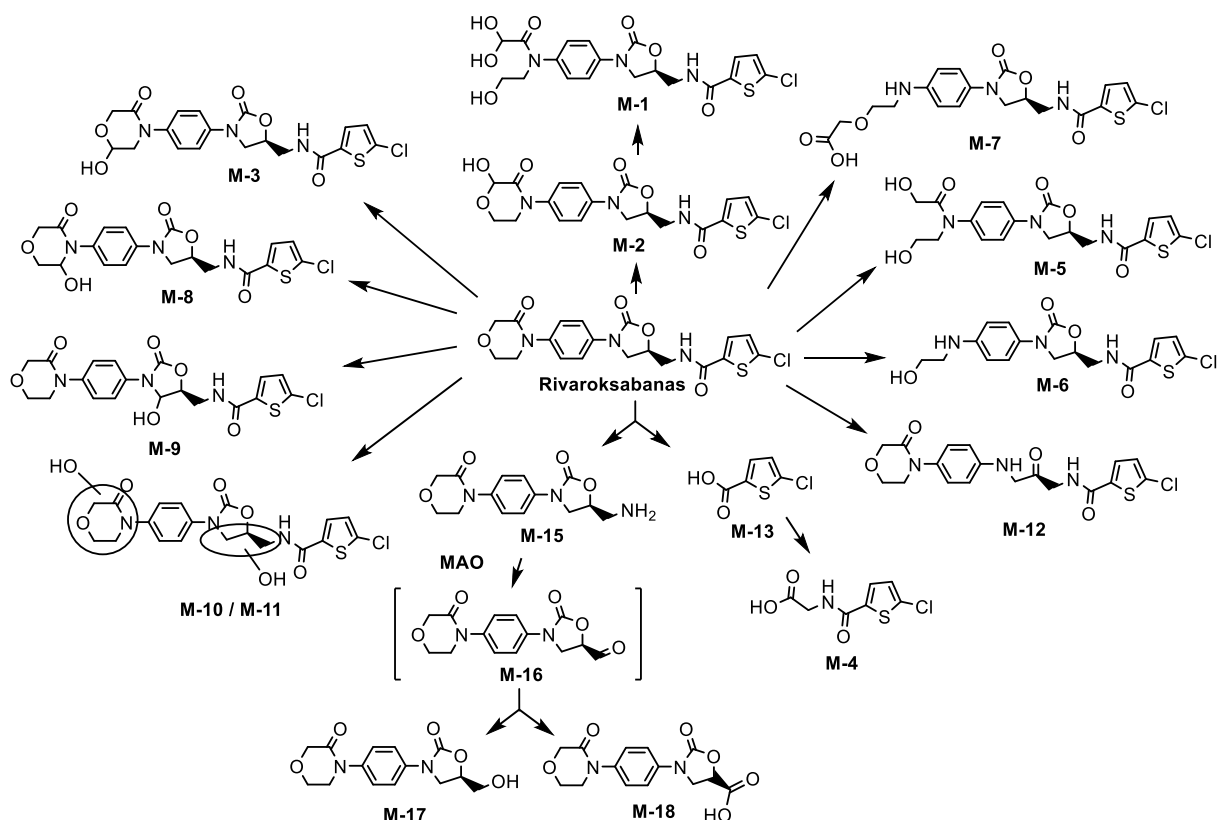


12 pav. Rivaroksabano veikimo mechanizmas [75]

Rivaroksabano metabolizmas (žr. 13 pav.) buvo ištirtas žiurkių, šunų ir žmogaus kepenų mikrosomose ir hepatocituose [76]. Nustatyta, kad rivaroksabaną metabolizuoja du pagrindiniai fermentai – CYP3A4 ir CYP2J2. Pagrindinis šio vaisto oksidacinis metabolizmo kelias yra morfolinono fragmento hidroksilinimas, kurio metu susidaro M-2, M-3 ir M-8 metabolitai ir oksazolidinono dalies hidroksilinimas, kuris lemia M-9 ir M-12 metabolitų susidarymą. Tolimesnės pagrindinio metabolito M-2 morfolinono žiedo oksidacijos (deciklizacijos) metu susidaro M-1 metabolitas, kurio nustatoma daugiausiai, o M-2 morfolinono fragmento redukcija lemia M-5 ir M-6 metabolito susidarymą [77]. Metabolitas M-12 susidaro hidroksilinant oksazolidinono tretinį

anglies atomą, kurio metu žiedas persitvarko ir išsiskiria CO₂. Taip pat buvo nustatyti bishidroksiliniai, morfolinono ir oksazolidinono hidroksilinimo deriniai, sudarantys metabolitus M-10 ir M-11.

Kitas metabolizmo kelias – laktamo amidinio ryšio hidrolizė, kurios metu susidaro M-7. Taip pat vykstant amidinio ryšio hidrolizei susidaro M-15 ir M-13. Metabolitas M-13 yra M-4 prekursorius, kadangi konjuguojantis su glicinu sudaro M-4. Metabolitas M-15 oksiduojamas į M-16 – tarpinį aldehidą, toliau vykstant šio tarpinio metabolito redukcijai susidaro alkoholis M-17, o vykstant oksidacijai susidaro karboksirūgštis M-18.



13 pav. Rivaroksabano metabolizmas [77]

1.8. Endotelio ląstelės ir HUVEC

Žmogaus endotelio ir jo disfunkcijos tyrimai yra viena pagrindinių širdies ir kraujagyslių tyrimų sritis. Endotelis palaiko kraujagyslių homeostazę [78]. Endotelis veikia ne tik kaip barjeras tarp kraujo ir organų, bet ir dalyvauja perduodant maistines medžiagas, hormonus, taip pat dalyvauja priešūždegiminiame atsake. Šis organas dalyvauja reguliuojant kraujospūdį, kraujotaką ir krešėjimą [79].

Kraujagyslių endotelis yra susijęs su įvairiomis funkcijomis ir jo pakitimai yra laikomi ligų, tokių kaip diabetas, hipertenzija, ŠKL patofiziologijos veiksniumi [80]. Įvykus kraujagyslių endotelio pažeidimams ar disfunkcijai, endotelio ląstelėse sumažėja azoto oksido (NO), kuris lemia susilpnėjusį vazoprotekcinį poveikį prieš aterosklerozę, nes padidėja reaktyvių deguonies formų (ROS) – susidaro superoksidadai, kurie sukelia oksidacinę pažeidimą [81].

Tyrimai su žmogaus virkštelės venų endotelio ląstelėmis yra naudingas žmogaus endotelio tyrimų modelis, kadangi fiziologiškai reprezentuoja žmogaus kraujagyslių endotelį [82]. Nors šis modelis neatspindi visų organizme randamų endotelio ląstelių tipų, HUVEC yra tinkamas atliekant kraujagyslių endotelio savybių ir pagrindinių biologinių kelių, susijusių su endotelio funkcija, tyrimus [83] bei ištirti naujų vaistų poveikį žmogaus endoteliui [84]. *In vitro* HUVEC modeliai buvo naudingi tiriant endotelio pažeidimus ir atkūrimą, galimus aterosklerozės poveikius ankstyvosiose stadijose ir aterosklerozės progresavimą [85].

1.9. CYP4F2 fermentas ir jo sąsaja su ŠKL

CYP4F2 fermentas, dar vadinamas ω -hidroksilaze, priklauso citochromo P450 fermentų šeimai bei dažniausiai nustatomas kepenyse ir inkstuose [86]. Šio baltymo aptikta ir endotelio ląstelėse [87]. CYP4F2 siejamas su uždegiminiais procesais. Fermentas vykdo arachidono rūgšties metabolizmą verčiant ją biologiškai aktyviu pro-uždegiminiu junginiu – 20-HETE kepenyse, inkstuose, širdyje, plaučiuose ir arterinėse kraujagyslėse [88]. Viena iš pagrindinių 20-HETE biosintezės audinių vietų yra kraujagyslių sienelių lygiųjų raumenų sluoksnis [89]. Remiantis moksliniais tyrimais, kraujagyslių endotelis gali gaminti 20-HETE esant hipoksiniams ar išeminėms sąlygoms, kurios būdingos uždegimui [90]. 20-HETE pasižymi pro-uždegiminiu ir pro-oksidaciniu poveikiu, sukeldamas kraujagyslių endotelio pažeidimus [91]. 20-HETE yra siejamas su aterosklerozės vystymusi, kadangi didindamas ROS koncentraciją kraujagyslėse, didina endotelio disfunkciją [92, 93]. Nustatyta, kad 20-HETE sintezės slopinimas, kartu slopina nuo AngII priklausomos hipertenzijos vystymąsi [94]. Be vazokonstriktinio poveikio kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelėms [95], įrodyta, kad 20-HETE stimuliuoja jų migraciją ir proliferaciją, kuri gali turėti įtakos remodeliavimosi procesams esant hipertenzijai [96] bei kraujagyslių persitvarkymui po endotelio pažeidimo [97]. Naujausi tyrimai parodė, kad 20-HETE yra stiprus endotelio AKF raiškos mikrovaskulinėse endotelio ląstelėse induktorius ir transkripcijos aktyvatorius [98].

1.10. Mikro-RNR, jų sąsaja su ŠKL ir hsa-miR-24-3p

Mikro-RNR (miRNR) tai endogeninės atskirai išsidėsčiusios 20–22 nukleotidų ilgio nekoduojančios RNR randamos augaluose, gyvūnuose ir virusuose, kurios gali nutildyti RNR ir reguliuoti potranskripcinę genų raišką [99], hibridizuojantis su iRNR netransliuojamo regiono 5'-UTR taikinio geno dalimi, ir nukreipiant susidariusį ribonukleoproteino kompleksą (miRNP) arba suskaidyti, arba slopinti jo transliaciją [100].

Nustatyta, kad miRNR dalyvauja įvairiuose biologiniuose procesuose, tokiuose kaip ląstelių proliferacija, diferenciacija, apoptozė, imuninis atsakas bei metabolizmas [101] ir yra siejami su daugelio ligų vystymusi, įskaitant vėžį, neurodegeneracines bei širdies ir kraujagyslių ligas [102–104]. Remiantis tuo, kad miRNR yra kritiniai genų reguliavimo veiksniai, jie gali būti potencialūs žmogaus ligų ir terapinių taikinių [105, 106] biologiniai žymenys.

MiRNR veikia angiogenezę ir kraujagyslių brendimą, taip pat reguliuoja kraujagyslių ir endotelio ląstelių funkcijas [107]. Tyrimų su gyvūnais metu buvo nustatyta endotelio ląstelėms specifinės miR-126 įtaka kraujagyslių vientisumui, endotelio ląstelių proliferacijai ir migracijai. Pelėms, kuriose buvo nustatytas šios mikro-RNR trūkumas, buvo būdinga defektinė angiogenezė, jų kraujagyslės buvo silpnos ir nesandarios. MiR-17/92 klasteris (įskaitant miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-92a ir miR-92b) buvo nustatytas kaip svarbus veiksnys navikų neovaskuliarizacijai ir daugiausia yra išreikštas endotelio ląstelėse [108].

Tyrimų metu nustatyta, kad daugelio ligų patogenezė ir vystymasis yra glaudžiai susiję su miRNR ekspresija ir funkcija. MiRNR atlieka svarbų reguliavimo vaidmenį atliekant širdies vystymosi, miokardo apoptozės, miokardo pertvarkymo, aritmijos, širdies nepakankamumo ir širdies hipertrofijos patofiziologijoje [109–112].

Kito tyimo metu, ištirta, kad miR-1, miR-195, miR-30a ir miR-499 koncentracijos buvo padidėjusios pacientams sergantiems įvairaus tipo širdies nepakankamumu [113–115]. Nustatyta, kad miR-1 ir miR-30a yra svarbūs širdies hipertrofijos ir apoptozės veiksniai [116]. MiR-21 veikia signalų perdavimo molekules, reguliuojančias širdies fibrozę, hipertrofiją ir apoptozę [117], o miR-195, miR-499-5p ir miR-92a dalyvauja apoptozės signalų perdavime [118, 119].

Viena iš mikro-RNR – hsa-miR-24-3p buvo nustatyta kaip gyvybiškai svarbi molekulė sąveikaujant kraujagyslių endotelio ląstelėms [120] bei mažinanti nuo endotelio priklausomus uždegiminius atsakus [121]. Įrodyta, kad miR-24-3p yra ekspresuojama širdies endotelio ląstelėse ir vaskuliarizuotuose audiniuose bei yra susijusi su kraujagyslių sutrikimais [122]. Ištirta, kad miR-24-3p veikia kaip navikų supresorius [123–126], kadangi slopina vėžinių ląstelių proliferaciją ir sukelia jų apoptozę [127–132]. Pastaraisiais metais, atsirado prieštarų įrodymų, kad ji reguliuoja ląstelių augimą ir metastazes sergant įvairiomis vėžio rūšimis, tokiomis kaip osteokarcinoma [133], skrandžio vėžys [134], kepenų ląstelių karcinoma [135, 136] ir krūties vėžys [137, 138]. Be to, ši trumpa nekoduojanti ribonukleorūgštis dalyvauja kardiomiocitų išemijoje / reperfuzijos pažeidime [139], reguliuoja CYP4F2 fermento kiekį [140] ir netiesiogiai dalyvauja krešėjimo faktorių reguliavime [141]. Taip pat miR-24 buvo identifikuotas kaip pagrindinis lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos reguliatorius. *In vitro* ir *ex vivo* modeliai parodė, kad hsa-miR-24-3p slopina kraujagyslių susidarymą inžinerinio širdies audinio modelyje [142].

1.11. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Viena iš širdies ir kraujagyslių ligų vystymosi priežasčių yra aterosklerozė, kuri yra uždegiminio pobūdžio ir atsiranda dėl endotelio disfunkcijos. Nustatyta, kad rivaroksabanas ir sakubitriolo derinys su valsartanu pasižymi priešuždegiminiu, endotelio ląstelių funkciją gerinančiu poveikiu. Šie vaistai yra skiriami gydyti ŠKL bei yra ganėtinai neseniai medicininėje praktikoje pradėti vartoti vaistai, kurių veikimo mechanizmas ir metabolizmas nėra pilnai išnagrinėti. Vaistų metabolizmo tyrimas svarbus siekiant įvertinti vaistinės medžiagos terapinį poveikį bei galimus nepageidaujamus efektus dėl susidariusių metabolitų. HUVEC ląstelių kultūra yra puikus modelis įvertinti vaistų, skirtų gydyti širdies ir kraujagyslių ligas, poveikį bei metabolizmą endotelio ląstelėse. Endotelio ląstelės yra svarbios palaikant kraujagyslių homeostazę ir reguliuojant kraujospūdį bei krešėjimą, kurio pažeidimai siejami su aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų vystymusi. CYP4F2 fermentas atsakingas už arachidono rūgšties metabolizmą į 20-HETE, kuri sukelia uždegiminius poveikius, endotelio disfunkciją ir remodeliavimosi procesus. Su ŠKL taip pat yra siejamos ir mikro-RNR, kurios gali būti potencialūs biologiniai žymenys bei yra svarbios endotelio ląstelių reguliacijai.

Remiantis išnagrinėtais literatūros duomenimis, buvo nuspręsta įvertinti rivaroksabano ir sakubitriolo metabolizmą HUVEC ląstelėse bei įvertinti sakubitriolo metabolizmui daromą įtaką, endotelio ląsteles paveikus CYP4F2 inhibitoriumi – hsa-miR-24-3p.

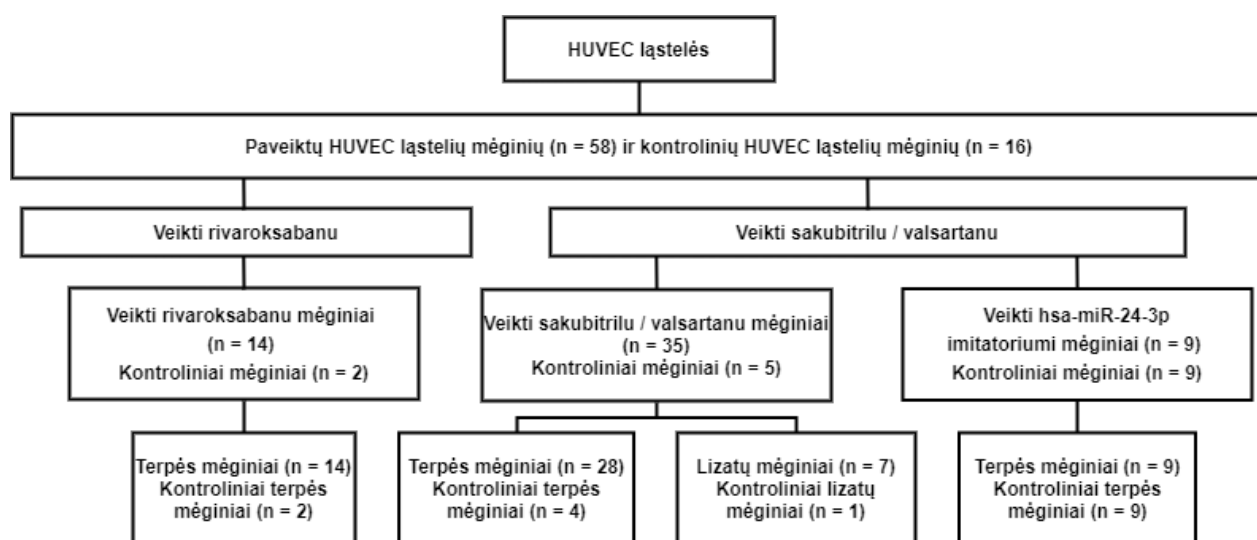
2. Medžiagos ir tyrimų metodai

Baigiamojo magistro projekto tyrimai buvo atliekami LSMU Medicinos akademijos Kardiologijos instituto Molekulinės kardiologijos laboratorijoje. Tyrimai buvo atliekami su komercinėmis HUVEC ląstelėmis (*ThermoFisherScientific*, JAV), kurios išgautos iš 14 ar mažiau dienų naujagimio virkštelės venos endotelio. Šiose ląstelėse nėra ŽIV-1 virusų, hepatito B, hepatito C ir mikoplazmų. Gamintojas nurodo, kad atšildžius ląsteles iš kriomėgintuvėlio, jų gyvybingumas turi būti didesnis negu 70 proc. Tyrime taip pat naudotos iš kepenų vėžio (hepatoblastomos) išskirtos ląstelės – HepG2. Tai nemirtinga ląstelių linija, kurių gyvybingumas didesnis negu 90 proc.

Darbas su HUVEC ir HepG2 ląstelėmis buvo atliekamas laminare (*UVP UV3 Hepa PCR Workstation*, *ThermoFisherScientific*, JAV). Tyrimo metu buvo atliekamas ląstelių kultivavimas flakonuose, transfekcija trumpomis nekoduojančiomis RNR bei ląstelių lizavimas. Tyrimų analizė vykdyta panaudojus skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos, UV ir IR spektroskopijos metodus.

2.1. Tyrimo imtis

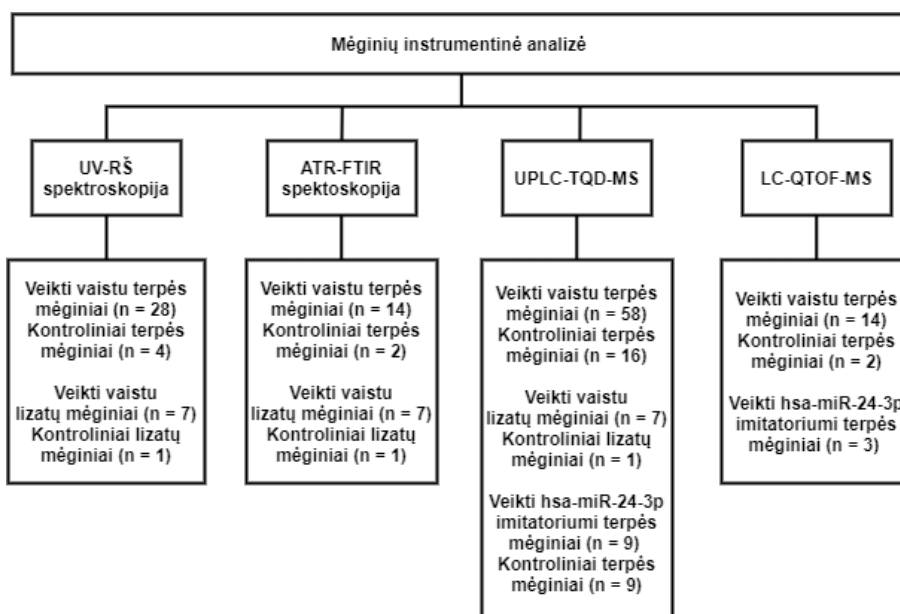
Šiame darbe įvertinti vaistų metabolizmą endotelio ląstelėse paveiktų HUVEC ląstelių mėginių iš viso buvo naudota $n = 58$: poveikiui su rivaroksabanu $n = 14$, poveikiui su sakubitrilu / valsartanu $n = 35$ ir poveikiui su hsa-miR-24-3p imitatoriumi $n = 9$ nustatyti. Kontrolinių HUVEC ląstelių mėginių iš viso naudota $n = 16$, iš kurių $n = 2$ naudoti tyrime su rivaroksabanu, $n = 5$ su sakubitrilu / valsartanu ir $n = 9$ su miRNR imitatoriumi. Tyrimams atlikti buvo surenkamos dviejų pakartojimų ląstelių terpės paveiktos rivaroksabanu, trijų pakartojimų tiriamųjų ir kontrolinių mėginių terpės bei vieno pakartojimo lizatai paveikti sakubitrilu / valsartanu (žr. 14 pav.).



14 pav. Tyrimo imtis, HUVEC ląstelių tiriamųjų ir kontrolinių mėginių skaičius

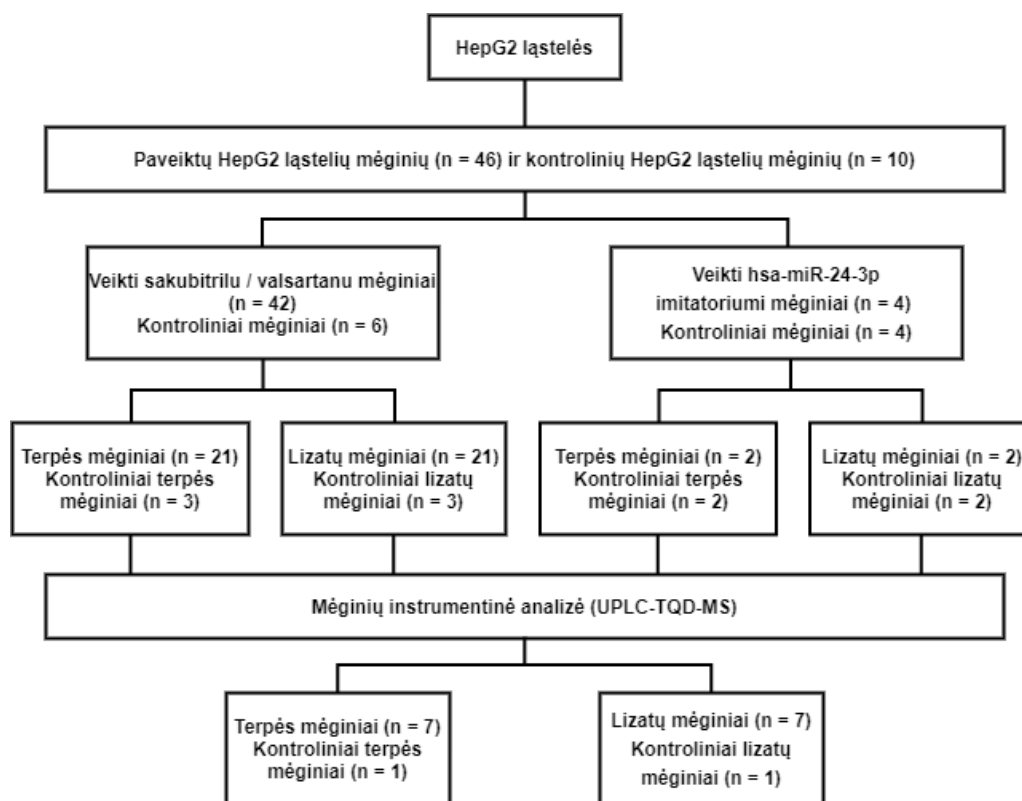
Vaistas ir jo metabolitai HUVEC ląstelėse buvo nustatinėjami įvairiais instrumentinės analizės metodais (žr. 15 pav.). Atliekant kokybinę ir kiekybinę analizę, pasinaudojus UV-RŠ spektroskopija, buvo iširta sakubitrilu / valsartanu paveiktų ląstelių terpių ($n = 28$), lizatų ($n = 7$) ir atitinkamai jų kontroliniai ($n = 4$, $n = 1$) mėginiai. Dveji tyrimų pakartojimai su vaistu (terpės $n = 14$, kontrolinių $n = 2$) bei vieno pakartojimo lizatų mėginiai (paveikti vaistu $n = 7$, kontroliniai $n = 1$) iširti ATR-FTIR spektroskopijos metodu. Visi paveikti vaistu ($n = 58$) ir kontroliniai

mėginiai (n = 16) buvo iširti ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodu siekiant nustatyti ir identifikuoti rivaroksabaną, sakubitrilą ir jų metabolitus. To paties siekta atliekant skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskiejimo laiko masių spektrometrijos metodą, kurio metu buvo analizuoti n = 7 rivaroksabanu paveiktų ląstelių terpės mėginiai ir n = 1 kontrolinis mėginys bei sakubitrilo / valsartano vaistu paveikti n = 7 ir miRNR imitatoriumi paveikti n = 3 ląstelių terpių mėginiai bei n = 1 kontrolinis mėginys.



15 pav. Atliktos instrumentinės analizės schema ir tirtų bei kontrolinių mėginių skaičius

Vaistų metabolitų tyrimams atlikti kepenų ląstelėse (iš viso paveiktų HepG2 ląstelių mėginių) buvo naudojama n = 46 mėginiai: poveikiui su sakubitrilu / valsartanu n = 42 ir poveikiui su hsa-miR-24-3p imitatoriumi n = 4 mėginiai. Kontrolinių HepG2 ląstelių mėginių iš viso naudota n = 10, iš kurių n = 6 naudoti tyrime su sakubitrilu / valsartanu ir n = 4 tyrime su miRNR imitatoriumi. Tyrimams atlikti buvo surenkamos trijų pakartojimų paveiktų vaistu ir kontrolinių mėginių terpės bei lizatai (žr. 16 pav.). Siekiant nustatyti sakubitrilą ir jo metabolitus bei jų kiekius buvo išanalizuoti vieno pakartojimo n = 7 vaistu paveikti ir n = 1 kontrolinis ląstelių terpių bei n = 7 vaistu paveikti ir n = 1 kontrolinis ląstelių lizatų mėginiai taikant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodą. Planuoto kiekio mėginių nepavyko iširti kiekybiškai dėl pasaulinės COVID-19 pandemijos bei techninių priežasčių (sugedo prietaisas, kuriuo buvo tirti mėginiai).



16 pav. Tyrimo imtis, HepG2 ląstelių tiriamųjų ir kontrolinių mėginių skaičius

2.2. Medžiagos ir jų laikymo sąlygos

Visos tyrime naudotos medžiagos, jų laikymo sąlygos bei gamintojai nurodyti 1 priede.

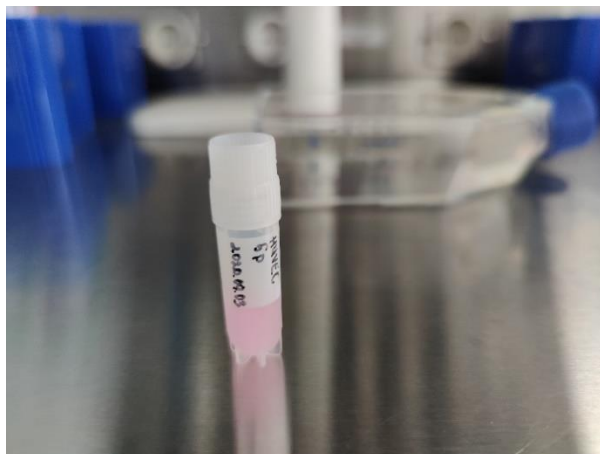
2.3. Tyrimų metodai

2.3.1. Ląstelių terpės paruošimas

Į talpą su *Medium 200* terpe (HepG2 ląstelių atveju – DMEM terpe) įpilamas 37 °C temperatūros vandens vonelėje (*Memmert WaterBath WB 14, Memmert GmbH + Co. KG, Vokietija*) sušildytas terpės priedas, skirtas didžiųjų venų endoteliui (HepG2 atveju – FBS terpės priedas). Talpa vartant išmaišoma. Iš paruoštos terpės paruošiami du mėgintuvėliai po 50 ml. Į vieną iš mėgintuvėlių įpilama apie 49,5 ml paruoštos terpės ir įpilama 450 µl penicilino-streptomicino (10 000 U/ml) antibiotikų mišinio. Mėgintuvėlis vartant išmaišomas. Į kitą mėgintuvėlį antibiotikų mišinys nededamas. Terpė be antibiotikų naudojama tolimesniuose ląstelių tyrimų etapuose, siekiant neutralizuoti tripsiną ir išvengti transfekcijos efektyvumo sumažinimo. Paruošta terpė su terpės priedu ir mėgintuvėliai yra laikomi šaldytuve +4 °C temperatūroje.

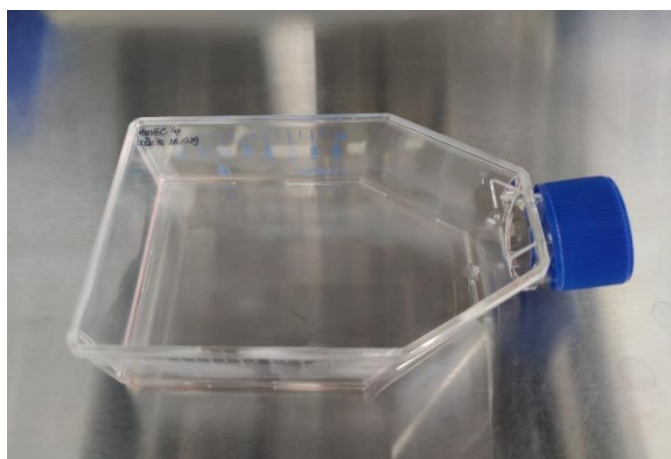
2.3.2. Ląstelių užšėjimas

Užšaldytos HUVEC ir HepG2 ląstelės laikomos šaldiklyje, -80 °C temperatūroje kriomėgintuvėliuose (žr. 17 pav.) – plastikiniuose mėgintuvėliuose, skirtuose laikyti biologines medžiagas ar ląsteles žemoje temperatūroje.



17 pav. Kriomėgintuvėlis – mėgintuvėlis skirtas laikyti biologines medžiagas ar ląsteles žemoje temperatūroje. Mėgintuvėlis su HUVEC ląstelėmis

Paruoštas terpės mėgintuvėlis su antibiotiku sušildomas 37 °C temperatūros vandens vonelėje. Kriomėgintuvėlis su užšaldytomis HUVEC ar HepG2 ląstelėmis atšildomas laikant delnuose. Į 75 cm² paviršiaus ploto (T-75) flakoną (žr. 18 pav.) įpilama 7 ml terpės su antibiotiku ir 1 ml atšildytų ląstelių prieš tai švelniai supipetuojuant ląsteles. Kriomėgintuvėliai dar kartą praplaunami terpe. Flakonas su ląstelėmis išmaišomas vartant flakoną, kad ląstelės pasiskirstytų tolygiai. Ant flakono užrašomas ląstelių linijos pavadinimas, ląstelių linijos skaičius po persėjimo, data. Flakonas mikroskopuojamas, ląstelės auginamos inkubatoriuje (*Heracell™ VIOS 160i CO2 Incubator, ThermoFisherScientific, JAV*) 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms.



18 pav. 75 cm² paviršiaus ploto (T-75) flakonas užsėtas HUVEC ląstelėmis

2.3.3. Ląstelių mikroskopavimas

Ląstelės stebimos 100 kartų padidintu (10× objektyvas, 10× okuliaras) vaizdu per transmisinį mikroskopą (*EVOS XL Core Cell Imaging System, ThermoFisherScientific, JAV*). Mikroskopavimas atliekamas norint vizualiai įvertinti flakono ar plokštelės paviršiaus padengimą ląstelėmis, jų kiekį. Pastebima, kad ląstelės 80 proc. flakono paviršiaus ploto padengia per 7 d., o plokštelės šulinėlius – per 24 val. Taip pat mikroskopavimas atliekamas stebint ląstelių atkibimą nuo flakono paviršiaus, prieš tai jas paveikus tripsinu ir inkubavus. Tuomet stebimos laisvai „plaukiojančios“ ląstelės terpeje, įvertinama ar visos ląstelės atkibo ir atliekamas persėjimas.

HUVEC ląstelių augimo metu stebima nenormali ląstelių forma bei dydis, tačiau tai yra norma. Galutinė ląstelių forma yra verpstė su plonėjančiais galais. Ląstelės tarpusavyje siejasi kolonijomis. HepG2 ląstelės yra į epitelį panašios ląstelės, netaisyklingos formos, kurios auga monosluoksniu ir formuoja būdingus ląstelių klasterius ar salas (žr. 19 pav.).



19 pav. HUVEC (dešinėje) ir HepG2 (kairėje) ląstelių vaizdas per transmissinį mikroskopą (*EVOS XL Core Cell Imaging System, ThermoFisherScientific, JAV*).

2.3.4. Ląstelių terpės pakeitimas

Terpė keičiama praėjus 48 val. po ląstelių užsėjimo ir po 2–3 dienų po terpės pakeitimo iki tol, kol ląstelės dengia ne daugiau nei 80 proc. flakono ar plokštelės augimo paviršiaus. Šis veiksmas atliekamas siekiant pašalinti žuvusias ir neprisitvirtinusias prie augimo paviršiaus ląsteles.

Terpė su antibiotikais sušildoma 37 °C temperatūros vandens vonelėje. Flakonas su ląstelėmis mikroskopuojamas. Terpė iš flakono nupilama ir užpilama 8 ml naujos terpės (paliekant per savaitgalį, kad ląstelės augtų ir nežūtų, užpilama 13 ml terpės). Inkubuojama 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms.

2.3.5. Ląstelių persėjimas

Ląstelės persėjamos, kai ląstelės dengia daugiau nei 80 proc. flakono augimo paviršiaus, dažniausiai praėjus vienai savaitei laiko po užsėjimo.

Terpės su antibiotikais ir be antibiotikų, tripsino ir PBS tirpalai sušildomi 37 °C temperatūros vandens vonelėje. Flakonas mikroskopuojamas, nupilama sena terpė. Siekiant nuplauti terpės likučius, chelatorius ir žuvusias ląsteles, ant ląstelių du kartus užpilama po 2 ml PBS tirpalo be magnio ir kalcio jonų, atsargiai pavartoma, nupilama. Siekiant atkelti ląsteles nuo flakono augimo paviršiaus ir suardyti ryšius tarp ląstelių užpilama 3 ml tripsino tirpalo, kurio sudėtyje yra EDTA. HUVEC ląstelės inkubuojamos 4 min., HepG2 ląstelės – 8 min. 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms. Mikroskopuojama – ląstelės turi “plaukti” flakono augimo paviršiuje. Jei pastebima, kad yra daug neatkibusių ląstelių galima sukelti mechaninį poveikį – švelniai trinktelėti flakoną per stalviršį. Tripsino neutralizacijai į flakoną įpilama 6 ml terpės be antibiotiko. Į 15 ml mėgintuvėlį perpilamas flakono turinys, centrifuguojama centrifugoje (*Heraeus Pico 21 Centrifuge, ThermoFisherScientific, JAV*) 7 min. 300 × g greičiu. Iš mėgintuvėlio nupilamas

supernatantas, užpilama terpės be antibiotiko iki 1 ml žymės, supipetuojama. Patikrinamas ląstelių gyvybingumas ir nustatoma koncentracija (žr. 2.3.7. Ląstelių gyvybingumo ir koncentracijos nustatymas). Vienam šulinėliui užsėti naudojama $3,0 \cdot 10^5$ gyvybingų ląstelių, siekiant po 24 val. jas naudoti eksperimentui. Į šešių šulinėlių plokštelę įpilama po 2 ml terpės su antibiotikų mišiniu ir atitinkamas kiekis HUVEC (arba HepG2) ląstelių. Ant plokštelės užrašomas ląstelių linijos pavadinimas, data. Plokštelė mikroskopuojama, inkubuojama 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms.

2.3.6. Ląstelių užšaldymas

Likusios ląstelės, nepanaudotos tolimesniems tyrimams, buvo užšaldytos. Ląstelės kaupiamos tam, kad pasiekus specifinį ląstelių linijos persėjimų skaičių būtų galima atšildyti ir tęsti tyrimą su ląstelėmis, kurių persėjimo skaičius mažesnis. Šiame tyrime naudotų HUVEC ląstelių didžiausias persėjimo skaičius buvo 10. Kuo didesnis ląstelių persėjimų skaičius, tuo prastesnis jų dalijimasis, gali kisti ląstelių morfologija ir savybės. Tyrime naudotų žmogaus hepatoblastomos ląstelių didžiausias persėjimo skaičius – 32.

Užšaldymo eiga: vykdoma ląstelių persėjimo eiga iki kol patikrinamas ląstelių gyvybingumas (žr. 2.3.5. Ląstelių persėjimas). Užšaldymui naudojama gyvybingų ląstelių koncentracija $0,5 \cdot 10^6$, siekiant užtikrinti, kad vėliau ląsteles naudojant tyrimams atsigautų reikiamas jų kiekis. Tuomet į kriomėgintuvėlį įpilama 900 µl ląstelių suspensijos (jei reikia gali būti skiedžiama terpe be antibiotiko iki reikiamo tūrio). Po to į tą patį mėgintuvėlį, palenktą 45° kampu, lėtai įpilamas DMSO tirpalas. Švelniai supipetuojama, mėgintuvėlis užsukamas, kelis kartus pavartomas. Šaldoma palaispniui – 1 val. laikomas šaldiklyje -20 °C temperatūroje, vėliau kriomėgintuvėlis pernešamas termoizoliacinėje dėžėje ant ledo ir laikomas šaldiklyje -80 °C temperatūroje.

2.3.7. Ląstelių gyvybingumo ir koncentracijos nustatymas

Į mėgintuvėlį įpilama 10 µl tripano mėlio dažo ir 10 µl ląstelių suspensijos. Švelniai supipetuojama. Į ląstelių skaičiavimo kamerą (*Countess™ Cell Counting Chamber Slides*) perkeliama 10 µl mišinio. Kamera įstatoma į automatinę ląstelių skaičiuotuvą (*Countess™ II FL Automated Cell Counter, ThermoFisherScientific, JAV*), kuriuo nustatinėjamas ląstelių gyvybingumas ir koncentracija. Siekiant kuo tiksliau nustatyti ląstelių koncentraciją, nurodyti parametrai išmatuojami keliose skirtingose kameros vietose ir išvedamas ląstelių koncentracijų rezultatų vidurkis. Pagal tai atitinkamai paskaičiuojamas reikiamas ląstelių kiekis vienam šulinėliui plokštelėje.

2.3.8. HepG2 ląstelių analizė dėl mikoplazmų užterštumo PGR metodu

Siekiant išsiaiškinti HepG2 ląstelių kultūros užterštumą mikoplazmomis, buvo atlikta mikoplazmų aptikimo analizė PGR metodu vaizdą vizualizuojant elektroforeze po UV šviesos šaltiniu. Mikoplazmų aptikimui naudojamas *e-Myco™ Mycoplasma PCR Detection Kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Pietų Korėja)* rinkinys. Rinkinio komponentai ir jų sudėtis pateikiami 1 lentelėje. Analizuojamų ląstelių DNR ekstrakcija atlikta virimo metodu.

1 lentelė. *e-MycoTM Mycoplasma PCR Detection Kit* rinkinio komponentai ir jų sudėtis

Rinkinio komponentai	Sudėtis
Iš anksto paruoštas mikoplazmos PGR mišinys (<i>e-MycoTM Mycoplasma PCR Premix</i>)	<0,01 % <i>Hot start</i> Taq DNR polimerazė <0,01 % dATP, dTTP, dGTP, dCTP <0,005 % mikoplazmų pradmenys, vidinė kontrolė <0,001 % 8-MOP (ištirpinta DMSO tirpale)
Kontrolinė DNR	<0,01 % rekombinantinė DNR su įterpta <i>M. hyorhinis</i> daline 16S seka
Išgrynintas vanduo	Išgrynintas vanduo be DNR ir RNR fermentų

Ląstelių suspensija, kurios koncentracija didesnė negu $5 \cdot 10^4$ (koncentracijos nustatymą žr. 2.3.7.

Ląstelių gyvybingumo ir koncentracijos nustatymas), perpilama į 1,5 ml mėgintuvėlį, centrifuguojama 15 sek., supernatantas nupilamas. Įpilamas 1 ml PBS tirpalo, siekiant pašalinti terpę ir žuvusias ląsteles, centrifuguojama 15 sek., supernatantas nupilamas. Praplovimas fosfatiniu buferiniu tirpalu pakartojamas dar kartą. Įpilama 100 µl PBS tirpalo, švelniai supipetuojama, ląstelių suspensija perkeliama į 200 µl tūrio mėgintuvėlį. Mėgintuvėlis virinamas termocikleryje (*Biometra TProfessional Thermocycler, Biometra GmbH, Vokietija*) 95 °C temperatūroje 10 minučių, purtomas purtykle 10 sek., centrifuguojamas 2 min. 13 000 rpm greičiu. Paruošiami mėginiai polimerazės grandininei reakcijai: į paruoštus *e-MycoTM Mycoplasma PCR Premix* mėgintuvėlius įpilama atitinkamai neigiamai kontrolei – 20 µl išgryninto vandens; teigiamai kontrolei – 10 µl išgryninto vandens ir 10 µl kontrolinės DNR; analizuojamui mėginiui – 10 µl išgryninto vandens ir 10 µl nucentifuguotų HepG2 ląstelių supernatanto. Mėgintuvėlių turinys sumaišomas purtykle. Mėgintuvėliai įdedami į termociklerį – vykdoma PGR reakcija. Šis metodas naudojamas siekiant padauginti ląstelių DNR kiekį mėgintuvėlyje. Denatūracijos metu dvigrandė DNR paverčiame viengrande. Hibridizacijos metu prisijungia pradmenys prie vienos DNR grandinės 5' galo ir kitos grandinės 3' galo. Elongacijos metu karščiui atspari Taq polimerazė sujungia nukleotidus į grandinę ir yra sintetinamas DNR fragmentas. Polimerazės grandininės reakcijos sąlygos pateiktos 2 lentelėje.

2 lentelė. PGR vykdymo sąlygos mikoplazmų nustatymui HepG2 ląstelių kultūroje

PGR sąlygos	Temperatūra	Laikas
Pradinė denatūracija	94 °C	1 min.
35 ciklai	Denatūracija	94 °C
	Hibridizacija	60 °C
	Elongacija	72 °C
Galutinė elongacija	72 °C	5 min.

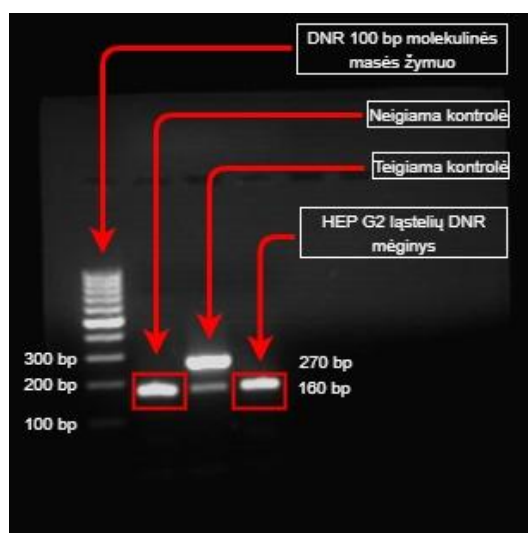
Atlikus polimerazės grandininę reakciją, vykdoma elektroforezė gelyje. Šio metodo metu yra atskiriamos nukleorūgščių molekulės pagal dydį. Neigiamai įkrautos nukleorūgštys (dėl fosfato liekanos) elektriniame lauke juda anodo (teigiamo krūvio) link. Paruošiamas 2 proc. agarozės gelis (0,7 g agarozės ištirpinama 35 ml 1× TBE buferinio tirpalo mikrobangų krosnelėje). Palaukiama, kol mišinys šiek tiek atvės, tuomet įpilama 2,5 µl etidžio bromido, išmaišoma. Mišinys supilamas į gelio liejimo plokštelę, prieš tai įdėjus šukutes šulinėliams suformuoti. Laukiama 15–20 min., kol gelis sustings. Į elektroforezės vonelę įdedamas sustingęs agarozės gelis su plokštele, prieš tai atsargiai išimant šukutes. Vonelė užpildoma 1× TBE tirpalo iki didžiausios leistinos ir nurodytos ant vonelės šono ribos (žr. 20 pav.). Paruošiami mėginiai elektroforezei: 2 µl 6× DNR dažo atskirai

sumaišoma su 10 μ l teigiama, neigiama kontrolėmis ir analizuojamu bandiniu. Mėginiai užnešami į šulinėlius – į pirmąjį dedama 5 μ l DNR 100bp molekulinės masės žymens, į kitus – po 10 μ l paruoštos neigiamos, teigiamos kontrolės ir analizuojamo bandinio. Prie vonelės prijungiami elektrodai, įjungiamas elektros srovės šaltinis. Elektroforezė vykdoma 60 min., esant 80 V įtampai. Pasibaigus DNR molekulių atskyrimo procesui, gelis perkeliamas į UV šviesos kamerą (*Biometra BDAdigital, Biometra GmbH, Vokietija*) ir naudojant programinę įrangą *BioDocAnalyze* rezultatas yra vizualizuojamas.



20 pav. Elektroforezės vonelė su agarozės geliu. Juodas elektrodas – katodas, raudonas – anodas. Neigiamai įkrautos molekulės juda teigiamai įkrauto anodo link (iš kairės į dešinę)

Atlikus DNR kiekio pagausinimą PGR metodu ir atskyrus molekules pagal dydį elektroforezės gelyje metodu bei gelio vaizdą išryškinus po UV šviesos šaltiniu pastebima, kad elektroforezė pavyko, kadangi DNR 100 bp molekulinės masės žymuo buvo atskirtas. Žinoma, kad neigiamos kontrolės molekulinė masė yra apie 160 bp, todėl gelyje pastebima, jog neigiama kontrolė yra tarp 100 bp ir 200 bp lyginant pagal molekulinės masės žymenį. Teigiamos kontrolės (trečiasis šulinėlis) masė yra apie 270 bp todėl ji yra tarp 200 bp ir 300 bp. Trečiame šulinėlyje žemiau teigiamos kontrolės, pastebima vidinė kontrolė, sutampanti su neigiama kontrole. Iš ketvirto šulinėlio atsiskyrusi HepG2 ląstelių DNR mėginio fragmentas yra apie 160 bp masės ir sutampa su neigiamos kontrolės fragmentu (žr. 21 pav.). Atsižvelgiant į šiuos duomenis, nustatyta, kad elektroforezė atlikta tinkamai ir mikoplazmų HepG2 ląstelėse nerasta.



21 pav. HepG2 ląstelių užterštumo mikoplazmomis įvertinimas po PGR ir elektroforezės metodų rezultatą vizualizuojant po UV šviesos šaltiniu. Užterštumo mikoplazmomis įvertinimas neigiamas – analizuojamo mėginio fragmentas sutampa su neigiamos kontrolės fragmentu

2.3.9. Vaistų tirpalų paruošimas

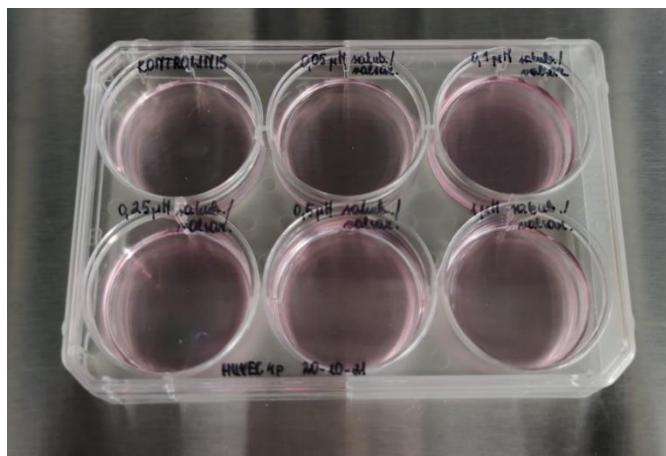
Rivaroksabano tirpalas paruoštas naudojant *Xarelto* 20 mg tabletes (Bayer, Vokietija), kuri buvo susmulkinta grūstuvėje. Žinoma, kad 92–95 proc. vaisto fiziologinėmis sąlygomis susijungia su serumo albuminu, todėl buvo paruoštas albumino tirpalas 100 mg jaučio serumo albumino tirpinant 900 μ l fiziologinio tirpalo. Rivaroksabanas tirpinamas albumino tirpale.

Sakubitrilo / valsartano tirpalas paruoštas naudojant *Entresto* 49 mg/51 mg plėvele dengta tabletes (Novartis, JAV). Tabletes susmulkinta grūstuvėje. Tirpinama 1 ml dejonizuoto vandens. Mišinys maišomas purtykle (*IKA MSI Minishaker, Akribis Scientific Limited, D. Britanija*). Centrifuguojama centrifuga (*Heraeus Megafuge 8 Centrifuge, ThermoFisherScientific, JAV*) 5 min. 8000 \times g greičiu. Tirpalas perpilamas į 500 ml talpos butelį. Pripilama dejonizuoto vandens iki 100 ml žymės. Autoklavuojama autoklave (*Systec 2540 ELV, Systec GmbH, Vokietija*).

Mėgintuvėliuose parengiamos 100 μ l tūrio, 0,1 μ M, 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M rivaroksabano arba 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M sakubitrilo / valsartano vaisto koncentracijos jas skiedžiant su 0,9 mg/ml natrio chlorido tirpalu. Mėgintuvėliai su paruoštais tirpalais sumaišomi purtykle ir laikomi šaldytuve +4 $^{\circ}$ C temperatūroje.

2.3.10. Ląstelių veikimas vaisto tirpalu

Terpė iš šešių šulinėlių plokštelės pakeičiama – sena terpė nupilama, užpilama 2 ml naujos terpės su antibiotikų mišiniu. Į penkis šulinėlius įpilama 10 μ l paruošto atitinkamų koncentracijų (0,1–10 μ M) rivaroksabano arba (0,05–5 μ M) sakubitrilo / valsartano tirpalo prieš tai vaistą švelniai supipetavus. Šeštasis šulinėlis kontrolinis – į jį vaistas nepilamas. Plokštelė (žr. 22 pav.) su ląstelėmis išmaišoma švelniai varant, kad vaistas pasiskirstytų po visą šulinėlio plotą. Ant plokštelės užrašomas ląstelių linijos pavadinimas, data, pažymimos vaisto koncentracijos, esančios kiekviename šulinėlyje. Plokštelė mikroskopuojama, inkubuojama 37 $^{\circ}$ C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms.



22 pav. Šešių šulinėlių plokštelė. Kairiajame viršutiniame šulinėlyje yra kontrolė – terpė be vaisto. HUVEC ląstelės paveiktos sakubitriolo / valsartano tirpalu atitinkamos koncentracijomis: viršutiniame viduriniame šulinėlyje – 0,05 μM , dešiniajame – 0,1 μM , apatiniame kairiajame – 0,25 μM , viduriniame – 0,5 μM , dešiniajame – 1 μM .

2.3.11. Ląstelių lizavimas

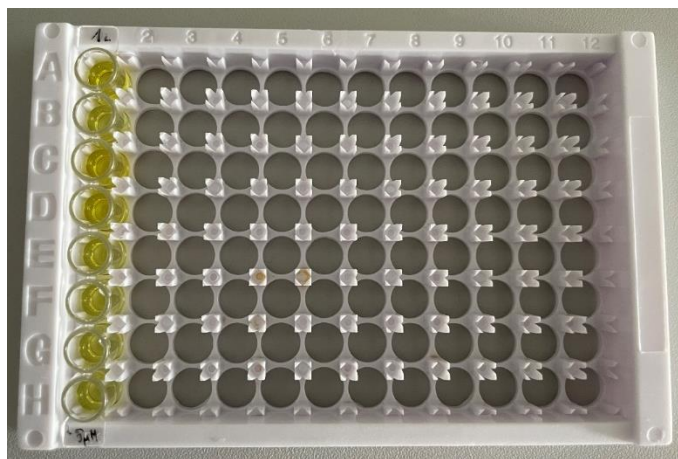
Surinkus terpę po 24 val. nuo ląstelių paveikimo vaistu, vykdomas ląstelių lizavimas, siekiant sužinoti ar metabolitai susidarė ląstelių viduje. Lizavimo procedūros eiga: į kiekvieną šulinėlį įpilama po 1 ml PBS tirpalo norint pašalinti žuvusias ląsteles ir nuplauti terpės likučius. Tirpalas nusiurbiamas, užpilama 750 μl tripsino tirpalo, kuris suardydamas ryšius tarp ląstelių jas atkelia nuo plokštelės. HUVEC ląstelės inkubuojamos 4 min., HepG2 ląstelės – 8 min. 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms. Po inkubacijos pro mikroskopą stebima ar atkibo visos ląstelės – ląstelės turi „plaukti“ šulinėlių paviršiuje. Jei pastebima, kad ląstelės nėra atkibusios galima sukelti mechaninį poveikį – švelniai trinktelėti šešių šulinėlių plokštelę per stalviršį. Į mėgintuvėlius įpilama po 1,2 ml terpės be antibiotiko. Ląstelių suspensija švelniai supipetavus perkeliama į ependorfus. Centrifuguojama centrifuga (*Heraeus Pico 21 Centrifuge, ThermoFisherScientific, JAV*) 5 min. 300 \times g greičiu. Supernatantas nupilamas, į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama po 1 ml šalto PBS tirpalo, švelniai supipetuojuama, centrifuguojama centrifuga (*Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, ThermoFisherScientific, JAV*), palaikančia 4 °C temperatūrą, 10 min. 1500 rpm greičiu. Supernatantas nusiurbiamas, įpilama 300 μl šalto lizės buferio, mėgintuvėlių turinys sumaišomas purtykle, inkubuojama termoizoliacinėje dėžutėje ant ledo 10 min., maišoma purtykle. Mėgintuvėliai centrifuguojami 15 000 rpm greičiu 15 min. 4 °C temperatūroje. Supernatantas perpilamas į naujus mėgintuvėlius, kurie pernešami termoizoliacinėje dėžutėje ant ledo ir laikomi šaldiklyje -80 °C temperatūroje.

2.3.12. CYP4F2 fermento koncentracijos nustatymas ELISA metodu

Citochromo P450 4F2 baltymo įvertinimas atliktas naudojant „sumuštinio“ tipo imunofermentinį analizės metodą ELISA. Fermento kiekio įvertinimas nustatytas kontroliniuose ir sakubitriolo / valsartanu paveiktų ląstelių lizatuose. Lizatų paruošimo eiga aprašyta 2.3.11. Ląstelių lizavimas skyriuje.

Citochromo P450 4F2 baltymo koncentracijos nustatymui buvo naudotas *Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Cytochrome P450 4F2 (CYP4F2) (Cloud-Clone Corp., JAV)* ELISA rinkinys. Į mikroplokštelės juostelių šulinėlius įpilama po 100 μl analizuojamų mėginių ląstelių

lizatų. Mikroplokštelė uždengiama plėvele, inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje. Šio etapo metu mėginiuose esantys CYP4F2 antigenai jungiasi su specifiniais antikūnais, kuriais yra iš anksto padengtas šulinėlio dugnas. Šulinėlių turinys nusiurbiamas, į kiekvieną šulinėlį įpilama po 100 µl A reagento, šulinėliai uždengiami plėvele, inkubuojama 1 val. 37 °C temperatūroje. Reagente A yra biotinu konjuguotų antikūnų specifiskų CYP4F2 fermentui. Tuomet vykdomas plovimo etapas – šulinėliai tris kartus praplaunami 350 µl plovimo buferiu (pašalinami nesusijungę antikūnai ir antigenai), šulinėliai gerai nusausinami ant popieriaus. Į kiekvieną šulinėlį įpilama B reagento po 100 µl, šulinėliai uždengiami plėvele, inkubuojama 30 min. 37 °C temperatūroje. B reagentas dedamas siekiant padidinti metodo jautrumą, kadangi jame esantis avidinas konjuguotas su krienų peroksidaze jungiasi su biotinu. Kartojamas praplovimo etapas penkis kartus, plokštelė gerai nusausinama. Į šulinėlius įpilama po 90 µl substrato tirpalo, šulinėliai uždengiami plėvele, inkubuojama 20 min. 37 °C temperatūroje tamsoje. Šio etapo metu substratas tetrametilbenzidinas jungiasi prie fermento krienų peroksidazės. Skystis šulinėliuose nusidažo mėlyna spalva, jei šiuose susidaro CYP4F2 fermento, biotinu konjuguotų antikūnų ir fermentu konjuguotų avidino kompleksai. Reakcija sustabdoma į šulinėlius įpylus po 50 µl stabdančiojo tirpalo (sieros rūgšties), stebimas tirpalo spalvos pokytis iš mėlynos į geltoną (žr. 23 pav.). Atliekamas spektrofotometrinis matavimas, esant 450 nm bangos ilgiui su plokštelių skaitytuvu *Stat Fax 4200* (*Awaranss Technologies*, JAV). Išmatuoti mėginių optiniai tankiai parodo CYP4F2 fermento koncentraciją mėginiuose.



23 pav. CYP4F2 koncentracijos nustatymas HepG2 ląstelių lizatuose (pirma juostelė) ELISA metodu 96 šulinėlių mikroplokštelėje. Stebimas spalvos pokytis į geltoną po reakcijos sustabdymo pridėjus stabdančiojo tirpalo (sieros rūgšties)

2.3.13. Ląstelių transfekcija hsa-miR-24-3p

Transfekcija atliekama po 24 val. nuo ląstelių užsėjimo, ląstelėms padengus 60–80 proc. šulinėlio augimo paviršiaus ploto. Siekiant išvengti transfekcijos efektyvumo sumažėjimo, yra naudojama terpė be antibiotikų, kuri sušildoma vandens vonelėje.

Atliekami lipofektamino ir miRNR skiedimai trims šulinėliams. Į du ependorfus įpilama po 450 µl specialios terpės. Į vieną mėgintuvėlį įpilama 27 µl lipofektamino, į kitą – 9 µl miRNR. Mėgintuvėliai sumaišomi purtykle.

Į praskiesto hsa-miR-24-3p mėgintuvėlį įpilamas toks pats tūris praskiesto lipofektamino – 459 µl (santykis miRNR:lipofektaminas, 1:1). Inkubuojama 5–10 min. kambario temperatūroje, kad

susidarytų liposomos, kurios apgaubtų miRNR ir perneštų ją į ląsteles. Šulinėliuose pakeičiama ląstelių terpė su pašildyta terpe be antibiotikų. Į tris šulinėlius lėtai virš terpės lašinant po vieną lašą, po visą šulinėlio plotą, įlašinama po 300 µl miRNR-liposomų komplekso. Terpė švelniai supipetuojama. Kiti trys šulinėliai kontroliniai – į juos miRNR-liposomų kompleksas nepilamas. Inkubuojama 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms.

Praėjus 24 val. po ląstelių transfekcijos, iš šulinėlių terpė nupilama, užpilama nauja terpė su antibiotikais, prieš tai ją pašildžius vandens vonelėje. Į kontrolinius ir transfekuotų ląstelių šulinėlius įpilama po 10 µl paruoštų sakubitrilo / valsartano vaisto koncentracijų (0,05 µM, 0,5 µM, 5 µM) (žr. 24 pav.). Inkubuojama 37 °C temperatūroje, esant 5 proc. CO₂ ir 20 proc. O₂ sąlygoms. Toliau vykdomas terpės koncentravimas (žr. 2.2.14. Terpės koncentravimas ir paruošimas tolimesniems tyrimams).



24 pav. HUVEC ląstelių transfekcija hsa-miR-24-3p šešių šulinėlių plokštelėje. Viršutiniuose šulinėliuose yra kontrolės – HUVEC ląstelės paveiktos atitinkamai iš kairės į dešinę 0,05 µM, 0,5 µM ir 5 µM koncentracijų sakubitrilo / valsartano tirpalu. Apatiniuose šulinėliuose transfekuotos HUVEC ląstelės paveiktos sakubitrilo / valsartano tirpalu atitinkamos koncentracijomis: iš kairės į dešinę 0,05 µM, 0,5 µM ir 5 µM

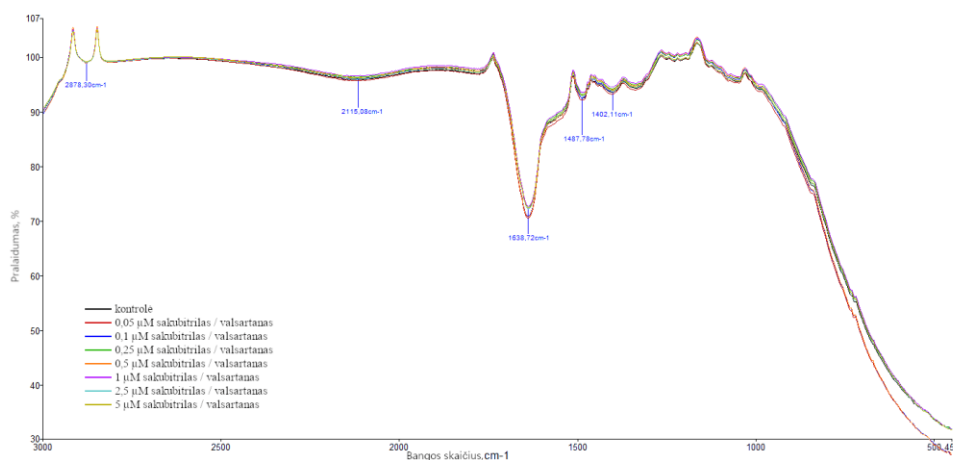
2.3.14. Terpės koncentravimas ir paruošimas tolimesniems tyrimams

Praėjus 24 val. po ląstelių paveikimu vaistu, terpė iš šešių šulinėlių plokštelės surenkama į 1,5 ml mėgintuvėlius (ependorfus). Mėgintuvėliai su terpe koncentruojami koncentracijoje (*SavantTM DNA120 SpeedVacTM Concentrator, ThermoFisherScientific, JAV*) vakuume +55 °C temperatūroje iki 300 µl tūrio. Sukoncentruota terpė perkeliama į cheminius mėgintuvėlius su integruotu stiklo įdėklu. Tęsimi tyrimai naudojant skysčių chromatografijos-masių spektrometrijos, infraraudonųjų ir ultravioletinių spindulių spektroskopijos metodus.

2.3.15. Kokybinė mėginių analizė ATR-FTIR spektroskopijos metodu

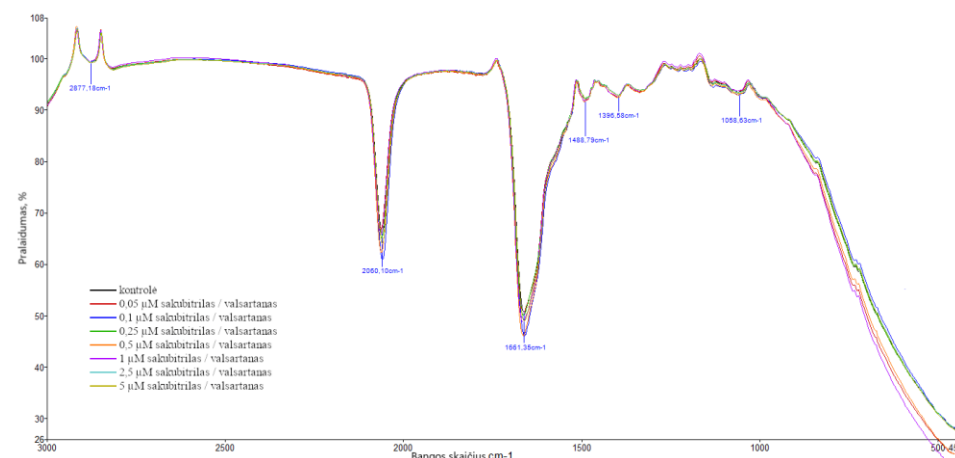
HUVEC ląstelių terpės ir lizatų IR spektroskopijos analizė buvo atliekama su IR spektrofotometru (*Spectrum TwoTM FT-IR Spectrometer, PerkinElmer, JAV*) valdomu kompiuterine programa *PerkinElmer SpectrumTM*. Iš pradžių atliekamas foninis nuskaitymas, gaunamas foninis IR spektras, tuomet užrašomi bandinių IR spektrai – lašas bandinio dedamas ant kristalo. Šiuose spektruose yra ieškomos analitės ir fono junginių absorbcijos juostos. Kompiuterinė programa iš bandinių spektrų automatiškai atima foninį spektrą. Gaunamas analitės spektras be pašalinių triukšmų [143].

Pateiktuose 25 ir 26 paveiksluose matyti, kad tiriamųjų terpių ir lizatų mėginių absorbcijos juostos sutampa su kontrolinių mėginių. Šis metodas nėra tinkamas identifikuoti vaistus, kadangi ląstelės yra veikiamos per mažomis vaisto koncentracijomis.



25 pav. HUVEC ląstelių, paveiktų sakubitrilo / valsartano tirpalu, ir kontrolės terpių IR spektrai

Skirtingai nei ląstelių terpių infraraudonųjų spindulių spektruose, lizatų spektruose (žr. 26 pav.) stebima papildoma absorbcija ties 2060,1 cm^{-1} , kuria yra identifikuojama trigubą ryšį turinti funkcinė grupė. Šiuo atveju, tai yra lizės buferio vienos iš sudedamųjų dalių – guanidino tiocianato – cianido ($\text{C}\equiv\text{N}$) grupė.



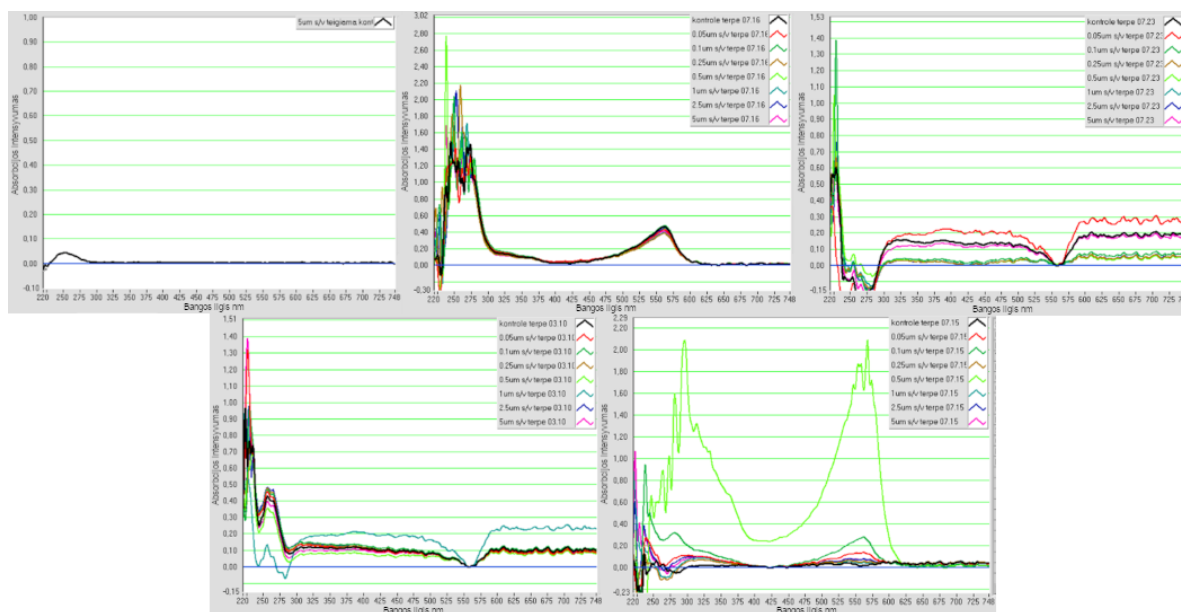
26 pav. HUVEC ląstelių, paveiktų sakubitrilo / valsartano tirpalu, ir kontrolės lizatų IR spektrai

2.3.16. Kiekybinė bandinių analizė UV-RŠ spektroskopijos metodu

Vaistu paveiktų HUVEC ląstelių terpės ir lizatai buvo analizuojami UV spektrofotometriniu metodu. Tyrimas atliktas naudojantis *Nanodrop 2000™* spektrofotometru (*ThermoFisherScientific*, JAV) sujungtu su kompiuterine programa *ND-1000* (v3.7.1). Tyrimui imama 2 μl tirpalo. Kaip ir IR spektroskopijos metodo metu, kompiuterinė programa iš analizės spektrų atima pašalinius triukšmus.

Iš literatūros žinoma, kad sakubitrilo ir valsartano didžiausia absorbcija stebima ties 254 nm [144]. Ištyrus didžiausios koncentracijos – 5 μM sakubitrilo / valsartano tirpalą (žr. 27 pav.) pastebima, kad absorbcija atitinka pateiktą literatūroje. Išmatavus HUVEC ląstelių terpių absorbciją (žr. 28 pav.), matyti, kad spektrai yra iškraipomi dėl terpės ir joje esančių junginių. Ląstelių lizatų

mėginių spektrų užrašyti nepavyko galimai dėl susidariusių kompleksų tarp sakubitrilo ir neprilizino šiuose mėginiuose, kadangi yra žinoma, jog neprilizinas išsidėstęs ant endotelio ląstelių plazminių membranų [145]. Atsižvelgiant į tai, šis metodas nėra tinkamas siekiant nustatyti vaisto koncentraciją ląstelių terpėse.



27 pav. UV-RŠ spektrai (viršutinisys dešinysis spektras – 5 μM sakubitrilo / valsartano tirpalas, likusieji – HUVEC ląstelių, paveiktų vaistu, terpių mėginių spektrai)

2.3.17. Vaisto ir metabolitų nustatymas ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodu (UPLC-TQD-MS)

Paveiktų vaistu ląstelių terpės ir lizatų analizė buvo atlikta panaudojus *Acquity H-class UPLC system* (Waters, JAV) chromatografą sujungtą su trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos (Xevo, Waters, JAV) analizatoriumi. Analizių išskirstymui panaudota chromatografinė kolonėlė *ACQUITY UPLC BEH C18* (1,7 μm, 2,1×100 mm). Analizės metu išlaikyta pastovi 40 °C temperatūra. Mobilią fazę sudarė šie eliuantai: 0,1 proc. skruzdžių rūgšties tirpalas (A) ir acetonitrilas (B); tėkmės greitis – 0,4 ml/min. Gradientinės eliuacijos sąlygos pateiktos 3 lentelėje.

3 lentelė. Ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodo gradientinės eliuacijos sąlygos

Laikas, min	Eliuentas A (0,1 proc. skruzdžių rūgšties tirpalas), proc.	Eliuentas B (acetonitrilas), proc.
0	95	5
0,5	95	5
3	65	35
5	40	60
7	10	90
8	5	95
8,1	95	5
10	95	5

Masių spektrometrijoje naudotas elektropurkštuvinis jonizacijos šaltinis, kurio temperatūra 150 °C. Atliktas teigiamos jonizacijos skenavimas. Kiti masių spektrometro parametrai: kapiliaro įtampa – 3500 V, kūgio įtampa – 50 V, tirpiklio išgarinimo temperatūra – 600 °C, dujų srautas – 800 l/val. Analizė atlikta daugialypių reakcijų stebėjimo (*MRM*) režimu.

2.3.18. Vaisto ir jo metabolitų nustatymas skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskiejimo laiko masių spektrometrijos metodu (LC-QTOF-MS)

HUVEC ląstelių terpė buvo analizuojama panaudojus skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskiejimo laiko masių spektrometrijos metodą. Chromatografinė analizė atlikta naudojant kolonėlę *ACQUITY UPLC BEH C18* (1,7 μm, 2,1×100 mm). Judriąją fazę sudarė 0,1 proc. skruzdžių rūgšties tirpalas (A) ir acetonitrilas (B), santykiu 75A:25B. Tėkmės greitis 0,4 ml/min. LC-QTOF-MS, veikiančio teigiamo jonizacijos režimu, parametrai buvo nustatyti taip: kapiliarinė ir purkštuvo įtampos 4000 V ir 500 V atitinkamai, džiovavimo dujų temperatūra – 200 °C, dujų tėkmės greitis – 10 l/min. Masių spektrometro nuskaitymo diapazonas 80–1200 m/z. Gautos junginių molekulinės formulės, m/z vertės ir fragmentacijos duomenys buvo lyginami su integruota junginių duomenų baze, kuria remiantis buvo identifikuoti junginiai.

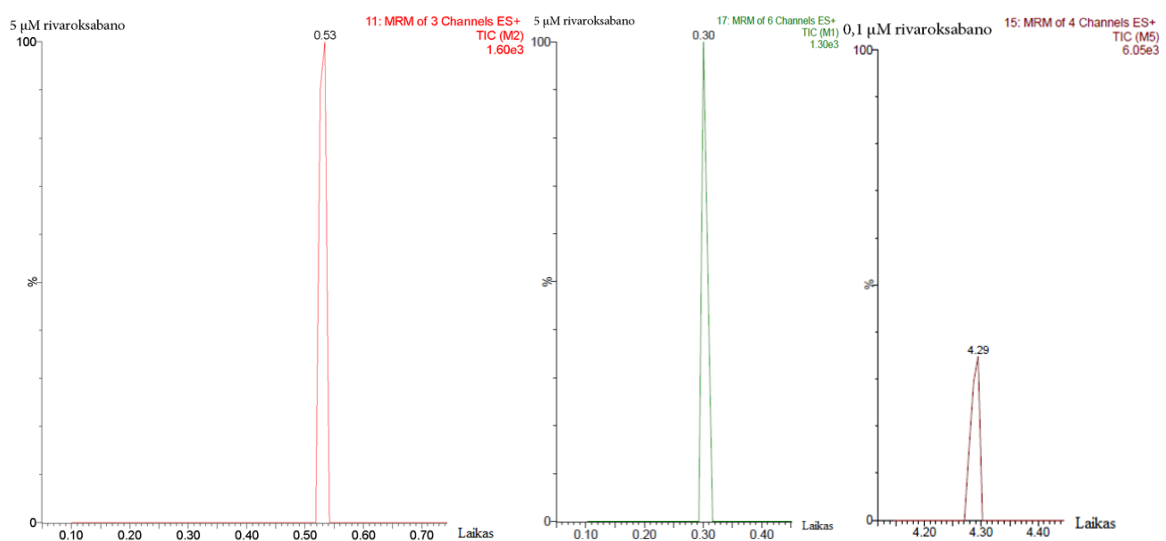
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Rivaroksabano metabolitų tyrimai HUVEC ląstelėse

3.1.1. Rivaroksabano metabolizmo charakterizavimas HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

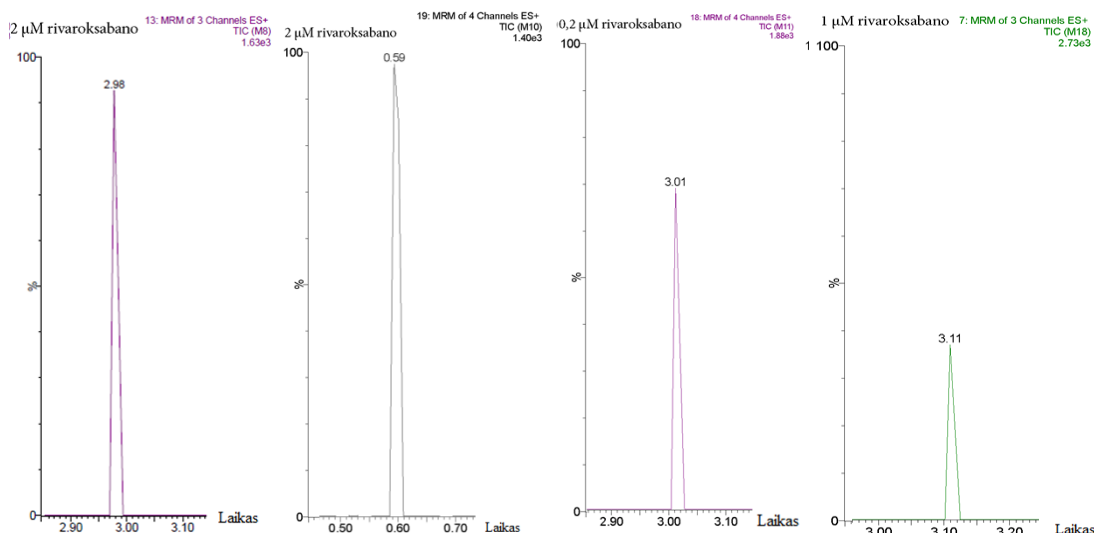
Bendradarbiaujant kartu su LSMU Farmacijos fakulteto studente buvo įvertintas rivaroksabano metabolizmas endotelio ląstelėse. Ištyrus dviejų pakartojimų (tiriamųjų $n = 14$, kontrolinių $n = 2$) mėginių ląstelių terpe, paveiktą skirtingomis rivaroksabano koncentracijomis (0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM) naudojant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodą ir remiantis literatūroje pateiktais duomenimis buvo identifikuotas rivaroksabanas, kurio vidutinis sulaikymo laikas buvo 2,34 min. Nustatyti ir septyni jo metabolitai: M-1, M-2, M-5, M-8, M-10, M-11, M-18.

Tyrimo metu M-2 metabolitas (žr. 28 pav.), kurio molekulinis jono fragmentas $[M+H]^+ = 452$ m/z ir sulaikymo laikas 0,53 min., buvo nustatytas tik 5 μM koncentracijos paveiktuose ląstelių terpių mėginiuose. Metabolitas M-1 (žr. 28 pav.), kurio molekulinis jono fragmentas $[M+H]^+ = 468$ m/z, buvo identifikuotas mėginiuose, paveiktuose 0,1 μM , 1 μM , 5 μM rivaroksabano koncentracijos tirpalais. Vidutinis šio junginio sulaikymo laikas – 0,33 min. Metabolitas M-5 (žr. 28 pav.), kurio molekulinis jono fragmentas $[M+H]^+ = 454$ m/z, buvo identifikuotas 0,1 μM , 0,2 μM , 1 μM , 5 μM rivaroksabano koncentracijos mėginiuose. M-5 nustatytas vidutinis sulaikymo laikas – 4,27 min.



28 pav. Rivaroksabano metabolitų M-2, M-1 ir M-5 chromatogramos

Metabolitas M-8 (žr. 29 pav.), kurio molekulinis jono fragmentas $[M+H]^+ = 452$ m/z, buvo identifikuotas 0,2 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM koncentracijos mėginiuose. Nustatytas vidutinis junginio sulaikymo laikas – 2,97 min. M-10 metabolito (žr. 29 pav.), kurio nustatytas vidutinis sulaikymo laikas – 0,56 min., molekulinis jono fragmentas $[M+H]^+ = 468$ m/z. Šis junginys identifikuotas mėginiuose, paveiktuose 0,1 μM , 0,2 μM , 0,5 μM , 2 μM , 10 μM koncentracijos tirpalais. M-11 metabolitas (žr. 29 pav.) nustatytas 0,1 μM , 0,2 μM , 5 μM koncentracijos mėginiuose. Jo molekulinis jono fragmentas $[M+H]^+ = 468$ m/z, vidutinis sulaikymo laikas – 3,03 min. Metabolitas M-18 (žr. 29 pav.) buvo identifikuotas visuose skirtingų rivaroksabano koncentracijų mėginiuose. Vidutinis sulaikymo laikas – 2,89 min., nustatytas molekulinis jono fragmentas $[M+H]^+ = 307$ m/z.

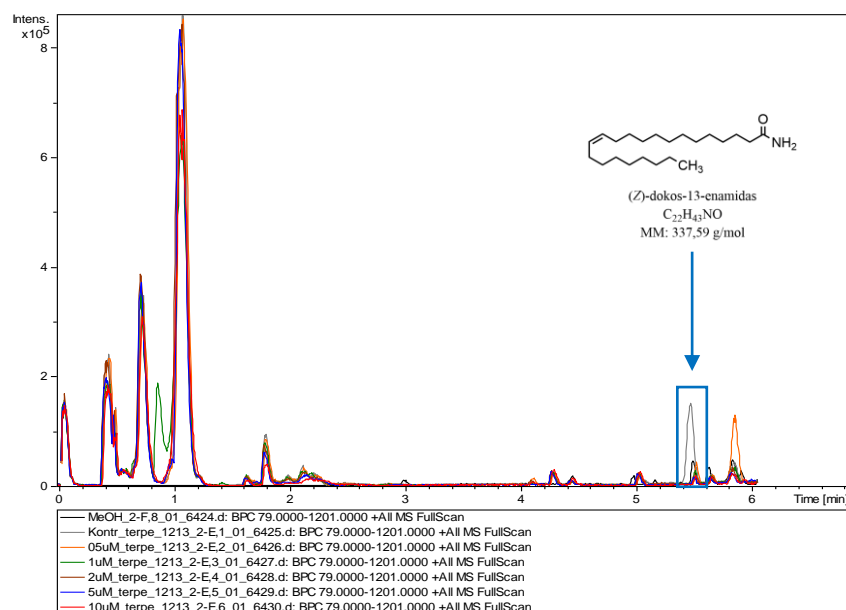


29 pav. Identifikuotų rivaroksabano metabolitų M-8, M-10, M-11, M-18 chromatogramos

Yra žinoma, kad rivaroksabano M-2 metabolito žiedas deciklizuojasi sudarydamas M-1 metabolitą, todėl yra sunkiai identifikuojamas. Iširta, kad M-15 metabolitas virsta M-16 metabolitu, kuris toliau skyla į alkoholį M-17 ir karboksirūgštį M-18. Endotelio ląstelėse buvo identifikuotas tik galutinis metabolitas M-18. Kiti metabolitai, kurie literatūroje buvo nustatomi tiriant kepenų ląsteles, HUVEC ląstelėse nebuvo nustatyti. Kepenyse vyksta pagrindinė vaistų deaktyvacija ir metabolizmas, todėl kepenyse yra nustatoma didesnė vaistus metabolizuojančių fermentų įvairovė. Šie tyrimai parodė, kad rivaroksabano metabolizmas vyksta endotelio ląstelėse.

3.1.2. (Z)-dokos-13-enamido koncentracijos pokyčiai HUVEC ląstelių terpių mėginiuose paveiktose skirtingomis rivaroksabano koncentracijomis

Siekiant įvertinti rivaroksabano poveikį ląstelių metabolizmui, buvo atlikta detali mėginių analizė naudojant skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskiejimo laiko masių spektrometrijos metodą. Identifikuotas naujas junginys, susijęs su rivaroksabano poveikiu – (Z)-dokos-13-enamidas (dar žinomas kaip 13-dokosenamidas arba erukamidas) (žr. 30 pav.), kurio sulaikymo laikas 5,4 min. Gauti duomenys parodė, kad didėjant rivaroksabano koncentracijai mažėja (Z)-dokos-13-enamido koncentracija (žr. 30 pav.).

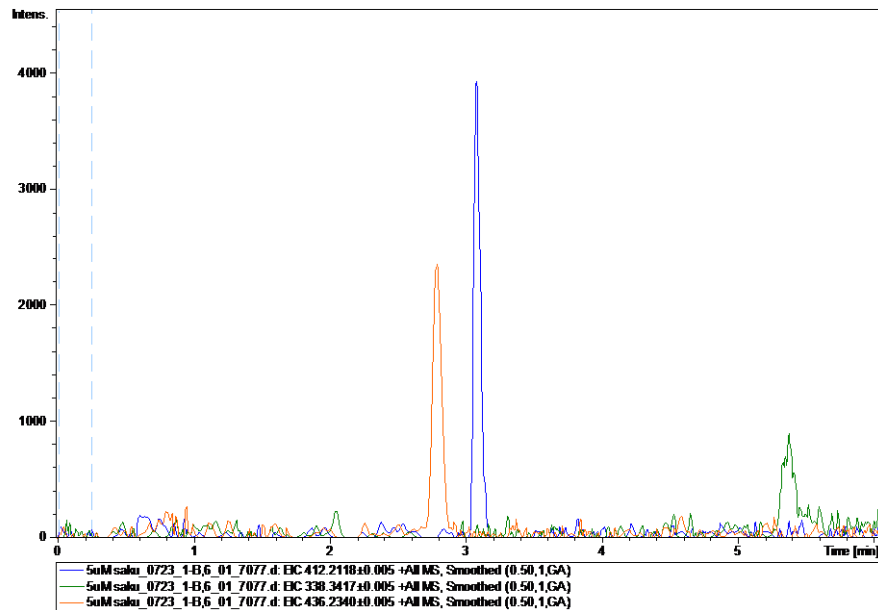


30 pav. HUVEC ląstelių terpių paveiktų rivaroksabanu ir kontrolinės terpės chromatograma, kurioje pastebimas 13-dokosenamidas sumažėjimas didinant rivaroksabano koncentraciją

3.2. Sakubitrilo metabolitų tyrimai HUVEC ląstelėse

3.2.1. Sakubitrilo / valsartano ir metabolitų tyrimas HUVEC ląstelėse LC-QTOF-MS metodu

Siekiant nustatyti vaistus ir susidariusius junginius sakubitrilu / valsartanu paveiktose endotelio ląstelėse buvo naudotas skysčių chromatografijos-kvadrupolio praskiejimo laiko masių spektrometrijos metodas, kuris pasižymi dideliu specifiškumu. Nustatyti trys ieškomi junginiai: pirmojo junginio sulaikymo laikas – 2,8 min., jo molekulinės jono fragmentas $[M+H]^+ = 436$ m/z, junginio molekulinė formulė yra $C_{24}H_{29}N_5O_3$. Antrojo junginio sulaikymo laikas – 3,1 min., jo protonizuotas jono fragmentas $[M+H]^+ = 412$ m/z, junginio molekulinė formulė $C_{24}H_{29}NO_5$. Trečiojo junginio sulaikymo laikas – 5,4 min., jo molekulinės jono fragmentas $[M+H]^+ = 338$ m/z, junginio molekulinė formulė yra $C_{22}H_{43}NO$. Įvertinus ir palyginus gautus duomenis su *PubChem* duomenų baze, buvo nustatyta, kad šie junginiai yra atitinkamai: valsartanas, sakubitrilas ir 13-dokosenamidas. 31 paveiksle yra pateikta chromatograma su išfiltruotomis nustatytų junginių masėmis. Vaistų metabolitų nustatyti nepavyko.



31 pav. Identifikuoti junginiai HUVEC ląstelių terpėse paveiktose didžiausia 5 μ M sakubitrilo / valsartano koncentracija. Oranžine spalva pažymėtas valsartanas, mėlyna – sakubitrilas, žalia – 13-dokosenamidas

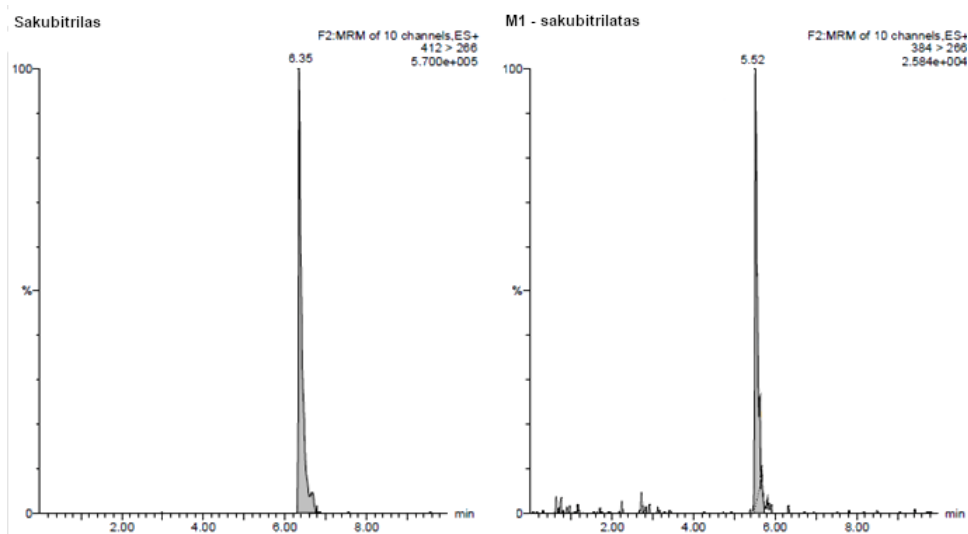
3.2.2. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinis nustatymas HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Tyrimo metu buvo siekiama nustatyti sakubitrilo metabolizmą *in vitro* sąlygomis HUVEC ląstelėse. Naudojant UPLC-TQD-MS metodą buvo atlikta sakubitrilo ir jo metabolitų kokybinė analizė ląstelių terpėse. Iš viso ištirti $n = 32$ mėginiai (keturi pakartojimai), iš kurių buvo $n = 4$ kontroliniai mėginiai ir keturi kiekvienos vaisto koncentracijos (0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M) paveikti mėginiai. Sakubitrilas nebuvo nustatytas kontroliniuose mėginiuose, tačiau buvo identifikuotas visuose ląstelių terpių mėginiuose (žr. 32 pav.) paveiktuose skirtingomis vaisto koncentracijomis. Vidutinis sakubitrilo sulaikymo laikas – 6,37 min. Monoizotopinė jono masė – 412 m/z, kokybinio nustatymo jono fragmento masė – 266 m/z. Standartu laikytas fiziologiniu tirpalu praskiestas ir paruoštas 5 μ M koncentracijos sakubitrilo / valsartano tirpalas. Standarto sulaikymo laikas – 6,34 min. Sakubitrilo sulaikymo rezultatai tiek HUVEC ląstelių terpių mėginiuose, tiek standarto, yra labai panašūs, todėl galima teigti, kad veiklioji medžiaga nustatyta tinkamai.

Remiantis literatūroje pateiktais metabolitų masės ir krūvio santykiais, buvo nustatytas M1 metabolitas (žr. 32 pav.). Tyrimo metu identifikuoto metabolito monoizotopinė jono masė atitinka moksliniuose šaltiniuose nurodytą m/z santykį, kadangi junginiai buvo nustatinėjami pagal literatūroje pateiktus duomenis. Sakubitrilato (M1) monoizotopinė jono masė – 384 m/z, kokybinio nustatymo jono fragmento masė – 266 m/z. Vidutinis aktyvaus metabolito sulaikymo laikas – 5,55 min. Kontroliniuose mėginiuose sakubitrilatas nebuvo nustatytas.

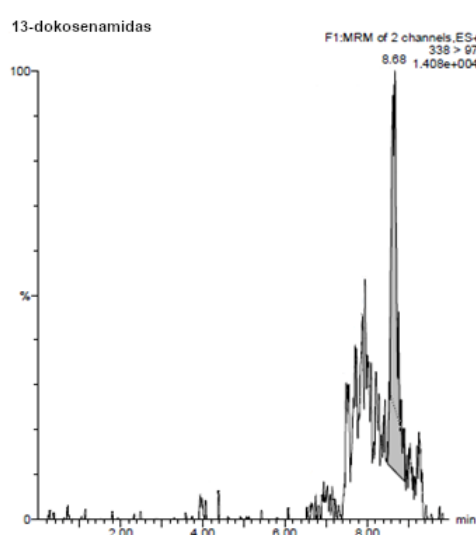
Anksčiau atliktų tyrimų su rivaroksabanu metu nustatyti 13-dokosenamido koncentracijos pokyčiai priklausomai nuo rivaroksabano koncentracijos. Nuspręsta įvertinti ir šio junginio aktyvumą mėginiuose, paveiktuose sakubitrilo / valsartanu taikant UPLC-TQD-MS metodą. Monoizotopinė 13-dokosenamido jono masė – 338 m/z, kokybinio nustatymo jono fragmento masė – 97 m/z. Vidutinis 13-dokosenamido sulaikymo laikas 8,61 min. Pastebima, kad galimas HUVEC ląstelių metabolitas buvo identifikuotas tiek kontroliniuose, tiek vaistu paveiktuose mėginiuose. Vidutiniai

sakubitrilo ir jo aktyvaus metabolito – sakubitrilato (M1) bei 13-dokosenamido sulaikymo laikai ląstelių terpių mėginiuose pateikti 2 priede.



32 pav. Identifikuoti junginiai (sakubitrilas, sakubitrilatas) HUVEC ląstelių terpėje

Gautos chromatogramos buvo apdorotos kompiuterine programa ir apskaičiuoti identifikuotų junginių sulaikymo plotai. Pastebima, kad didėjant vaisto koncentracijai, didėja sakubitrilo ir jo aktyvaus metabolito kiekis tirtose HUVEC ląstelių terpėse. Mažiausio sakubitrilo sulaikymo ploto vidutinė reikšmė – 1924 paveikus HUVEC ląsteles 0,5 μM sakubitrilo / valsartano koncentracija, didžiausio sulaikymo ploto vidutinė reikšmė buvo paveikus su 5 μM vaisto koncentracija – 3491. Įvertinus sakubitrilo sulaikymo ploto pokytį kartais (PK) tarp koncentracijų, koncentracijos didėjo paveikus 0,1 μM , 0,25 μM , 1 μM ir 5 μM koncentracijomis. Paveikus 0,5 μM ir 2,5 μM koncentracijomis, stebėtas sumažėjimas (atsižvelgiant į ankstesnę koncentraciją). Metabolito M1 mažiausia sulaikymo ploto vidutinė reikšmė – 813 (0,05 μM koncentracija), didžiausia – 3315 (5 μM koncentracija). Sakubitrilato sulaikymo ploto PK > 1, nustatytas su 0,5 μM ir 2,5 μM koncentracijomis, su likusiomis – PK < 1, palyginus reikšmes tarp koncentracijų. 13-dokosenamido (žr. 33 pav.) kiekis buvo didesnis vaistu paveiktuose mėginiuose palyginus su kontrole. Vidutinis šio junginio sulaikymo plotas kontrolėje – 1703, paveikus ląsteles 0,05 μM vaisto koncentracija – 1954. Didžiausios pokyčio kartais vertės stebimos esant 0,1 μM ir 5 μM sakubitrilo / valsartano koncentracijoms, PK reikšmės atitinkamai yra 2,47 ir 2,48 (žr. 4 lent.).



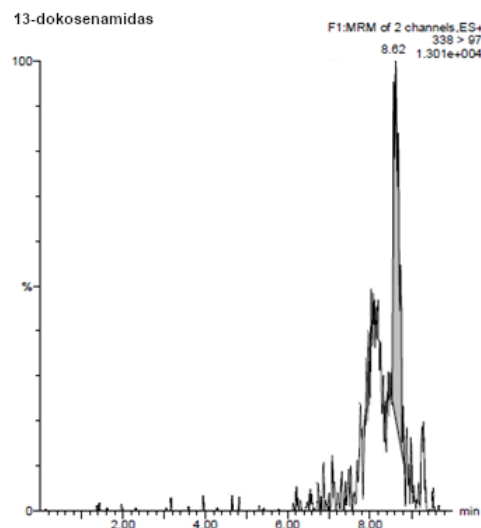
33 pav. Identifikuotas (Z)-dokos-13-enamidas HUVEC ląstelių terpėje

4 lentelė. Sakubitrilo, M1 metabolito ir 13-dokosenamido sulaikymo plotų vertės nustatytos HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo plotas		
	Sakubitrilas	M1 (sakubitrilatas)	13-dokosenamidas
Kontrolė	-	-	1703 (-)
0,05 μ M sakubitrilas / valsartanas	894 (-)	813 (-)	1954 (PK = 1,15)
0,1 μ M sakubitrilas / valsartanas	2833 (PK = 3,17)	922 (PK = 1,13)	4206 (PK = 2,47)
0,25 μ M sakubitrilas / valsartanas	2965 (PK = 1,05)	2609 (PK = 2,83)	2887 (PK = 1,70)
0,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	1924 (PK = 0,65)	2143 (PK = 0,82)	2710 (PK = 1,59)
1 μ M sakubitrilas / valsartanas	2757 (PK = 1,43)	2552 (PK = 1,19)	2987 (PK = 1,75)
2,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	2617 (PK = 0,95)	2186 (PK = 0,86)	3123 (PK = 1,83)
5 μ M sakubitrilas / valsartanas	3491 (PK = 1,33)	3315 (PK = 1,52)	3889 (PK = 2,28)

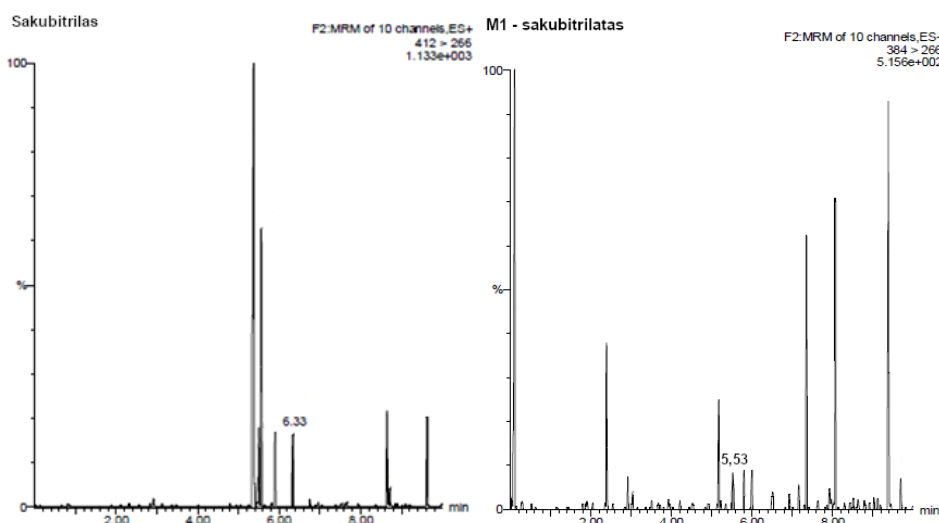
3.2.3. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinis nustatymas HUVEC ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu ir CYP4F2 fermento koncentracijos nustatymas ELISA metodu

Skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodu įvertintas sakubitrilo ir jo metabolitų susidarymas HUVEC ląstelių lizatuose, siekiant išsiaiškinti, kuri medžiaga (ląstelių terpės ar lizatai) yra tinkamesnė metabolizmo tyrimams atlikti. Iš viso ištirta ląstelių lizatų $n = 8$ ($n = 1$ kontrolinis, $n = 7$ vaistu paveikti mėginiai). Šiuose mėginiuose buvo identifikuotas sakubitrilas ir sakubitrilatas (M1), taip pat nustatytas naujas junginys 13-dokosenamidas (žr. 34 pav.). 13-dokosenamidas buvo identifikuotas ne tik vaistu paveiktuose mėginiuose, bet ir kontroliniuose mėginiuose (HUVEC ląstelių terpių mėginiuose 13-dokosenamidas taip pat buvo nustatytas). Vidutiniai sakubitrilo, M1 metabolito ir 13-dokosenamido sulaikymo laikai buvo atitinkamai 6,37 min., 5,55 min. ir 8,63 min. Šių junginių sulaikymo laikai pateikti 3 priede.



34 pav. Nustatytas 13-dokosenamidas HUVEC ląstelių lizatuose

Įvertinus sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido sulaikymo plotus (žr. 5 lent.) daroma išvada, kad vaisto ir jo metabolito koncentracijos yra nevertintinos, nes yra žemiau aparato detekcijos ribos (žr. 35 pav.). Galima teigti, jog provaisto ir sakubitrilato identifikavimui HUVEC ląstelių lizatai nėra tinkami. Atsižvelgiant į šiuos rezultatus, metabolizmo tyrimai buvo tęsiami tik su ląstelių terpių mėginiais.



35 pav. Sakubitrilo ir M1 metabolito chromatogramos žemiau aparato detekcijos ribos HUVEC ląstelių lizatuose

Tačiau, kai norima įvertinti fermento, kuris yra ląstelių viduje, aktyvumą, būtina tirti ląstelių lizatus. Paveikus sakubitrilu / valsartanu HUVEC ląsteles, citochromo P450 šeimos CYP4F2 fermento koncentracija yra artima kontrolei vaisto koncentracijų ribose nuo 0,05 μM iki 1 μM . Paveikus 5 μM sakubitrilo / valsartano koncentracija, fermento nustatyta 2,6 karto daugiau nei kontroliniame mėginyje (žr. 5 lent.).

Įvertinus 13-dokosenamido sulaikymo plotą kontroliniame mėginyje, jis buvo lygus 1592. Paveikus 0,05 μM vaisto koncentracija, sulaikymo plotas nekito. 13-dokosenamido nepavyko tinkamai įvertinti paveikus 0,1 μM , 0,5 μM ir 5 μM vaisto koncentracijomis. Paveikus 1 μM ,

13-dokosenamido kiekis didėjo apie 1,5 karto (sulaikymo plotas – 2462). Manoma, kad didinant vaisto koncentraciją vyksta ląstelių adaptacija arba ląstelėse įsijungia skirtingi veikimo mechanizmai lemiantys 13-dokosenamido susidarymą.

5 lentelė. CYP4F2 fermento koncentracijos pokyčiai ir identifikuotų junginių sulaikymo plotai nustatyti HUVEC ląstelių lizatų mėginiuose

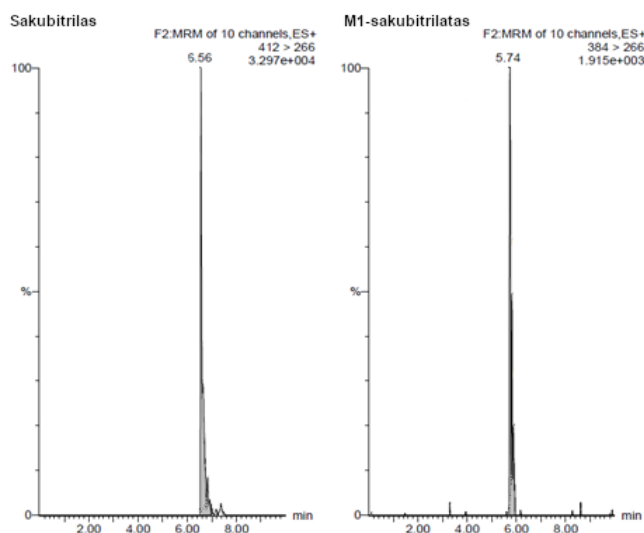
Vaisto koncentracija	CYP4F2 koncentracija, ng/ml	Sulaikymo plotas		
		Sakubitrilas	M1 (sakubitrilatas)	13-dokosenamidas
Kontrolė	5,30	-	-	1592 (-)
0,05 μM sakubitrilas / valsartanas	5,35	-	28	1551 (PK = 0,97)
0,1 μM sakubitrilas / valsartanas	5,15	7	35	-
0,5 μM sakubitrilas / valsartanas	4,75	12	149	-
1 μM sakubitrilas / valsartanas	5,40	8	13	2462 (PK = 1,55)
5 μM sakubitrilas / valsartanas	13,80	29	-	-

3.3. Sakubitrilo metabolitų tyrimai HepG2 ląstelėse

3.3.1. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinė analizė HepG2 ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Sakubitrilo metabolizmas tirtas HepG2 ląstelėse, kurios, remiantis moksliniais tyrimais, tinkamos vertinti vaistų metabolizmą kepenyse. Tyrimui su kepenų hepatoblastomos (HepG2) ląstelėmis buvo paruošti trijų pakartojimų terpių mėginiai (iš viso vaistu paveiktų mėginių $n = 21$, kontrolinių $n = 3$), tačiau dėl techninių priežasčių UPLC-TQD-MS metodu buvo ištirti tik vieno pakartojimo ląstelių terpių mėginiai (vaistu paveikti $n = 7$ ir kontrolinis $n = 1$). Šiuose mėginiuose buvo identifikuotas sakubitrilas ir jo aktyvusis metabolitas M1, kurių vidutiniai sulaikymo laikai buvo atitinkamai 6,55 min. ir 5,75 min. (žr. 4 priedą). 13-dokosenamidas nustatytas nebuvo.

Išanalizavus HepG2 ląstelių terpių mėginius, paveiktus skirtingomis sakubitrilo / valsartano koncentracijomis, pastebima, kad sakubitrilas (žr. 36 pav.) buvo nustatytas visuose vaistu paveiktuose mėginiuose, išskyrus mažiausios koncentracijos tirpalu paveiktų ląstelių terpių mėginyje. Jo aktyvusis metabolitas M1 (žr. 36 pav.) buvo identifikuotas 0,05 μM ir didesnėse negu 0,5 μM sakubitrilo / valsartano koncentracija paveiktuose mėginiuose, tačiau sakubitrilato sulaikymo plotas buvo dvigubai mažesnis negu provaisto. Pastebima, kad tiek vaisto, tiek metabolito M1 sulaikymo plotai didėjo didėjant sakubitrilo / valsartano koncentracijai. Įvertinus PK vertes, lyginant tarp koncentracijų, didžiausias pokytis matomas 0,05 μM koncentracijos tirpale su sakubitrilu ir 0,1 μM – su M1 metabolitu. Pokyčių kartais vertės yra atitinkamai 4,56 ir 3,40. Identifikuotų junginių PK reikšmės ir sulaikymo plotai nurodyti 6 lentelėje.



36 pav. Nustatyti junginiai (sakubitrilas, sakubitrilatas) HepG2 ląstelių terpėje

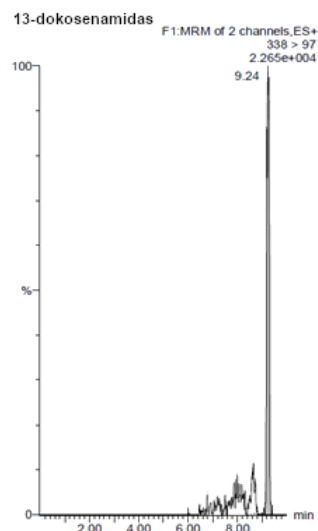
6 lentelė. Identifikuotų junginių sulaikymo plotai nustatyti HepG2 ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo plotas		
	Sakubitrilas	M1 (sakubitrilatas)	13-dokosenamidas
Kontrolė	-	-	-
0,05 μ M sakubitrilas / valsartanas	-	-	-
0,1 μ M sakubitrilas / valsartanas	601 (-)	-	-
0,25 μ M sakubitrilas / valsartanas	549 (PK = 0,91)	-	-
0,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	2501 (PK = 4,56)	439 (-)	-
1 μ M sakubitrilas / valsartanas	2519 (PK = 1,01)	1492 (PK = 3,40)	-
2,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	2792 (PK = 1,11)	1510 (PK = 1,01)	-
5 μ M sakubitrilas / valsartanas	2812 (PK = 1,01)	1451 (PK = 0,96)	-

3.3.2. Sakubitrilo, jo metabolito ir 13-dokosenamido kiekybinė analizė HepG2 ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu ir CYP4F2 baltymo koncentracijos įvertinimas ELISA metodu

Kiekybinė HepG2 ląstelių analizė UPLC-TQD-MS metodu dėl COVID-19 pandemijos ir techninių kliūčių buvo atlikta su vieno pakartojimo ląstelių lizatų mėginiais (paveikti vaistu $n = 7$ ir kontrolinis $n = 1$), nors buvo paruošti trijų pakartojimų lizatų mėginiai (iš viso vaistu paveiktų mėginių $n = 21$, kontrolinių $n = 3$).

HepG2 ląstelių lizatuose sakubitrilas ir sakubitrilatas nebuvo identifikuoti, tačiau buvo nustatytas 13-dokosenamidas (žr. 37 pav.), kurio vidutinis sulaikymo laikas buvo 9,21 min (žr. 5 priedą). Pastebima, kad 13-dokosenamido koncentracija mažėjo didėjant sakubitrilo / valsartano koncentracijai mėginiuose. Šio junginio koncentracija stebima didžiausia 1 μ M sakubitrilo / valsartano ląstelių lizatų mėginyje (žr. 7 lent.). Įvertinus PK lyginant su kontroliniu mėginiu, pastebima, kad vertės yra mažesnės negu 1, tik esant 1 μ M sakubitrilo / valsartano koncentracijai $PK = 1,23$, kadangi 13-dokosenamido sulaikymo plotas yra 7121.



37 pav. 13-dokosenamido, identifikuoto HepG2 ląstelių lizatuose, chromatograma

Paveikus HepG2 ląsteles skirtingomis sakubitrilo / valsartano koncentracijomis ir jas lizavus buvo įvertintas citochromo P450 šeimos CYP4F2 fermento koncentracijos pokytis. Didėjant vaisto koncentracijai, mažėjo baltymo kiekis ląstelių lizatuose (žr. 7 lent.).

7 lentelė. CYP4F2 fermento koncentracijos pokyčiai ir identifikuotų junginių sulaikymo plotai nustatyti HepG2 ląstelių lizatų mėginiuose

Vaisto koncentracija	CYP4F2 fermento koncentracija, ng/ml	Sulaikymo plotas		
		Sakubitrilas	M1 (sakubitrilatas)	13-dokosenamidas
Kontrolė	61,80	-	-	5808 (-)
0,05 μM sakubitrilas / valsartanas	37,50	-	-	3539 (PK = 0,61)
0,5 μM sakubitrilas / valsartanas	37,80	-	-	1577 (PK = 0,27)
1 μM sakubitrilas / valsartanas	36,60	-	-	7121 (PK = 1,23)
2,5 μM sakubitrilas / valsartanas	34,20	-	-	4892 (PK = 0,84)
5 μM sakubitrilas / valsartanas	34	-	-	2644 (PK = 0,46)

3.4. Sakubitrilo metabolitų tyrimai transfekuotose HUVEC ląstelėse

3.4.1. Sakubitrilo ir jo metabolitų nustatymas hsa-miR-24-3p paveiktose HUVEC ląstelėse taikant UPLC-TQD-MS metodą

Šio tyrimo metu buvo siekiama išsiaiškinti hsa-miR-24-3p įtaką sakubitrilo metabolizmo ypatumams endotelio ląstelėse *in vitro* sąlygomis. Kokybinė analizė atlikta naudojant ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodą. Iš viso ištirta mėginių $n = 18$: $n = 9$ kontroliniai terpės mėginiai, $n = 9$ terpės mėginiai paveikti miRNR imitatoriumi. Visi mėginiai buvo paveikti trejomis vaisto koncentracijomis: mažiausia – 0,05 μM, vidutine – 0,5 μM ir didžiausia – 5 μM. Šios koncentracijos pasirinktos siekiant įvertinti veikliosios medžiagos pokytį priklausomai nuo vaisto kiekio. Ląstelės, prieš jas paveikiant vaistu, buvo transfekuojamos trumpa nekoduojančia miRNR. Visuose analizuotuose mėginiuose buvo identifikuotas sakubitrilas ir jo aktyvusis metabolitas – sakubitrilatas. Vidutinis sakubitrilo

sulaikymo laikas kontroliniuose mėginiuose – 6,14 min., transfekuotuose – 6,15 min. Vidutinis M1 metabolito sulaikymo laikas kontroliniuose mėginiuose – 5,27 min., transfekuotuose – 5,29 min. Vidutiniai junginių sulaikymo laikai pateikti 6 priede.

Transfekuotų ir kontrolinių ląstelių terpių chromatogramose buvo apskaičiuotos sakubitrilo ir identifikuoto M1 metabolito sulaikymo plotų vidutinės reikšmės (žr. 8 lent.). Didėjant vaisto koncentracijai, didėjo sakubitrilo ir sakubitrilato kiekiai terpėje, tačiau provaisto biotransformacija į terapinį poveikį turintį junginį, HUVEC ląstelėse, mažėjo. Mėginiuose, paveiktuose hsa-miR-24-3p imitatoriumi, sakubitrilo kiekis buvo didesnis, palyginus su kontroliniais mėginiais, tuo tarpu aktyvaus metabolito kiekis mėginiuose paveiktuose hsa-miR-24-3p imitatoriumi buvo mažesnis nei kontroliniuose mėginiuose.

8 lentelė. Sakubitrilo ir jo aktyvaus metabolito sulaikymo plotų vertės nustatytos miRNR imitatoriumi paveiktų HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo plotas					
	Sakubitrilas			M1 (sakubitrilatas)		
	Kontrolė	Hsa-miR-24-3p paveiktas mėginys	PK	Kontrolė	Hsa-miR-24-3p paveiktas mėginys	PK
0,05 μM sakubitrilas / valsartanas	734	1311	1,79	19	20	1,05
0,5 μM sakubitrilas / valsartanas	1161	1473	1,27	51	36	0,71
5 μM sakubitrilas / valsartanas	7347	6872	0,94	379	327	0,86

3.5. Rezultatų aptarimas

Šio baigiamojo projekto metu buvo tiriamas rivaroksabano ir sakubitrilo metabolizmas *in vitro*, siekiant išsiaiškinti metabolitus, kurie potencialiai galėtų būti šių priešuždegiminiu poveikiu pasižyminčių vaistų mechanizmo dalimi. Taip pat buvo tiriama ir šių vaistų įtaka CYP4F2 baltymo aktyvumui.

3.5.1. Metodo pasirinkimas

Kiekvieno eksperimento pradžia – tinkamo tyrimo objekto, medžiagos, metodo ir įrangos pasirinkimas reikiamai hipotezei pagrįsti. Taigi, prieš pradėdant tyrimus, atlikta išsami metodų analizė, atlikti bandomieji tyrimai, kurie parodė, kad nevisi metodai yra tinkami konkrečiam tikslui pasiekti. Dažnai metabolitų identifikavimui yra naudojami du technologiniai analizės metodai – branduolių magnetinio rezonanso (BMR) spektroskopija [146] ir masės spektrometrija (MS) [147]. Nors BMR leidžia nustatyti unikalią junginio struktūrą, tačiau ji pasižymi mažesniu jautrumu ir mažesne chemine skiriamąja geba. Be to, atlikti BMR reikia didesnio mėginio kiekio. MS metodas pateikia mažiau informacijos apie metabolito struktūrą, tačiau leidžia nustatyti daugiau junginių vieno eksperimento metu, nes pastarasis metodas pasižymi didesniu jautrumu ir platesniu dinaminio diapazonu. Metabolitų tyrimams dažniau yra naudojamas masių spektrometrijos metodas, kurį galima kombinuoti su chromatografijos metodais, tokiais kaip kapiliarinė elektroforezė, dujų (GC) ar skysčių chromatografija (LC), iš kurių pastarosios dvi yra populiariausios. LC-MS metodas

pasižymi tuo, jog šiuo metodu galima tirti termiškai labilius metabolitus, ypač kai derinamas su elektropurkštuvine jonizacija [148], skirta jonizuoti molekules, paliekant molekulinį joną nepakeistą. Yra du pagrindiniai LC-MS metabolitų nustatymo metodai: tikslinis ir netikslinis. Netikslinio metodo pagrindas pastebėti kuo daugiau nežinomų ir žinomų metabolitų smailių, lyginant jonų intensyvumą tarp tų pačių smailių, esančių skirtinguose mėginiuose [149]. Šios technikos trūkumas, kad ji nėra optimizuota konkrečiam metabolitui ir yra mažiau kiekybinė, tačiau privalumas tas, kad stebint daugybę žinomų ar nežinomų metabolitų, tai suteikia naujas įžvalgas apie biologines sistemas. Kombinuojant kartu su didelės skiriamosios gebos masės spektrometru [150], pavyzdžiui, laiko praskiejimo arba *Orbitrap*, galima gauti didesnę masės tikslumą ir jonų fragmentacijos informaciją, kurie leidžia identifikuoti metabolitus [151]. Tačiau, LC-QTOF-MS metodas turi ir trūkumų: mažo kiekio jonai gali būti sunkiai identifikuojami, jei pirminio jono intensyvumas yra mažas; MS pagrįsta analizė pateikia nedaug informacijos apie junginių stereochemiją [152].

Kiekybiniam metabolitų įvertinimui yra dažniau naudojama ultraefektyvioji skysčių chromatografija kartu su masių spektrometrija, kuri leidžia efektyviai analizuoti našumą, mažina tirpiklių naudojimą, gerina didžiausią skiriamąją gebą ir metabolitų atskyrimą [153]. Kartu naudojant trigubo kvadrupolio spektrometrus padidinamas analizės selektyvumas, kadangi yra naudojamas nuoseklus pradinių jonų filtravimas, fragmentavimas ir fragmentų filtravimas [154]. Siekiant nustatyti specifinius junginius sudėtinguose biologiniuose mišiniuose, sukurtas daugialypių reakcijų stebėjimas kartu su naujos kartos trigubais kvadrupolių masės spektrometrais [155]. Atliekant tokius tyrimus, dominantys junginiai parenkami pagal jų pirminių jonų masę pirmajame kvadrupolyje ir fragmentuojami antrame kvadrupolyje, kad susidarytų produkto jonai. Tada trečiajame kvadrupolyje stebimos iš anksto pasirinktos pradinių ir produkto jonų poros. Po šio dviejų pakopų filtravimo biologinis fonas dažniausiai pašalinamas, todėl nustatomi iš anksto parinkti junginiai, turintys didelį specifiškumą ir jautrumą. Šiuolaikinis trigubas kvadrupolio masės spektrometras per vieną eksperimentą gali nuskaityti šimtus porų, kad vienu metu būtų galima aptikti kelis junginius.

Kiek rečiau metabolitų nustatymui yra naudojami optiniai spektroskopiniai metodai, matuojant infraraudonųjų spindulių ir ultravioletinių spinduliuotės-regimosios šviesos bangos ilgius. Šie metodai pasižymi paprastumu, greitumu, nereikalauja didelių finansinių išteklių. Tyrimui atlikti yra reikalingas nedidelis mėginio kiekis [156]. IR ir UV-RŠ spektrofotometrijos rezultatai nėra tokie išsamūs kaip GC/LC-MS ar BMR, tačiau pateikia papildomos informacijos [157]. FTIR metodas naudojamas kokybinei analizei, kadangi IR spektrai pateikia informaciją apie nežinomų junginių funkcines grupes pagal jų absorbciją, tačiau ši spektroskopija pasižymi mažu jautrumu ir selektyvumu [158]. UV-RŠ metodas naudojamas kiekybinei žinomo junginio analizei, kadangi pagal gautą absorbcijos intensyvumą galima apskaičiuoti koncentraciją [159]. Dėl šių savybių IR ir UV-RŠ spektroskopijos metodai dažnai yra naudojami vaistų identifikacijai [160] ir koncentracijos nustatymui [161], ir yra kombinuojami su chromatografijos ar masių spektrometrijos metodais.

Atsižvelgiant į aukščiau aptartas metodų ir prietaisų savybes, pasirinktam tyrimui buvo nuspręsta sakubitrilo / valsartano vaistu paveiktą HUVEC ląstelių mėginius ištirti paprastais ir greitais UV-RŠ bei ATR-FTIR spektrofotometrijos metodais. Išmatavus ląstelių terpių ir lizatų mėginių infraraudonosios spinduliuotės absorbciją buvo pastebėta, kad spektrai sutampa su kontrolinių mėginių spektrais. Kokybinės analizės atlikti nepavyko dėl per mažos vaisto koncentracijos mėginiuose. Atlikus kiekybinę analizę taikant ultravioletinių spindulių – regimosios šviesos

metodą, buvo gauti iškraipyti spektrai dėl terpės ir joje esančių junginių, todėl nustatyti vaisto koncentracijos nepavyko.

Vaistų ir jų metabolitų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui buvo pasirinkti kiti metodai – skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos. Kokybinei analizei taikyta skysčių chromatografijos-kvadrupolio laiko praskiejimo masių spektrometrija, kiekybinei – ultraefektyviosios skysčių chromatografijos-trigubo kvadrupolio masių spektrometrijos metodas. Naudojant LC-QTOF-MS metodą mėginiuose pagal gautas m/z vertes ir molekulinės formules, kurios buvo palygintos su duomenų bazėmis, buvo identifiukuoti sakubitrilas, valsartanas ir (Z)-dokos-13-enamidas, kadangi jų koncentracija tirpaluose buvo didžiausia. Mažesnės koncentracijos junginių – metabolitų identifiukuoti nepavyko, kadangi ši technika pasižymi dideliu specifiskumu, bet mažu jautrumu. Didesniu jautrumu pasižymi UPLC-TQD-MS metodas, dėl to junginių sulaikymo plotai buvo apskaičiuoti naudojant šią aparatūrą. Vis dėlto, siekiant nustatyti tikslią junginių koncentraciją yra būtinas standartas, kuris tyrimo metu nebuvo naudotas. Šio darbo atveju, sulaikymo plotai nusako junginio kiekį mėginyje.

3.5.2. Rivaroksabano tyrimai

Šiame darbe eksperimentai pradėti nuo rivaroksabano metabolizmo tyrimų endotelio ląstelėse. Remiantis kitų tyrėjų rezultatais, nustatyta, kad rivaroksabanas padidino HUVEC augimą ir gyvybingumą dėl urokinazės plazminogeno aktyvatoriaus aktyvinimo ir reguliavimo. Pastarasis dalyvauja moduliuojant rivaroksabano fibrinolizinį poveikį, dalyvaujant endotelio ląstelėms. Be to, mokslinių tyrimų duomenimis, rivaroksabanas slopina uždegimą skatinančio FXa poveikį HUVEC ląstelėms [162]. Kito tyrimo atlikto su endotelio ląstelėmis metu buvo nustatyta, kad rivaroksabanas didina endotelio ląstelių gyvybingumą ir slopina didelio gliukozės kiekio sukeltą ląstelių apoptozę slopindamas ROS gamybą. Šie rezultatai parodė, kad rivaroksabanas galėtų būti efektyvus aterosklerozės prevencijai [163]. Rivaroksabanas slopino uždegiminių genų raišką priklausomai nuo vaisto koncentracijos, o maksimalus slopinimas buvo stebimas paveikus 3000 nM koncentracija [164]. Šiame baigiamojo darbo projekte pagal literatūroje [76] pateiktus metabolitų m/z santykius buvo identifiukuoti septyni rivaroksabano metabolitai: M-1, M-2, M-5, M-8, M-10, M-11, M-18 HUVEC ląstelių terpių mėginiuose, paveiktuose skirtingomis vaisto koncentracijomis. Rivaroksabano morfolinono žiedo hidroksilinimas lėmė M-2 ir M-8 metabolitų susidarymą, kurie skiriasi hidroksi-grupės prisijungimo vieta. Tolimesnė pagrindinio M-2 metabolito morfolinono fragmento oksidacija lėmė dažniausiai surandamo metabolito M-1 susidarymą. M-5 metabolitas susidarė dėl M-2 žiedo deciklizacijos ir redukcijos reakcijų. Dėl šios priežasties M-2 junginys buvo nustatytas tik 5 μM koncentracijos mėginyje. Rivaroksabano oksazolidono ir morfolinono žiedų hidroksilinimas lėmė M-10 ir M-11 metabolitų susidarymą, kurie buvo nustatyti pagal skirtingą struktūros fragmentaciją. M-15 veikiamas monoamino oksidazės virsta į tarpinį M-16 aldehydą, kurio tolimesnė oksidacija lėmė HUVEC ląstelėse identifiukuotas karboksirūgšties M-18 susidarymą. Dėl šios priežasties, būtų galima teigti, kad HUVEC ląstelėse susidarė ir M-15 ir M-16 metabolitai, kurie buvo pilnai metabolizuoti į M-18 ir nebuvo identifiukuoti. Kiti metabolitai pateikti literatūroje, buvo nustatyti tiriant rivaroksabano metabolizmą kepenų ląstelėse, o tiriant HUVEC ląsteles, jų identifiukuoti nepavyko. Yra žinoma, jog kepenyse vyksta gyvybiškai svarbus maistinių medžiagų [165] ir vaistų metabolizmas [166], todėl kepenyse yra ir didesnė metabolinių fermentų įvairovė, palyginus su endotelium.

3.5.3. Tyrimai su sakubitrilu / valsartanu

Buvo tiriamas ir sakubitrilo metabolizmas endotelio ląstelėse. Kitų tyrėjų mokslinių rezultatų duomenimis, pacientams, sergantiems ŠN ir gydytiems sakubitrilu / valsartanu tris mėnesius, buvo stebimas VEGF kiekio padidėjimas kraujo plazmoje. Šis augimo faktorius yra sekretuojamas endotelio ląstelių ir yra atsakingas už angiogenezės ir limfangiogenezės reguliavimą. Be to, buvo nustatyta, kad sumažėjo, neigiamą įtaką angiogenezės reguliavimui turinčio, VEGFR-1 kiekis [167]. Remiantis pirminiais rezultatais, sakubitrilas / valsartanas pasižymi priešuždegiminėmis ir kraujagyslių atsistatymą skatinančiomis savybėmis, o tuo pačiu ir gerina endotelio funkciją [70]. Kito tyrimo metu buvo nustatyta, kad šis vaistas sumažino angiotenzino II, endotelino-1 kiekius ir kairiojo skilvelio remodeliaciją, todėl galėtų pagerinti širdies funkciją ŠN sergantiems pacientams veikdamas endotelio funkciją [7]. Kito tyrimo metu nustatyta, kad sakubitrilas / valsartanas sumažino C-reaktyvaus baltymo, siejamo su uždegimu, padidėjimą ŠN sergantiems pacientams [168]. Mūsų atlikto tyrimo metu HUVEC ląstelės buvo paveiktos sakubitrilo / valsartano deriniu. Taikant UPLC-TQD-MS metodą, buvo identifikuotas M1 metabolitas, kuris, remiantis moksliniais šaltiniais, susidarė CES1 fermentui hidrolizavus sakubitrilo esterinę grupę į karboksilinę. Veikiant skirtingomis sakubitrilo / valsartano koncentracijomis, tiek vaisto, tiek ir jo metabolito sulaikymo plotai didėjo, didėjant vaisto koncentracijai terpių ir lizatų mėginiuose. Šio tyrimo metu nustatyta, kad sakubitrilas nėra pilnai metabolizuojamas į sakubitrilatą, kai HUVEC ląstelės paveikiamos didesne negu 0,1 μ M sakubitrilo / valsartano koncentracija. Tai nauji rezultatai, kurių mums prieinamose duomenų bazėse surasti nepavyko. Kiti galimi oksigenacijos (M6-M8), gliukuronidacijos (M2-M4) ir abiejų šių biokonversijų (M9) metabolitai nebuvo identifikuoti. Remiantis moksliniais šaltiniais, pastarųjų metabolitų koncentracijos tiriant *in vivo* sveikus savanorius, kraujo plazmoje, šlapime ir išmatose nesiekia 1 proc. [54]. Reikia pažymėti, kad mūsų darbe šie metabolitai galėjo būti nenustatyti dėl sąlyginai ribotų įrangos galimybių. Pirminiame moksliniame šaltinyje aprašyti metabolitai tirti vienu geriausių šiuo metu rinkoje esančių prietaisų – *LTQ-Orbitrap* hibridiniu masės spektrometru, kuris pasižymi didesne skiriamąja geba, tikslesniu masės nustatymu ir didesniu dinaminiu diapazonu [169]. Mūsų tyrime taikant LC-QTOF-MS metodą M1 metabolitas galėjo būti neidentifikuotas dėl nepakankamai efektyviai parinktų tyrimo sąlygų.

Sakubitrilo metabolizmo tyrimams pasirinktos ir kepenų vėžio HepG2 ląstelės, kurios naudojamos tiriant vaistų metabolizmą kepenyse. Nustatyta, kad sakubitrilo ir sakubitrilato kiekiai didėjo ląstelių terpių mėginiuose didėjant vaisto koncentracijai. HepG2 ląstelių lizatuose vaistas ir jo metabolitas M1 nebuvo identifikuoti. HepG2 ląstelės greičiausiai pasižymėjo maža CES ir P450 fermentų raiška [170, 171]. Tai galima aiškinti tuo, jog, uždegimo (ar vėžio) metu kepenų ląstelių fermentų aktyvumas yra mažinamas. Nepaisant to, jog HepG2 ląstelėse CES1 izoformos fermentų yra dvigubai daugiau nei CES2 [172], tačiau šių fermentų raiška nuslopinta esant kepenų vėžio [173] ir padidėjusio uždegimą skatinančio citokino – interleukino 6 (IL-6) kiekio [174].

3.5.4. Naujo su vaistų poveikiu susijusio junginio nustatymas

HUVEC ląstelėse, paveiktose rivaroksabanu ir sakubitrilu / valsartanu bei HepG2 ląstelėse paveiktose sakubitrilu / valsartanu buvo identifikuotas junginys, susijęs su priešuždegiminiu poveikiu – (Z)-dokus-13-enamidas. Pirmą kartą šis junginys buvo aptiktas kaip galvijų pasaito angiogeninis lipidus [175], taip pat buvo nustatytas žiurkių ir žmonių smegenų skystyje. Tyrimo su žiurkėmis metu buvo nustatyta, kad 13-dokosenamidas sukelia sumažėjusį judrumą ir slopina nervų

sistemos funkciją [176]. Ištirta, kad *E. coli* bakterijos reaguodamos į gliukozę pradeda gaminti erukamidą [177]. 13-dokosenamidas išskirtas iš imbiero pasižymi priešuždegiminiu ir skausmą malšinančiu poveikiu [178]. Taip pat erukamidas pasižymi antibakterinėmis, priešgrybelinėmis savybėmis [179–181]. Ridikėlių lapai, kuriuose yra gausu 13-dokosenamido, gali turėti teigiamą poveikį atminčiai, Alzheimerio ligai, reguliuojant cholinergines funkcijas [182], taip pat buvo nustatyta, kad erukamidas veikia streso sukeltą žiurkių kepenų pažeidimą, slopindamas glicino metabolizmą [183]. Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad veikiant HUVEC ląsteles didesnėmis rivaroksabano koncentracijomis, mažėjo šio junginio koncentracija. HUVEC ląstelių terpių ir lizatų mėginiuose, paveiktuose sakubitrilo / valsartanu, 13-dokosenamido kiekis didėjo didėjant vaisto koncentracijai. HepG2 ląstelių terpių mėginiuose 13-dokosenamido kiekis mažėjo didėjant sakubitrilo / valsartano koncentracijai, o ląstelių lizatuose šis junginys nebuvo identifikuotas.

3.5.5. Tirtų vaistų ir fermento raiškos inhibitorių poveikis CYP4F2 fermentui

Šiame darbe buvo vertintas sakubitrilo / valsartano poveikis CYP4F2 fermento kiekiui endotelio ir kepenų ląstelėse. Buvo tiriamas hsa-miR-24-3p poveikis sakubitrilo metabolizmui. CYP4F2 fermentas, kuris dar vadinamas ω -hidroksilaze, yra atsakingas už arachidono rūgšties oksidavimą į vazoaktyvų eikozanoidą 20-hidroksieikozatetraenoinę rūgštį. Fiziologinis 20-HETE poveikis susijęs su kraujagyslių reaktyvumu, aktyvacija, pertvarkymu, kraujagyslių uždegimu ir angiogeneze [89, 93, 184]. Šio tyrimo metu buvo nustatyta, kad CYP4F2 fermento koncentracija didėjo 2,6 karto endotelio ląstelėse, paveikus jas 5 μ M sakubitrilo / valsartano koncentracija. HepG2 ląstelėse CYP4F2 baltymo koncentracija mažėjo didėjant vaisto koncentracijai. Dėl ląstelėje vykstančių uždegiminių procesų (IL-6), vyksta citochromo P450 šeimos fermentų slopinimas [185]. Taip pat šiame darbe buvo nustatyta, kad hsa-miR-24-3p imitatorius slopino sakubitrilo biokonversiją į sakubitrilatą. Kitų tyrėjų duomenimis, padidėjęs hsa-miR-24-3p kiekis slopina CYP4F2 fermento koncentraciją [140]. Be to, ši mikro-RNR yra susijusi su kraujagyslių ląstelių proliferacija, migracija ir apoptoze [125, 186]. Hsa-miR-24 ekspresiją endotelio ląstelėse gali sukelti miokardo išemija, o padidėjusi hsa-miR-24 ekspresija gali sukelti endotelio ląstelių apoptozę [187].

Apibendrinant, baigiamojo projekto metu buvo nustatyta, kad tirtų vaistų (rivaroksabano ir sakubitrilo / valsartano) metabolizmas vyksta ne tik kepenų, bet ir endotelio ląstelėse. Identifikuotas naujas su tirtų vaistų metabolizmu susijęs junginys – (Z)-dokus-13-enamidas. Šio junginio koncentracija kito priklausomai nuo veiktų vaistų koncentracijos, kuria veiktos tiriamosios ląstelės. Nustatyta, kad kepenų ląstelėse gali būti slopinamas sakubitrilo metabolizmas į sakubitrilatą vykstant uždegimo procesui bei sumažėjus fermentų funkcijai arba slopinant fermentų raišką.

Išvados

1. Identifikuoti rivaroksabano M-1, M-2, M-5, M-8, M-10, M-11, M-18 metabolitai HUVEC ląstelėse paveiktose skirtingomis vaisto koncentracijomis. Nustatytas naujas su vaistų poveikiu susijęs junginys (Z)-dokos-13-enamidas, kurio koncentracija mažėjo didėjant vaisto koncentracijai.
2. Nustatytas sakubitrilo aktyvusis metabolitas M1 ir (Z)-dokos-13-enamidas HUVEC ir HepG2 ląstelėse paveiktose sakubitrilo / valsartano vaistu. Didinant vaisto koncentraciją, visų junginių – sakubitrilo, sakubitrilato ir 13-dokosenamido kiekiai didėjo HUVEC ir HepG2 ląstelių terpėse, HUVEC ląstelių lizatuose didėjo tik 13-dokosenamido, o HepG2 ląstelių lizatuose 13-dokosenamido koncentracija mažėjo. Nustatyta, kad sakubitrilas nėra pilnai metabolizuojamas į aktyvųjį metabolitą (sakubitrilatą) M1, kai HUVEC ląstelės yra veikiamos didesne negu 0,1 μM vaisto koncentracija. Sakubitrilo metabolitas M1 HepG2 ląstelėse nenustatytas.
3. Nustatyta, kad CYP4F2 fermento koncentracija padidėjo 2,6 karto, HUVEC ląsteles paveikus 5 μM sakubitrilo / valsartano koncentracija. Didėjant vaisto koncentracijai, mažėjo CYP4F2 baltymo koncentracija HepG2 ląstelėse.
4. Nustatyta, kad hsa-miR-24-3p imitatorius slopino sakubitrilo biotransformaciją į aktyvųjį metabolitą M1 HUVEC ląstelėse.

Praktinės rekomendacijos

Tyrimo metu nustatyta, kad rivaroksabanas ir sakubitrilas / valsartanas lemia naujo junginio, 13-dokosenamido koncentracijos pokyčius, o CYP4F2 inhibitorius slopina sakubitrilo metabolizmą į sakubitrilatą (M1). Tolimesni tyrimai galėtų būti atliekami siekiant išsiaiškinti šių procesų veikimo mechanizmus. Cirkuliuojančių endogeninių miR-24-3p koncentracija galėtų leisti individualizuoti gydymą sakubitrilu, t.y. atsižvelgiant į miR-24-3p koncentraciją, reikėtų didinti vaisto dozavimą pacientams, kuriems indikuotinas šis vaistas, arba kartu skirti kitą vaistą, kuris padidintų sakubitrilo biokonversiją.

Literatūros sąrašas

1. SOLER-BOTIJA, Carolina, Carolina GÁLVEZ-MONTÓN, Antoni BAYÉS-GENÍS. Epigenetic Biomarkers in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in genetics* [interaktyvus]. 2019, **10**, 950 [žiūrėta 2021-05-12]. ISSN 1664-8021. DOI: 10.3389/fgene.2019.00950.
2. EL-HNEITI, Mamdouh, Dr. Mahmoud AL-HUSSAMI. Predicting Risk Factors of Heart Disease among Jordanian Patients. *Health* [interaktyvus]. 2017, **09**, 237–251 [žiūrėta 2021-05-12]. DOI: 10.4236/health.2017.92016.
3. WIRTZ, Veronika J, et al. Access to Medications for Cardiovascular Diseases in Low- and Middle-Income Countries. *Circulation* [interaktyvus]. 2016, **133**(21), 2076–2085 [žiūrėta 2021-05-12]. ISSN 1524-4539. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.008722.
4. MEMON, Shermeen B, Lara BAKHOS, Mushabbar A SYED. Anticoagulation in Cardiovascular Diseases. In: *Anticoagulation and Hemostasis in Neurosurgery* [interaktyvus]. Springer, Cham. 2016, p. 195–214 [žiūrėta 2021-05-12]. ISBN 978-3-319-27327-3. DOI: 10.1007/978-3-319-27327-3_15.
5. NICOLAS, Diala, Connor C KERNDT, Mirembe REED. Sacubitril/Valsartan. *StatPearls* [interaktyvus], 2020 [žiūrėta 2021-05-12].
6. GE, Qing, et al. LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, ameliorates diabetic cardiomyopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Experimental biology and medicine* [interaktyvus]. 2019, **244**(12), 1028–1039 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1535-3699. DOI: 10.1177/1535370219861283.
7. LI, Bao-Hua, et al. Effect of sacubitril valsartan on cardiac function and endothelial function in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction. *Clinical hemorheology and microcirculation* [interaktyvus]. 2021, **77**(4), 425–433 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1875-8622. DOI: 10.3233/CH-201032.
8. WEHLAND, Markus, et al. An evaluation of the fixed-dose combination sacubitril/valsartan for the treatment of arterial hypertension. *Expert opinion on pharmacotherapy* [interaktyvus]. 2020, **21**(10), 1133–1143 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1744-7666. DOI: 10.1080/14656566.2020.1735356.
9. SUEMATSU, Yasunori, et al. LCZ696 (Sacubitril/Valsartan), an Angiotensin-Receptor Neprilysin Inhibitor, Attenuates Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Vasculopathy in a Rat Model of Chronic Kidney Disease. *Journal of cardiac failure* [interaktyvus]. 2018, **24**(4), 266–275 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1532-8414. DOI: 10.1016/j.cardfail.2017.12.010.
10. MCMURRAY, John J V, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *The New England journal of medicine* [interaktyvus]. 2014, **371**(11), 993–1004 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJMoa1409077.
11. GUILLOU, Sophie, et al. Direct Rivaroxaban-Induced Factor XA Inhibition Proves to be Cardioprotective in Rats. *Shock* [interaktyvus]. 2020, **53**(6), 730–736 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1540-0514. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001412.
12. IMANO, Hideki, et al. Rivaroxaban Attenuates Right Ventricular Remodeling in Rats with Pulmonary Arterial Hypertension. *Biological & pharmaceutical bulletin* [interaktyvus]. 2021, **44**(5), 669–677 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1347-5215. DOI: 10.1248/bpb.b20-01011.
13. DING, Yong, et al. Factor Xa inhibitor rivaroxaban suppresses experimental abdominal aortic aneurysm progression via attenuating aortic inflammation. *Vascular pharmacology*

- [interaktyvus]. 2021, **136**, 106818 [žiūrėta 2021-05-13]. ISSN 1879-3649. DOI: 10.1016/j.vph.2020.106818.
14. ISSA, Naiem T, et al. Drug Metabolism in Preclinical Drug Development: A Survey of the Discovery Process, Toxicology, and Computational Tools. *Current drug metabolism* [interaktyvus]. 2017, **18**(6), 556–565 [žiūrėta 2021-05-14]. ISSN 1875-5453. DOI: 10.2174/1389200218666170316093301.
 15. ALMAZROO, Omar Abdulhameed, Mohammad Kowser MIAH, Raman VENKATARAMANAN. Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in liver disease* [interaktyvus]. 2017, **21**(1), 1–20 [žiūrėta 2021-05-14]. ISSN 1557-8224. DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.001.
 16. AL-EITAN, Laith N, et al. Influence of CYP4F2, ApoE, and CYP2A6 gene polymorphisms on the variability of Warfarin dosage requirements and susceptibility to cardiovascular disease in Jordan. *International journal of medical sciences* [interaktyvus]. 2021, **18**(3), 826–834 [žiūrėta 2021-05-14]. ISSN 1449-1907. DOI: 10.7150/ijms.51546.
 17. LI, Dongying, et al. Regulation of cytochrome P450 expression by microRNAs and long noncoding RNAs: Epigenetic mechanisms in environmental toxicology and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health. Part C* [interaktyvus]. 2019, **37**(3), 180–214 [žiūrėta 2021-05-14]. ISSN 1532-4095. DOI: 10.1080/10590501.2019.1639481.
 18. SINGH, Ram Pyare, et al. The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* [interaktyvus]. 2013, **12**(12), 1160–1165 [žiūrėta 2021-05-14]. ISSN 1568-9972. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.07.003>.
 19. LU, Yao, et al. Impact of miRNA in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [interaktyvus]. 2018, **38**(9), e159–e170 [žiūrėta 2021-05-14]. DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.310227.
 20. PAPARO, Lorella, et al. The Influence of Fiber on Gut Microbiota: Butyrate as Molecular Player Involved in the Beneficial Interplay Between Dietary Fiber and Cardiovascular Health. In: *Dietary fiber for the prevention of cardiovascular disease* [interaktyvus]. Academic Press, 2017, p. 61–71 [žiūrėta 2021-05-23]. ISBN 9780128051306. DOI: 10.1016/B978-0-12-805130-6.00004-5.
 21. ALISSA, Eman M, Gordon A FERNS. Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. *Journal of toxicology* [interaktyvus]. 2011, **2011**, 870125 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1687-8205. DOI: 10.1155/2011/870125.
 22. WHO. *Cardiovascular diseases (CVDs)* [interaktyvus]. 2017 [žiūrėta 2021-05-23]. Prieiga per internetą: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
 23. FLORA, Gagan D, Manasa K NAYAK. A Brief Review of Cardiovascular Diseases, Associated Risk Factors and Current Treatment Regimes. *Current pharmaceutical design* [interaktyvus]. 2019, **25**(38), 4063–4084 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1873-4286. DOI: 10.2174/1381612825666190925163827.
 24. ADAY, Aaron W, Paul M RIDKER. Targeting Residual Inflammatory Risk: A Shifting Paradigm for Atherosclerotic Disease. *Frontiers in cardiovascular medicine* [interaktyvus]. 2019, **6**, 16 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 2297-055X. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00016.
 25. MAZOR, Rafi, et al. Tumor necrosis factor-alpha: a possible priming agent for the polymorphonuclear leukocyte-reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase in hypertension. *Hypertension* [interaktyvus]. 2010, **55**(2), 353–362 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1524-4563. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144154.

26. RAHIMI, Nader. Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function. *Frontiers in immunology* [interaktyvus]. 2017, **8**, 1847 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1664-3224. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01847.
27. ZHANG, Xinbo, William C SESSA, Carlos FERNÁNDEZ-HERNANDO. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. *Frontiers in cardiovascular medicine* [interaktyvus]. 2018, **5**, 130 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 2297-055X. DOI: 10.3389/fcvm.2018.00130.
28. YAU, Jonathan W, Hwee TEOH, Subodh VERMA. Endothelial cell control of thrombosis. *BMC Cardiovascular Disorders* [interaktyvus]. 2015, **15**(1), 130 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1471-2261. DOI: 10.1186/s12872-015-0124-z.
29. PARK-WINDHOL, Cindy, Patricia A D'AMORE. Disorders of Vascular Permeability. *Annual review of pathology* [interaktyvus]. 2016, **11**, 251–281 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1553-4014. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012615-044506.
30. SUN, Hai-Jian, et al. Endothelial dysfunction and cardiometabolic diseases: Role of long non-coding RNAs. *Life sciences* [interaktyvus]. 2016, **167**, 6–11 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1879-0631. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.11.005.
31. MACKMAN, Nigel. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* [interaktyvus]. 2008, **451**(7181), 914–918 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 1476-4687. DOI: 10.1038/nature06797.
32. BRAUNWALD, Eugene. Heart failure. *JACC. Heart failure* [interaktyvus]. 2013, **1**(1), 1–20 [žiūrėta 2021-05-23]. ISSN 2213-1787. DOI: 10.1016/j.jchf.2012.10.002.
33. LU, J.-D, J XUE. Poisoning: Kinetics to Therapeutics. *Critical Care Nephrology: Third Edition* [interaktyvus]. 2017, p. 600-629.e7 [žiūrėta 2021-05-11]. DOI: 10.1016/B978-0-323-44942-7.00101-1.
34. LIU, X, et al. Hepatic Metabolism in Liver Health and Disease. In: *Liver Pathophysiology* [interaktyvus]. Academic Press, 2017, p. 391–400 [žiūrėta 2021-05-11]. ISBN 978-0-12-804274-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00030-8>.
35. SUSA, Stephen T, Charles V PREUSS. *Drug Metabolism* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2021-05-11]. Prieiga per internetą: <http://europepmc.org/abstract/MED/28723052>
36. ZHANG, Zhoupeng, Wei TANG. Drug metabolism in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [interaktyvus]. 2018, **8**(5), 721–732 [žiūrėta 2021-05-11]. ISSN 2211-3835. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.04.003>.
37. KSANDER, Gary M, et al. Dicarboxylic Acid Dipeptide Neutral Endopeptidase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* [interaktyvus]. 1995, **38**(10), 1689–1700 [žiūrėta 2020-04-11]. ISSN 0022-2623. DOI: 10.1021/jm00010a014.
38. NALIVAEVA, Natalia N, Anthony J TURNER. Neprilysin. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)* [interaktyvus]. 2013, p. 612–619 [žiūrėta 2020-04-11]. ISBN 978-0-12-382219-2. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382219-2.00127-7>.
39. ARRIGO, Mattia, et al. The heart regulates the endocrine response to heart failure: cardiac contribution to circulating neprilysin. *European heart journal*. 2018, **39**(20), 1794–1798 [žiūrėta 2020-04-11]. ISSN 0195-668X.
40. PAVO, Noemi, et al. Neprilysin as a Biomarker: Challenges and Opportunities. *Cardiac failure review* [interaktyvus]. 2020, **6**, e23–e23 [žiūrėta 2020-04-11]. ISSN 2057-7540. DOI: 10.15420/cfr.2019.21.

41. MOSS, Stephen, Vasanta SUBRAMANIAN, K Ravi ACHARYA. High resolution crystal structure of substrate-free human neprilysin. *Journal of structural biology* [interaktyvus]. 2018, **204**(1), 19–25 [žiūrėta 2020-04-11]. ISSN 1095-8657. DOI: 10.1016/j.jsb.2018.06.004.
42. SHARMA, Urvashi, et al. Molecular Basis for Omapatrilat and Sampatrilat Binding to Neprilysin-Implications for Dual Inhibitor Design with Angiotensin-Converting Enzyme. *Journal of medicinal chemistry* [interaktyvus]. 2020, **63**(10), 5488–5500 [žiūrėta 2020-04-11]. ISSN 1520-4804. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00441.
43. RAWLINGS, Neil, Alan BARRETT. Introduction: Metallopeptidases and Their Clans. *Handbook of Proteolytic Enzymes* [interaktyvus]. 2013, **1**, 325–370 [žiūrėta 2020-04-11]. DOI: 10.1016/B978-0-12-382219-2.00077-6.
44. VODOVAR, Nicolas, et al. Elevated Plasma B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Directly Inhibit Circulating Neprilysin Activity in Heart Failure. *JACC. Heart failure* [interaktyvus]. 2015, **3**(8), 629–636 [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 2213-1787. DOI: 10.1016/j.jchf.2015.03.011.
45. EMRICH, Insa E, et al. Do plasma neprilysin activity and plasma neprilysin concentration predict cardiac events in chronic kidney disease patients? *Nephrology Dialysis Transplantation* [interaktyvus]. 2019, **34**(1), 100–108 [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 1460-2385. DOI: 10.1093/ndt/gfy066.
46. STANDEVEN, K F, et al. Neprilysin, obesity and the metabolic syndrome. *International journal of obesity* [interaktyvus]. 2011, **35**(8), 1031–1040 [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 1476-5497. DOI: 10.1038/ijo.2010.227.
47. MINERS, James Scott, et al. A β -degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* [interaktyvus]. 2011, **70**(11), 944–959 [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 1554-6578. DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182345e46.
48. WILLARD, Joshua R, Breanne M BARROW, Sakeneh ZRAIKA. Improved glycaemia in high-fat-fed neprilysin-deficient mice is associated with reduced DPP-4 activity and increased active GLP-1 levels. *Diabetologia* [interaktyvus]. 2017, **60**(4), 701–708 [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 1432-0428. DOI: 10.1007/s00125-016-4172-4.
49. BAYÉS-GENÍS, Antoni, et al. Soluble neprilysin is predictive of cardiovascular death and heart failure hospitalization in heart failure patients. *Journal of the American College of Cardiology* [interaktyvus]. 2015, **65**(7), 657–665 [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 1558-3597. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.11.048.
50. CAMPBELL, Duncan J. Long-term neprilysin inhibition - implications for ARNIs. *Nature reviews Cardiology* [interaktyvus]. 2017, **14**(3), 171–186 [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 1759-5010. DOI: 10.1038/nrcardio.2016.200.
51. MANGIAFICO, Sarah, et al. Neutral endopeptidase inhibition and the natriuretic peptide system: an evolving strategy in cardiovascular therapeutics. *European heart journal* [interaktyvus]. 2013, **34**(12), 886-893c [žiūrėta 2020-04-12]. ISSN 1522-9645. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs262.
52. HUO, Xiaoqian, et al. Discovery of Novel Multi-target Inhibitor of angiotensin type 1 receptor and neprilysin inhibitors from Traditional Chinese Medicine. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2019, **9**(1), 16205 [žiūrėta 2020-04-18]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-019-52309-z.

53. SCHIERING, Nikolaus, et al. Structure of neprilysin in complex with the active metabolite of sacubitril. *Scientific Reports* [interaktyvus]. 2016, **6**(1), 27909 [žiūrėta 2020-04-18]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/srep27909.
54. FLARAKOS, Jimmy, et al. Disposition and metabolism of [14C] Sacubitril/Valsartan (formerly LCZ696) an angiotensin receptor neprilysin inhibitor, in healthy subjects. *Xenobiotica* [interaktyvus]. 2016, **46**(11), 986–1000 [žiūrėta 2020-04-18]. ISSN 1366-5928. DOI: 10.3109/00498254.2015.1014944.
55. SHI, Jian, et al. Sacubitril Is Selectively Activated by Carboxylesterase 1 (CES1) in the Liver and the Activation Is Affected by CES1 Genetic Variation. *Drug Metabolism and Disposition* [interaktyvus]. 2016, **44**(4), 554–559 [žiūrėta 2020-04-18]. ISSN 1521-009X. DOI: 10.1124/dmd.115.068536.
56. BHUIYAN, Mohiuddin Ahmed, et al. Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. *Life Sciences* [interaktyvus]. 2009, **85**(3), 136–140 [žiūrėta 2020-04-18]. ISSN 0024-3205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.05.001>.
57. SAYDAM, Mehtap, Sevgi TAKKA. Bioavailability file: Valsartan. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007, **32**, 185–196.
58. PATON, D M. Nebivolol/valsartan: Fixed-dose combination for treatment of hypertension. *Drugs of today* [interaktyvus]. 2017, **53**(1), 19–26 [žiūrėta 2020-04-18]. ISSN 1699-3993. DOI: 10.1358/dot.2017.53.1.2560078.
59. BLACK, Henry R, et al. Valsartan: more than a decade of experience. *Drugs* [interaktyvus]. 2009, **69**(17), 2393–2414 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 1179-1950. DOI: 10.2165/11319460-000000000-00000.
60. NAKASHIMA, A, et al. Identification of cytochrome P450 forms involved in the 4-hydroxylation of valsartan, a potent and specific angiotensin II receptor antagonist, in human liver microsomes. *Xenobiotica* [interaktyvus]. 2005, **35**(6), 589–602 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 0049-8254. DOI: 10.1080/00498250500158175.
61. WALDMEIER, F, et al. Pharmacokinetics, disposition and biotransformation of [14C]-radiolabelled valsartan in healthy male volunteers after a single oral dose. *Xenobiotica* [interaktyvus]. 1997, **27**(1), 59–71 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 0049-8254. DOI: 10.1080/004982597240767.
62. ANSARA, A J, D M KOLANCZYK, J M KOEHLER. Neprilysin inhibition with sacubitril/valsartan in the treatment of heart failure: mortality bang for your buck. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* [interaktyvus]. 2016, **41**(2), 119–127 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 1365-2710. DOI: 10.1111/jcpt.12363.
63. RICHARDS, A M. The renin-angiotensin-aldosterone system and the cardiac natriuretic peptides. *Heart* [interaktyvus]. 1996, **76**(3 Suppl 3), 36–44 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 1355-6037. DOI: 10.1136/hrt.76.3_suppl_3.36.
64. MORRIS, Deborah L, Devang SANGHAVI, Chadi I KAHWAJI. Angiotensin II. *StatPearls* [interaktyvus]. 2020 [žiūrėta 2020-04-19].
65. VARDENY, Orly, Ryan MILLER, Scott D SOLOMON. Combined neprilysin and renin-angiotensin system inhibition for the treatment of heart failure. *JACC. Heart failure* [interaktyvus]. 2014, **2**(6), 663–670 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 2213-1787. DOI: 10.1016/j.jchf.2014.09.001.

66. FRYER, R M, et al. Effect of bradykinin metabolism inhibitors on evoked hypotension in rats: rank efficacy of enzymes associated with bradykinin-mediated angioedema. *British journal of pharmacology* [interaktyvus]. 2008, **153**(5), 947–955 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 0007-1188. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707641.
67. VON LUEDER, Thomas G, et al. Angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 attenuates cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction by reducing cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circulation: Heart failure* [interaktyvus]. 2015, **8**(1), 71–78 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 1941-3297. DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001785.
68. BUNSAWAT, Kanokwan, et al. Sacubitril-valsartan improves conduit vessel function and functional capacity and reduces inflammation in heart failure with reduced ejection fraction. *Journal of applied physiology* [interaktyvus]. 2021, **130**(1), 256–268 [žiūrėta 2020-04-19]. ISSN 1522-1601. DOI: 10.1152/jappphysiol.00454.2020.
69. IBORRA-EGEA, Oriol, et al. Mechanisms of action of sacubitril/valsartan on cardiac remodeling: a systems biology approach. *npj Systems Biology and Applications* [interaktyvus]. 2017, **3** [žiūrėta 2020-04-19]. DOI: 10.1038/s41540-017-0013-4.
70. GARCIA, Rodrigo, et al. Dual ARB/NEP inhibition improved endothelial function in metabolic syndrome. *Trends in Research* [interaktyvus]. 2019, **2** [žiūrėta 2021-05-11]. DOI: 10.15761/TR.1000143.
71. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 9875401, Rivaroxaban [interaktyvus] [žiūrėta 2021-05-06]. Prieiga per internetą: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rivaroxaban>
72. BAYER. Xarelto: EU summary of product characteristics [interaktyvus]. 2013 [žiūrėta 2021-05-06]. Prieiga per internetą: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xarelto-epar-product-information_en.pdf
73. BRATSOS, Sosipatros. Pharmacokinetic Properties of Rivaroxaban in Healthy Human Subjects. *Cureus* [interaktyvus]. 2019, **11**(8), e5484–e5484 [žiūrėta 2021-05-06]. ISSN 2168-8184. DOI: 10.7759/cureus.5484.
74. SAMAMA, Meyer Michel. The mechanism of action of rivaroxaban – an oral, direct Factor Xa inhibitor – compared with other anticoagulants. *Thrombosis Research* [interaktyvus]. 2011, **127**(6), 497–504 [žiūrėta 2021-05-06]. ISSN 0049-3848. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.09.008>.
75. CABEZAS-CALDERON, V, P BASSAS FREIXAS, V GARCÍA-PATOS BRIONES. Direct-acting Oral Anticoagulants in Dermatologic Surgery. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* [interaktyvus]. 2020, **111**(5), 357–363 [žiūrėta 2021-05-11]. ISSN 1578-2190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2019.10.008>.
76. LANG, D, C FREUDENBERGER, C WEINZ. In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs, and humans. *Drug Metabolism and Disposition* [interaktyvus]. 2009, **37**(5), 1046–1055 [žiūrėta 2021-05-06]. ISSN 1521-009X. DOI: 10.1124/dmd.108.025551.
77. WEINZ, C, et al. Metabolism and Excretion of Rivaroxaban, an Oral, Direct Factor Xa Inhibitor, in Rats, Dogs, and Humans. *Drug Metabolism and Disposition* [interaktyvus]. 2009, **37**(5), 1056 LP – 1064 [žiūrėta 2021-05-06]. DOI: 10.1124/dmd.108.025569.

78. ONAT, Duygu, et al. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Current diabetes reports* [interaktyvus]. 2011, **11**(3), 193–202 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1539-0829. DOI: 10.1007/s11892-011-0182-2.
79. SCHLEGER, Claudia, Stefan J PLATZ, Ulrich DESCHL. Development of an in vitro model for vascular injury with human endothelial cells. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*. 2004, **21 Suppl 3**, 12–19 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1868-596X.
80. RHIM, Johng, et al. A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1998, **19**, 673–681.
81. FÖRSTERMANN, Ulrich, Ning XIA, Huige LI. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation research* [interaktyvus]. 2017, **120**(4), 713–735 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1524-4571. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.
82. MACIAG, T, et al. Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *The Journal of cell biology* [interaktyvus]. 1981, **91**(2 Pt 1), 420–426 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.91.2.420.
83. BAUDIN, Bruno, et al. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature protocols* [interaktyvus]. 2007, **2**(3), 481–485 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1750-2799. DOI: 10.1038/nprot.2007.54.
84. MONTI, Martina, et al. H(2)S dependent and independent anti-inflammatory activity of zofenoprilat in cells of the vascular wall. *Pharmacological research* [interaktyvus]. 2016, **113**(Pt A), 426–437 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1096-1186. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.09.017.
85. FEARON, Ian M, Marianna D GAÇA, Brian K NORDSKOG. In vitro models for assessing the potential cardiovascular disease risk associated with cigarette smoking. *Toxicology in vitro* [interaktyvus]. 2013, **27**(1), 513–522 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1879-3177. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.08.018.
86. HIRANI, Vandana, et al. Expression of CYP4F2 in human liver and kidney: Assessment using targeted peptide antibodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [interaktyvus]. 2008, **478**(1), 59–68 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 0003-9861. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.06.025>.
87. CHENG, Jennifer, et al. Vascular characterization of mice with endothelial expression of cytochrome P450 4F2. *The FASEB journal* [interaktyvus]. 2014, **28**(7), 2915–2931 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1530-6860. DOI: 10.1096/fj.13-241927.
88. WU, Cheng-Chia, et al. 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications. *Cardiology in review* [interaktyvus]. 2014, **22**(1), 1–12 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1538-4683. DOI: 10.1097/CRD.0b013e3182961659.
89. ROCIC, Petra, Michal Laniado SCHWARTZMAN. 20-HETE in the regulation of vascular and cardiac function. *Pharmacology & therapeutics* [interaktyvus]. 2018/07/23. 2018, **192**, 74–87 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1879-016X. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.07.004.
90. JOSEPH, Gregory, et al. Elevated 20-HETE impairs coronary collateral growth in metabolic syndrome via endothelial dysfunction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* [interaktyvus]. 2017, **312**(3), H528–H540 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1522-1539. DOI: 10.1152/ajpheart.00561.2016.

91. ROMAN, Richard J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiological reviews* [interaktyvus]. 2002, **82**(1), 131–185 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00021.2001.
92. IMIG, J D. Epoxyeicosatrienoic Acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid on Endothelial and Vascular Function. *Advances in pharmacology* [interaktyvus]. 2016, **77**, 105–141 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1557-8925. DOI: 10.1016/bs.apha.2016.04.003.
93. HOOPEs, Samantha L, et al. Vascular actions of 20-HETE. *Prostaglandins & other lipid mediators* [interaktyvus]. 2015/03/23. 2015, **120**, 9–16 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1098-8823. DOI: 10.1016/j.prostaglandins.2015.03.002.
94. CHÁBOVÁ, Vera Certíková, et al. Effects of chronic cytochrome P-450 inhibition on the course of hypertension and end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. *Vascular pharmacology* [interaktyvus]. 2007, **47**(2–3), 145–159 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1537-1891. DOI: 10.1016/j.vph.2007.05.005.
95. BUBB, Kristen J, et al. Activation of neuronal transient receptor potential vanilloid 1 channel underlies 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vasoactivity: role for protein kinase A. *Hypertension* [interaktyvus]. 2013, **62**(2), 426–433 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1524-4563. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00942.
96. STEC, David E, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) stimulates migration of vascular smooth muscle cells. *Cellular physiology and biochemistry* [interaktyvus]. 2007, **19**(1–4), 121–128 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1015-8987. DOI: 10.1159/000099200.
97. OROZCO, Ludwig D, et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibition attenuates balloon injury-induced neointima formation and vascular remodeling in rat carotid arteries. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* [interaktyvus]. 2013, **346**(1), 67–74 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1521-0103. DOI: 10.1124/jpet.113.203844.
98. CHENG, Jennifer, et al. Induction of angiotensin-converting enzyme and activation of the renin-angiotensin system contribute to 20-hydroxyeicosatetraenoic acid-mediated endothelial dysfunction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [interaktyvus]. 2012, **32**(8), 1917–1924 [žiūrėta 2021-05-27]. ISSN 1524-4636. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.248344.
99. BARTEL, David P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* [interaktyvus]. 2004, **116**(2), 281–297 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 0092-8674. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
100. SEO, Hyang-Hee, et al. Exogenous miRNA-146a Enhances the Therapeutic Efficacy of Human Mesenchymal Stem Cells by Increasing Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Ischemia/Reperfusion-Injured Heart. *Journal of vascular research* [interaktyvus]. 2017, **54**(2), 100–108 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1423-0135. DOI: 10.1159/000461596.
101. FARAONI, Isabella, et al. miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [interaktyvus]. 2009, **1792**(6), 497–505 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 0925-4439. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013>.
102. IORIO, Marilena V, Carlo M CROCE. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine* [interaktyvus]. 2012, **4**(3), 143–159 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1757-4684. DOI: 10.1002/emmm.201100209.

- 103.SIASOS, Gerasimos, et al. MicroRNAs in cardiovascular disease. *Hellenic Journal of Cardiology* [interaktyvus]. 2020, **61**(3), 165–173 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1109-9666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2020.03.003>.
- 104.HÉBERT, Sébastien S, Bart DE STROOPER. Molecular biology. miRNAs in neurodegeneration. *Science* [interaktyvus]. 2007, **317**(5842), 1179–1180 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1148530.
- 105.GIZA, Dana Elena, Catalin VASILESCU, George A CALIN. Key principles of miRNA involvement in human diseases. *Discoveries* [interaktyvus]. 2014, **2**(4), e34 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 2359-7232. DOI: 10.15190/d.2014.26.
- 106.BONNEAU, E, et al. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC*. 2019, **30**(2), 114–127 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1650-3414.
- 107.WANG, Shusheng, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell* [interaktyvus]. 2008, **15**(2), 261–271 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1878-1551. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.002.
- 108.MOGILYANSKY, E, I RIGOUTSOS. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell death and differentiation* [interaktyvus]. 2013, **20**(12), 1603–1614 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1476-5403. DOI: 10.1038/cdd.2013.125.
- 109.HENDGEN-COTTA, Ulrike B, et al. Inorganic nitrite modulates miRNA signatures in acute myocardial in vivo ischemia/reperfusion. *Free radical research* [interaktyvus]. 2017, **51**(1), 91–102 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1029-2470. DOI: 10.1080/10715762.2017.1282158.
- 110.BIAN, Bo, et al. Role of miRNA-1 in regulating connexin 43 in ischemia-reperfusion heart injury: a rat model. *Cardiovascular pathology* [interaktyvus]. 2017, **27**, 37–42 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1879-1336. DOI: 10.1016/j.carpath.2016.12.006.
- 111.ZHOU, Yue, et al. Discovery of Potential Therapeutic miRNA Targets in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* [interaktyvus]. 2016, **21**(3), 296–309 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1940-4034. DOI: 10.1177/1074248415604463.
- 112.MA, Long, et al. Changes of miRNA-17-5p, miRNA-21 and miRNA-106a level during rat kidney ischemia-reperfusion injury. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2015, **95**(19), 1488–1492 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 0376-2491.
- 113.ZHANG, Rong, et al. Elevated plasma microRNA-1 predicts heart failure after acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* [interaktyvus]. 2013, **166**(1), 259–260 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 18741754. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.108.
- 114.GIDLÖF, Olof, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC cardiovascular disorders* [interaktyvus]. 2013, **13**, 12 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1471-2261. DOI: 10.1186/1471-2261-13-12.
- 115.LAI, Ka-Bik, et al. Micro-RNA and mRNA myocardial tissue expression in biopsy specimen from patients with heart failure. *International journal of cardiology* [interaktyvus]. 2015, **199**, 79–83 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1874-1754. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.07.043.
- 116.DUAN, Quanlu, et al. MicroRNA regulation of unfolded protein response transcription factor XBP1 in the progression of cardiac hypertrophy and heart failure in vivo. *Journal of*

- translational medicine* [interaktyvus]. 2015, **13**, 363 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1479-5876. DOI: 10.1186/s12967-015-0725-4.
- 117.DA COSTA MARTINS, Paula A, Leon J DE WINDT. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* [interaktyvus]. 2012, **93**(4), 563–572 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1755-3245. DOI: 10.1093/cvr/cvs013.
- 118.WANG, Jiaji, et al. miR-499 protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis via its effects on Pcd4 and Pacs2. *RNA biology* [interaktyvus]. 2014/02/27. 2014, **11**(4), 339–350 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1555-8584. DOI: 10.4161/rna.28300.
- 119.ZHANG, Busheng, et al. MicroRNA-92a inhibition attenuates hypoxia/reoxygenation-induced myocardiocyte apoptosis by targeting Smad7. *PloS one* [interaktyvus]. 2014, **9**(6), e100298 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0100298.
- 120.MAEGDEFESSEL, Lars, et al. miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. *Nature communications* [interaktyvus]. 2014, **5**, 5214 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 2041-1723. DOI: 10.1038/ncomms6214.
- 121.ZHENG, Ye, et al. MicroRNA-24 inhibits the proliferation and migration of endothelial cells in patients with atherosclerosis by targeting importin- α 3 and regulating inflammatory responses. *Experimental and therapeutic medicine* [interaktyvus]. 2017/10/23. 2018, **15**(1), 338–344 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1792-0981. DOI: 10.3892/etm.2017.5355.
- 122.FERNÁNDEZ-HERNANDO, Carlos, Yajaira SUÁREZ. MicroRNAs in endothelial cell homeostasis and vascular disease. *Current opinion in hematology* [interaktyvus]. 2018, **25**(3), 227–236 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1531-7048. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000424.
- 123.ZHANG, Ming-Xue, et al. miR-24-3p Suppresses Malignant Behavior of Lacrimal Adenoid Cystic Carcinoma by Targeting PRKCH to Regulate p53/p21 Pathway. *PloS one* [interaktyvus]. 2016, **11**(6), e0158433 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0158433.
- 124.WANG, S, et al. Hsa-miR-24-3p increases nasopharyngeal carcinoma radiosensitivity by targeting both the 3'UTR and 5'UTR of Jab1/CSN5. *Oncogene* [interaktyvus]. 2016, **35**(47), 6096–6108 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1476-5594. DOI: 10.1038/onc.2016.147.
- 125.ZHU, Xiao-feng, et al. Investigating the Role of the Posttranscriptional Gene Regulator MiR-24-3p in the Proliferation, Migration and Apoptosis of Human Arterial Smooth Muscle Cells in Arteriosclerosis Obliterans. *Cellular physiology and biochemistry* [interaktyvus]. 2015, **36**(4), 1359–1370 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1421-9778. DOI: 10.1159/000430302.
- 126.XIAO, Shuqi, et al. MicroRNA miR-24-3p Promotes Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication through Suppression of Heme Oxygenase-1 Expression. *Journal of virology* [interaktyvus]. 2015, **89** [žiūrėta 2021-05-03]. DOI: 10.1128/JVI.02810-14.
- 127.YUAN, Ye, et al. miR-24-3p Is Overexpressed in Hodgkin Lymphoma and Protects Hodgkin and Reed-Sternberg Cells from Apoptosis. *The American journal of pathology* [interaktyvus]. 2017, **187**(6), 1343–1355 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1525-2191. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.02.016.
- 128.KANG, Hoin, et al. The miR-24-3p/p130Cas: a novel axis regulating the migration and invasion of cancer cells. *Scientific reports* [interaktyvus]. 2017, **7**, 44847 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 2045-2322. DOI: 10.1038/srep44847.
- 129.YU, Guoqiang, Zhaohui JIA, Zhongling DOU. miR-24-3p regulates bladder cancer cell proliferation, migration, invasion and autophagy by targeting DEDD. *Oncology reports*

- [interaktyvus]. 2017, **37**(2), 1123–1131 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1791-2431. DOI: 10.3892/or.2016.5326.
- 130.KERIMIS, Dimitrios, et al. Elevated expression of miR-24-3p is a potentially adverse prognostic factor in colorectal adenocarcinoma. *Clinical Biochemistry* [interaktyvus]. 2017, **50**(6), 285–292 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 0009-9120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.11.034>.
- 131.YIN, Yan, et al. TRIM11, a direct target of miR-24-3p, promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in colon cancer. *Oncotarget* [interaktyvus]. 2016, **7**(52), 86755–86765 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.13550.
- 132.YE, Shu-Biao, et al. Exosomal miR-24-3p impedes T-cell function by targeting FGF11 and serves as a potential prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *The Journal of pathology* [interaktyvus]. 2016, **240**(3), 329–340 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1096-9896. DOI: 10.1002/path.4781.
- 133.LIU, Zhendong, et al. miR-24 represses metastasis of human osteosarcoma cells by targeting Ack1 via AKT/MMPs pathway. *Biochemical and biophysical research communications* [interaktyvus]. 2017, **486**(2), 211–217 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1090-2104. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.02.045.
- 134.ZHANG, Haiyang, et al. Onco-miR-24 regulates cell growth and apoptosis by targeting BCL2L1 in gastric cancer. *Protein & cell* [interaktyvus]. 2016/01/12. 2016, **7**(2), 141–151 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1674-8018. DOI: 10.1007/s13238-015-0234-5.
- 135.DONG, Xiaogang, et al. MiR-24-3p enhances cell growth in hepatocellular carcinoma by targeting metallothionein 1M. *Cell biochemistry and function* [interaktyvus]. 2016, **34**(7), 491–496 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1099-0844. DOI: 10.1002/cbf.3213.
- 136.CHEN, Li, et al. MicroRNA-24 increases hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion by targeting p53: miR-24 targeted p53. *Biomedicine & pharmacotherapy* [interaktyvus]. 2016, **84**, 1113–1118 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1950-6007. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.10.051.
- 137.CUI, Shufang, et al. ING5 suppresses breast cancer progression and is regulated by miR-24. *Molecular Cancer* [interaktyvus]. 2017, **16** [žiūrėta 2021-05-03]. DOI: 10.1186/s12943-017-0658-z.
- 138.ROSCIGNO, Giuseppina, et al. MiR-24 induces chemotherapy resistance and hypoxic advantage in breast cancer. *Oncotarget* [interaktyvus]. 2017, **8**(12), 19507–19521 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.14470.
- 139.WEI, Wenjuan, Jun PENG, Ting SHEN. Rosuvastatin Alleviates Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiomyocytes by Downregulating Hsa-miR-24-3p to Target Upregulated Uncoupling Protein 2. *Cellular reprogramming* [interaktyvus]. 2019, **21**(2), 99–107 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 2152-4998. DOI: 10.1089/cell.2018.0039.
- 140.GECYS, Dovydas, et al. New potential modulators of CYP4F2 enzyme activity in angina pectoris: hsa-miR-24-3p and hsa-miR-34a-5p. *Biomarkers* [interaktyvus]. 2020, **25**(1), 40–47 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1366-5804. DOI: 10.1080/1354750X.2019.1690580.
- 141.SALLOUM-ASFAR, Salam, et al. MiRNA-Based Regulation of Hemostatic Factors through Hepatic Nuclear Factor-4 Alpha. *PloS one* [interaktyvus]. 2016, **11**(5), e0154751 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0154751.
- 142.FIEDLER, Jan, et al. Functional microRNA library screening identifies the hypoxamir miR-24 as a potent regulator of smooth muscle cell proliferation and vascularization. *Antioxidants &*

- redox signaling* [interaktyvus]. 2014, **21**(8), 1167–1176 [žiūrėta 2021-05-03]. ISSN 1557-7716. DOI: 10.1089/ars.2013.5418.
143. ŽŪKIENĖ, Rasa. 7.3.2. Furje transformacijos (FT) spektrometrai. *Spektrinė analizė* [interaktyvus]. 2012, p. 84–85 [žiūrėta 2021-03-16]. DOI: 10.5755/e01.9786094331565.
 144. EISSA, Maya S, Amal M ABOU AL ALAMEIN. Innovative spectrophotometric methods for simultaneous estimation of the novel two-drug combination: Sacubitril/Valsartan through two manipulation approaches and a comparative statistical study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [interaktyvus]. 2018, **193**, 365–374 [žiūrėta 2021-03-14]. ISSN 1386-1425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.050>.
 145. BELLIS, Alessandro, et al. The Rationale of Neprilysin Inhibition in Prevention of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury during ST-Elevation Myocardial Infarction. *Cells* [interaktyvus]. 2020, **9**(9) [žiūrėta 2021-03-11]. ISSN 2073-4409. DOI: 10.3390/cells9092134.
 146. LUDWIG, Christian, Mark R VIANT. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. *Phytochemical analysis* [interaktyvus]. 2010, **21**(1), 22–32 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 1099-1565. DOI: 10.1002/pca.1186.
 147. LEI, Zhentian, David V HUHMANN, Lloyd W SUMNER. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *The Journal of biological chemistry* [interaktyvus]. 2011, **286**(29), 25435–25442 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.R111.238691.
 148. NORDSTRÖM, Anders, et al. Multiple ionization mass spectrometry strategy used to reveal the complexity of metabolomics. *Analytical chemistry* [interaktyvus]. 2008, **80**(2), 421–429 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac701982e.
 149. KARU, Naama, et al. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Analytica chimica acta* [interaktyvus]. 2018, **1030**, 1–24 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 1873-4324. DOI: 10.1016/j.aca.2018.05.031.
 150. XIAN, Feng, Christopher L HENDRICKSON, Alan G MARSHALL. High Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2012, **84**(2), 708–719 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac203191t.
 151. LI, Xiu-Yang, et al. UPLC-QTOF-MS based metabolomics coupled with the diagnostic ion exploration strategy for rapidly evaluating sulfur-fumigation caused holistic quality variation in medicinal herbs, Moutan Cortex as an example. *Analytical Methods* [interaktyvus]. 2016, **8**(5), 1034–1043 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 1759-9660. DOI: 10.1039/C5AY01404B.
 152. ZHU, Zheng-Jiang, et al. Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry characterization of metabolites guided by the METLIN database. *Nature protocols* [interaktyvus]. 2013, **8**(3), 451–460 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 1750-2799. DOI: 10.1038/nprot.2013.004.
 153. GUILLARME, Davy, et al. Coupling Ultra-High-Pressure Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [interaktyvus]. 2010, **29**, 15–27 [žiūrėta 2021-05-20]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.09.008.
 154. DRABOVICH, Andrei, et al. Chapter 2 - Proteomic and Mass Spectrometry Technologies for Biomarker Discovery. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery* [interaktyvus]. 2013, p. 17–37 [žiūrėta 2021-05-20]. ISBN 9780123944467. DOI: 10.1016/B978-0-12-394446-7.00002-9.
 155. XIAN, Feng, Shuwei LI, Siqi LIU. Rapid biosynthesis of stable isotope-labeled peptides from a reconstituted in vitro translation system for targeted proteomics. *Methods in enzymology*

- [interaktyvus]. 2015, **565**, 347–366 [žiūrėta 2021-05-20]. ISSN 1557-7988. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.07.013.
156. PILATTI, Fernanda, et al. *UV-Visible Spectrophotometry-Based Metabolomic Analysis of Cedrela Fissilis Velozzo (Meliaceae) Calluses - A Screening Tool for Culture Medium Composition and Cell Metabolic Profiles* [interaktyvus]. 2015 [žiūrėta 2021-05-26]. ISBN 978-3-319-19775-3. DOI: 10.1007/978-3-319-19776-0_4.
157. COSTA, Christopher, Marcelo MARASCHIN, Miguel ROCHA. An R package for the integrated analysis of metabolomics and spectral data. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* [interaktyvus]. 2016, **129**, 117–124 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 0169-2607. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmpb.2016.01.008>.
158. BOUMEHIRA, Ali, et al. Application of Attenuated Total Reflection/Fourier Transform Infrared Spectroscopy in the Screening of Strains Producing Bioactive Molecules: A Metabolomics Approach. *Journal of scientific and industrial research*. 2019, **78**, 301–306. [žiūrėta 2021-05-26].
159. BARBOSA, Fábio, et al. UV Spectrophotometric method for quantitative determination of Agomelatine in coated tablets. *Drug Analytical Research* [interaktyvus]. 2017, **1**, 24–29 [žiūrėta 2021-05-26]. DOI: 10.22456/2527-2616.79219.
160. OUHADDOUCH, H, et al. FT-IR Spectroscopy Applied for Identification of a Mineral Drug Substance in Drug Products: Application to Bentonite. *Journal of Spectroscopy* [interaktyvus]. 2019, **2019**, 1–6 [žiūrėta 2021-05-26]. DOI: 10.1155/2019/2960845.
161. ØSTERGAARD, Jesper. UV imaging in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [interaktyvus]. 2018, **147**, 140–148 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 0731-7085. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.055>.
162. ÁLVAREZ, Ezequiel, et al. Protective, repairing and fibrinolytic effects of rivaroxaban on vascular endothelium. *British journal of clinical pharmacology* [interaktyvus]. 2018, **84**(2), 280–291 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1365-2125. DOI: 10.1111/bcp.13440.
163. KITASATO, Lisa, et al. Endothelial Cell Survival under High Glucose Condition: Effect of Rivaroxaban. *Clinical Cardiology and Research*. 2015, **2**, 3.
164. ELLINGHAUS, Peter, et al. Expression of pro-inflammatory genes in human endothelial cells: Comparison of rivaroxaban and dabigatran. *Thrombosis Research* [interaktyvus]. 2016, **142**, 44–51 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 0049-3848. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.04.008>.
165. GYAMFI, Daniel, Kwabena Owusu DANQUAH. Nutrients and Liver Metabolism. In: *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition* [interaktyvus]. Academic Press, 2016, p. 3–15 [žiūrėta 2021-05-26]. ISBN 978-0-12-800773-0. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800773-0.00001-X>.
166. COLEMAN, Michael D. *Human drug metabolism*. John Wiley & Sons, 2020. ISBN 1119458560.
167. MONZO, Luca, et al. Sacubitril/valsartan effect on left ventricular remodeling: the case of a super-responder. *Current medical research and opinion* [interaktyvus]. 2019, **35**(sup3), 3–6 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1473-4877. DOI: 10.1080/03007995.2019.1598704.
168. VALENTIM GONCALVES, Antonio, et al. C-reactive protein reduction with sacubitril-valsartan treatment in heart failure patients. *American journal of cardiovascular disease*

- [interaktyvus]. 2020, **10**(3), 174–181 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 2160-200X. Prieiga per internetą: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32923098>
169. JABBOUR, R. E, A. P. SNYDER. Mass spectrometry-based proteomics techniques for biological identification. In: *Biological Identification* [interaktyvus]. Woodhead Publishing, 2014, p. 370–430 [žiūrėta 2021-05-26]. ISBN 978-0-85709-501-5. DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857099167.4.370>.
170. DONATO, M Teresa, Ramiro JOVER, M José GÓMEZ-LECHÓN. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Current drug metabolism* [interaktyvus]. 2013, **14**(9), 946–968 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1875-5453. DOI: 10.2174/1389200211314090002.
171. GUO, Lei, et al. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition* [interaktyvus]. 2011, **39**(3), 528–538 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1521-009X. DOI: 10.1124/dmd.110.035873.
172. ROSS, Matthew K, et al. Examination of the carboxylesterase phenotype in human liver. *Archives of biochemistry and biophysics* [interaktyvus]. 2012/04/16. 2012, **522**(1), 44–56 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1096-0384. DOI: 10.1016/j.abb.2012.04.010.
173. WONG, Chi C, et al. Carboxylesterases 1 and 2 hydrolyze phospho-nonsteroidal anti-inflammatory drugs: relevance to their pharmacological activity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* [interaktyvus]. 2011/11/15. 2012, **340**(2), 422–432 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1521-0103. DOI: 10.1124/jpet.111.188508.
174. SHEN, Yuanjun, Zhanquan SHI, Bingfang YAN. Carboxylesterases: Pharmacological Inhibition Regulated Expression and Transcriptional Involvement of Nuclear Receptors and other Transcription Factors. *Nuclear Receptor Research* [interaktyvus]. 2019, **6** [žiūrėta 2021-05-26]. DOI: 10.32527/2019/101435.
175. WAKAMATSU, Kaori, et al. Isolation of fatty acid amide as an angiogenic principle from bovine mesentery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [interaktyvus]. 1990, **168**(2), 423–429 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 0006-291X. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(90\)92338-Z](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92338-Z).
176. LI, Miao-Miao, et al. Antidepressant and anxiolytic-like behavioral effects of erucamide, a bioactive fatty acid amide, involving the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in mice. *Neuroscience Letters* [interaktyvus]. 2017, **640**, 6–12 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 0304-3940. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.072>.
177. TAMILMANI, Elavarasan, Rohit RADHAKRISHNAN, K SANKARAN. 13-Docosamide release by bacteria in response to glucose during growth—fluorescein quenching and clinical application. *Applied Microbiology and Biotechnology* [interaktyvus]. 2018, **102**(15), 6673–6685 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1432-0614. DOI: 10.1007/s00253-018-9127-x.
178. SHAREEF, Hasanain, et al. Antibacterial Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) Roscoe and Bioactive Chemical Analysis using Gas Chromatography Mass Spectrum. *Oriental Journal of Chemistry* [interaktyvus]. 2016, **32**, 817–837 [žiūrėta 2021-05-26]. DOI: 10.13005/ojc/320207.
179. DOS REIS, Caroline Medeiros, et al. Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. *Journal of Biotechnology* [interaktyvus]. 2019, **294**, 30–37. ISSN 0168-1656 [žiūrėta 2021-05-26]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.022>.

180. PRADHEESH, G. Antimicrobial activity and identification of potential compounds from the chloroform extract of the medicinal plant *Cyathia nilgirensis* Holttum. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [interaktyvus]. 2017, 1167–1184 [žiūrėta 2021-05-26]. DOI: 10.20959/wjpps20177-9516.
181. ZHANG, Shuwu, et al. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [interaktyvus]. 2018, **147**, 59–66 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 0048-3575. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.006>.
182. KIM, Cho Rong, et al. Erucamide from Radish Leaves Has an Inhibitory Effect Against Acetylcholinesterase and Prevents Memory Deficit Induced by Trimethyltin. *Journal of medicinal food* [interaktyvus]. 2018, **21**(8), 769–776 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1557-7600. DOI: 10.1089/jmf.2017.4117.
183. CUIYING, Qin, et al. Study on the Mechanism of Erucamide Mediating Anti-stress Liver Injury in Rats by Inhibiting Glycine Cleavage. *Research Square* [interaktyvus]. 2021 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 2693-5015. DOI: 10.21203/rs.3.rs-148552/v1.
184. KUPSTYTE, Nora, et al. Effect of clinical factors and gene polymorphism of CYP2C19*2, *17 and CYP4F2*3 on early stent thrombosis. *Pharmacogenomics* [interaktyvus]. 2015, **16**(3), 181–189 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1744-8042. DOI: 10.2217/pgs.14.165.
185. DE JONG, Laura M, et al. Distinct Effects of Inflammation on Cytochrome P450 Regulation and Drug Metabolism: Lessons from Experimental Models and a Potential Role for Pharmacogenetics. *Genes* [interaktyvus]. 2020, **11**(12), 1509 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 2073-4425. DOI: 10.3390/genes11121509.
186. JIANG, Yunyao, et al. Circulating MicroRNA Profiles Differ between Hyperglycemia and Euglycemia in Coronary Heart Disease Patients. *BioMed research international* [interaktyvus]. 2017, **2017**, 9192575 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 2314-6141. DOI: 10.1155/2017/9192575.
187. FIEDLER, Jan, et al. MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation* [interaktyvus]. 2011, **124**(6), 720–730 [žiūrėta 2021-05-26]. ISSN 1524-4539. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.039008.

Publikacijų sąrašas

Mokslinių tyrimų rezultatų skelbimas konferencijose

1. Venckytė U. et. al. Sacubitril / valsartan metabolism in HUVEC cells. In: *Studentų mokslinės konferencijos „Chemija ir cheminė technologija 2021“ pranešimų medžiaga: respublikinė studentų mokslinė konferencija, 2021 05 14 / rinkinio sudarytojai: T. Dambrauskas, G. Kručaitė, D. Sinkevičiūtė; Kauno technologijos universitetas. Cheminės technologijos fakultetas. Kaunas: Kauno technologijos universitetas. 2021. p. 190.*
2. Venckytė U. et. al. Sacubitril / valsartan metabolism in HUVEC cells. In: *15th international scientific conference "The vital nature sign", May 20-21, 2021, Kaunas, Lithuania: abstract book / editors: A. Maruška, N. Tiso, V. Kaškonienė, M. Stankevičius. Kaunas: Vytauto Didžiojo universitetas. 2021. p. 89.*

Priedai

1 priedas. Tyrime naudotos medžiagos, jų laikymo sąlygos ir gamintojai

Medžiaga	Laikymo sąlygos	Gamintojas
HUVEC ląstelės	Šaldiklyje, -80 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Terpė HUVEC ląstelių linijai (angl. <i>Medium 200</i>)	Šaldytuve, +4 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Terpės priedas HUVEC ląstelių linijai (angl. <i>Large Vessel Endothelial Supplement (LVES) (50X)</i>)	Šaldiklyje, -20 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
HepG2 ląstelių linija	Šaldiklyje, -80 °C temperatūroje	-
Dulbeko modifikuota Iglis terpė (DMEM) (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Šaldytuve, +4 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Terpės priedas – veršiuko embriono serumas (FBS) (angl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)	Šaldiklyje, -20 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Penicilino-streptamicino antibiotikų mišinys (<i>Penicillin-Streptomycin</i>) (10 000 U/ml)	Šaldiklyje, -20 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Natrio chlorido 0,9 proc. infuzinis tirpalas (angl. <i>Sodium Chloride B. Braun</i>)	Kambario temperatūroje	<i>B. Braun Melsungen AG</i> , Vokietija
Tripsinas (angl. <i>TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red</i>)	Kambario temperatūroje, laminare	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) (angl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)	Kambario temperatūroje, laminare; šaldytuve, +4 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Tripiano mėlis (angl. <i>Trypan Blue Solution, 0,4 %</i>)	Kambario temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Terpė transfekcijai liposomomis (angl. <i>Opti-MEM™ Reduced Serum Medium</i>)	Šaldytuve, +4 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Lipofektaminas (angl. <i>Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent</i>)	Šaldytuve, +4 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
miRNR hsa-miR-24-3p imitatorius (angl. <i>mirVana miRNA hsa-miR-24-3p Mimic</i>)	Šaldiklyje, -20 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV
Lizės buferis (angl. <i>Lysis/Binding Buffer</i>)	Šaldytuve, +4 °C temperatūroje	<i>ThermoFisherScientific</i> , JAV

2 priedas. Sakubitrilo, M1 metabolito ir 13-dokosenamido sulaikymo laikai nustatyti HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo laikas, min		
	Sakubitrilas	M1 (sakubitrilatas)	13-dokosenamidas
Kontrolė	-	-	8,61
0,05 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,38	5,55	8,51
0,1 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,37	5,56	8,60
0,25 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,37	5,57	8,63
0,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,36	5,55	8,64
1 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,36	5,54	8,63
2,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,37	5,54	8,62
5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,37	5,54	8,63
Vidutinis junginių sulaikymo laikas:	6,37	5,55	8,61

3 priedas. Identifikuotų junginių sulaikymo laikai nustatyti HUVEC ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo laikas, min		
	Sakubitrilas	M1 (sakubitrilatas)	13-dokosenamidas
Kontrolė	-	-	8,65
0,05 μM sakubitrilas / valsartanas	-	5,51	8,62
0,1 μM sakubitrilas / valsartanas	6,37	5,40	8,62
0,25 μM sakubitrilas / valsartanas	6,33	5,53	8,64
0,5 μM sakubitrilas / valsartanas	6,36	5,53	8,62
1 μM sakubitrilas / valsartanas	6,34	5,66	8,63
2,5 μM sakubitrilas / valsartanas	6,43	5,65	-
5 μM sakubitrilas / valsartanas	6,36	-	8,63
Vidutinis junginių sulaikymo laikas:	6,37	5,55	8,63

4 priedas. Sakubitrilo ir M1 metabolito sulaikymo laikai nustatyti HepG2 ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo laikas, min	
	Sakubitrilas	M1 (sakubitrilatas)
Kontrolė	-	-
0,05 μ M sakubitrilas / valsartanas	-	-
0,1 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,55	-
0,25 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,55	-
0,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,56	5,75
1 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,52	5,75
2,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,56	5,75
5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,56	5,74
Vidutinis junginių sulaikymo laikas:	6,55	5,75

5 priedas. 13-dokosenamido sulaikymo laikai nustatyti HepG2 ląstelių lizatų mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo laikas, min
	13-dokosenamidas
Kontrolė	9,23
0,05 μ M sakubitrilas / valsartanas	9,15
0,1 μ M sakubitrilas / valsartanas	9,16
0,25 μ M sakubitrilas / valsartanas	9,17
0,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	9,26
1 μ M sakubitrilas / valsartanas	9,22
2,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	9,24
5 μ M sakubitrilas / valsartanas	9,24
Vidutinis junginių sulaikymo laikas:	9,21

6 priedas. Sakubitrilo ir jo aktyvaus metabolito sulaikymo laikai nustatyti transfekuotų HUVEC ląstelių terpių mėginiuose UPLC-TQD-MS metodu

Vaisto koncentracija	Sulaikymo laikas, min			
	Sakubitrilas		M1 (sakubitrilas)	
	Kontrolė	Tiriamasis mėginys (su hsa-miR-24-3p)	Kontrolė	Tiriamasis mėginys (su hsa-miR-24-3p)
0,05 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,13	6,14	5,26	5,29
0,5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,14	6,14	5,29	5,29
5 μ M sakubitrilas / valsartanas	6,14	6,16	5,26	5,30
Vidutinis junginių sulaikymo laikas:	6,14	6,15	5,27	5,29