

Latvijas Universitāte
Medicīnas fakultāte

**UZ MITOHONDRIJEM MĒRĶĒTU VIELU NEIRO-,
KARDIO- UN HEPATOPROTEKTĪVIE EFEKTI ANTI-
HIV VIELU TOKSICITĀTES MODEĻOS**

Jolanta Pupure

Promocijas darbs

Promocijas darba vadītāja:
Prof., Dr. habil. med. Vija Kluša

Promocijas padomes priekšsēdētāja:
Prof., Dr. habil. med. Aija Žilēvica

Oficiālie recenzenti:

Satura rādītājs

Satura rādītājs.....	3
KOPSAVILKUMS	5
Darba koncepcija	6
Darba mērķis	6
Darba uzdevumi:.....	6
SAĪSINĀJUMI.....	8
Publikācijas par promocijas darba tēmu	10
1. IEVADS	13
1.1. Mitohondriju loma šūnas funkcionēšanā	13
1.2. Anti-HIV preparāti kā mitohondrijus bojājošas vielas	15
1.3. Mitohondrijus regulējošas vielas	18
1.3.1. Mildronāts	18
1.3.2. Cerebrokrasts	19
1.3.3. Glutapirons.....	20
1.3.4. Tauopirons	20
1.4. Audu bojājumu marķieri	22
1.4.1. Kodola faktors kappa B	23
1.4.2. Inducējamā slāpekļa oksīda sintāze (iNOS)	25
1.4.3. Citohroma c oksidāze.....	25
1.4.4. Kaspāze-3.....	26
1.4.5. Šūnas apoptozes jutības proteīns	26
1.4.6. Glijas fibrilārais skābais proteīns.....	27
2. MATERIĀLI UN METODES	28
2.1. Reaktīvi un aparatūra	28
2.2. Dzīvnieki.....	30
2.3. Laboratorijas dzīvnieku ētika.....	30
2.4. Izolētu mitohondriju funkciju pētījumi	30
2.4.1. Žurku aknu mitohondriju izolēšana	30
2.4.2. Elpošanas parametru mērījumi	32
2.4.3. Mitohondriālā transmembrānas potenciāla mērījumi	32
2.4.4. Ca ²⁺ -inducētā mitohondriju iekšējās membrānas caurlaidības maiņa	33
2.4.5. Ūdeņraža peroksīda veidošanās	33
2.5. Eksperimenta plānojums <i>in vivo</i> vielu ievadīšanai	33
2.6. Imūnhistoķīmija	35
2.7. <i>Western Blot</i> analīze	36
2.8. Morfoloģija	37
2.8.1. Sirds morfoloģiskā izmeklēšana	37
2.8.2. Smadzeņu morfoloģiskā izmeklēšana.....	38
2.8.3. Aknu morfoloģiskā izmeklēšana.....	38
2.9. Statistika.....	39
3. REZULTĀTI.....	40
3.1. Mildronāta ietekme uz azidotimidīna radītām bioenerģētikas, ūdeņraža peroksīda veidošanās un kalcija izraisītas membrānas caurlaidības izmaiņām izolētos žurku aknu mitohondrijos (publikācija III)	40
3.2. Pētīto vielu ietekme uz anti-HIV vielu izraisītajām imūnhistoķīmiskām un morfoloģiskām izmaiņām peļu sirds audos <i>ex vivo</i>	42

3.2.1. Mildronāta efekti (publikācijas I, II, VII)	42
3.2.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV).....	47
3.3. Pētīto vielu ietekme uz anti-HIV vielu izraisītajām izmaiņām peļu smadzeņu audos <i>ex vivo</i> (imūnhistoķīmiskās, <i>Western blot</i> un morfoloģiskās metodes).....	49
3.3.1. Mildronāta efekti (publikācijas VI un VII).....	49
3.3.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV).....	52
3.4. Mildronāta ietekme uz anti-HIV vielu izraisītajām imūnhistoķīmiskām un morfoloģiskām izmaiņām peļu aknu audos <i>ex vivo</i> (publikācijas V un VII).....	53
4. DISKUSIJA	56
4.1. Mildronāta mitohondrijus protektējošie efekti <i>in vitro</i> (publikācija III)	56
4.2. Pētīto vielu kardioprotektīvie efekti (publikācijas I, II un IV)	58
4.2.1. Mildronāta efekti (publikācijas I un II).....	58
4.2.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV).....	61
4.3. Pētīto vielu neiroprotektīvie efekti (publikācijas IV, VI)	63
4.3.1. Mildronāta efekti (publikācija VI)	63
4.3.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV).....	67
4.4. Mildronāta hepatoprotektīvais efekts (publikācija V)	68
Vispārējie secinājumi	69
SECINĀJUMI	70
PATEICĪBAS.....	72
LITERATŪRAS SARAKSTS	73

KOPSAVILKUMS

Mitohondriju bojājumi ir iekaisuma, aterosklerozes, 2. tipa diabēta, neirodeģeneratīvu – Parkinsona, Alcheimera un citu slimību pamatā. Arī anti-HIV vielas izraisa mitohondriju toksicitāti. Mitohondriju protekcija ir šūnas normālai funkcionēšanai absolūti nepieciešama, un mitohondriju aizsargāšana var kļūt kā jauns mērķis (*target*) dažādu patoloģiju profilaksē un ārstēšanā.

Šajā darbā pētījām modeļvielas – mildronātu (aza-butirobetaīna klase), cerebrokrastu, glutapironu un taupironu (1,4-dihidropiridīnu atvasinājumi), kas iepriekšējos pētījumos uzrādījuši spējas iedarboties uz mitohondriālajiem procesiem. Kā toksiskās modeļvielas, kas izraisa mitohondriju disfunkciju, ievadījām anti-HIV preparātus: azidotimidīnu, stavudīnu, lamivudīnu, indinavīru un efavirēnu. Noteicām žurku aknu mitohondriju funkcijas *in vitro* (mildronātam), kā arī peļu sirds, smadzeņu un aknu audos *ex vivo* morfoloģiskās izmaiņas un dažādu marķieru ekspresiju, kas liecina par iekaisumu (kodola faktors kappa Bp65, NF-κBp65; un inducējamā slāpekļa oksīda sintāze, iNOS), apoptozi (kaspāze-3 un šūnas apoptozes jutības proteīns, CAS), mitohondriju elpošanas ķēdes funkciju (citohroma c oksidāze) un glijas astrocītu reaktivitāti (glijas fibrilārais skābais proteīns, GFAP) ar imūnhistoķīmijas un *Western blot* metodēm.

Rezultāti rāda, ka visizteiktākos bojājumus žurku aknu izolētos mitohondrijos un peļu sirds, smadzeņu un aknu audos izraisīja azidotimidīns. Pirmo reizi esam parādījuši, ka mildronāts (5-10 mM) *in vitro* spēj pasargāt mitohondrijus no azidotimidīna izraisītās toksicitātes kompleksa I līmenī, kas liecina par mitohondrijiem kā mildronāta darbības šūnas mērķi. Mildronāts (50, 100 un 200 mg/kg devās) un cerebrokrasts (0,1 mg/kg) pēc divu nedēļu intraperitoneālas (i.p.) ievadīšanas pelēm uzrādīja protektīvu pretiekaisuma un anti-apoptotisku darbību un novērsa azidotimidīna izraisītās morfoloģiskās izmaiņas sirds, smadzeņu un aknu audos. Mildronāts daļēji novērsa stavudīna un lamivudīna izraisītās morfoloģiskās pārmaiņas sirds audos, kā arī efavirēna izraisīto toksicitāti smadzeņu audos. Savukārt glutapironam un taupironam (abi 1 mg/kg) novērojām duālu darbību – gan pretapoptotisku un pretiekaisuma, gan apoptozi un iekaisuma veicinošu.

Iegūtie dati liecina par mildronāta un cerebrokrasta vērā ņemamiem citoprotektīviem efektiem, kuri īpaši izteikti mildronātam, preventējot neiroiekaisumu

un neuroapoptotiskos procesus, kas šajā darbā parādīti pirmo reizi. Lai arī mildronāts un cerebrokrasts ir dažādu struktūru savienojumi, tos, acīmredzot, var uzskatīt par mazām molekulām (*small molecules*), kuru farmakofori (piem., pozitīvi lādēts slāpekļis) nodrošina šūnas signalizācijas procesu regulāciju, galvenokārt stabilizējot ar mitohondriju funkcijām saistīto šūnas dzīvotspēju. Pētītās mazās molekulas, īpaši mildronāts, kurš uzrāda visstabilāko un izteiktāko efektu, var kalpot kā prototipi turpmākam jauna tipa anti-neirodeģeneratīvu preparātu dizainam.

Darba koncepcija

Mitohondriju disfunkcija izraisa apoptozes un iekaisuma procesu attīstību, kas noved pie šūnu deģenerācijas un bojāejas, radot sirds, smadzeņu un aknu slimības. Tādējādi mitohondriju protekciju un līdz ar to šūnas bojāejas apturēšanu jau agrīnā stadijā var uzskatīt par jaunu farmakoterapijas stratēģiju šo slimību profilaksē un ārstēšanā.

Darba mērķis

Noskaidrot dažādu struktūru mazo molekulu – mildronāta, cerebrokrasta, glutapirona un tauropirona – citoprotektīvo darbību žurku aknu izolētos mitohondrijos (mildronātam) un peļu audu *ex vivo* līmenī kardio-, neuro- un hepatotoksicitātes modeļos, kas radīti ar mitohondriju toksicitāti izraisošām anti-HIV vielām (azidotimidīnu, stavudīnu, lamivudīnu, indinavīru un efavirēnu).

Darba uzdevumi:

1. *In vitro* izolētos žurku aknu mitohondrijos: noteikt azidotimidīna, mildronāta un šo vielu kombinācijas tiešo ietekmi uz mitohondriju bioenerģētiku, transmembrānas potenciālu, Ca^{2+} inducēto mitohondriju membrānas caurlaidības maiņu un ūdeņraža peroksīda veidošanos.
2. *In vivo* pētījumos pēc pētāmo un toksisko vielu divu nedēļu ievadīšanas intraperitoneāli (i.p.) pelēm un to sakrifikācijas audos *ex vivo* ar imūnhistoķīmiskām un *Western blot* metodēm noteikt:

- 2.1. mildronāta, cerebrokrasta, glutapirona, tauropirona ietekmi uz iekaisuma marķiera – kodola faktora kappa Bp65 (NF-κBp65) – pozitīvo šūnu skaita izmaiņām sirds audos;
 - 2.2. mildronāta ietekmi uz azidotimidīna izraisītajām izmaiņām mitohondriālo funkciju marķiera citohroma c oksidāzes ekspresijā smadzeņu audos;
 - 2.3. pētāmo vielu ietekmi uz apoptozes marķiera kaspāzes-3 ekspresiju sirds, smadzeņu un aknu audos;
 - 2.4. mildronāta ietekmi uz glijas šūnu astrocītu marķiera – glijas fibrilārā skābā proteīna (GFAP) ekspresiju smadzeņu audos;
 - 2.5. mildronāta ietekmi uz iekaisuma marķiera iNOS un apoptozes marķiera CAS ekspresiju smadzeņu audos.
3. Novērtēt morfoloģisko ainu peļu sirds, smadzeņu un aknu audos *ex vivo* pētījumos pēc pētāmo un toksisko vielu divu nedēļu i.p. ievadīšanas.

SAĪSINĀJUMI

ADP – adenoindifosfāts

ADP/O – adenoindifosfāts/ skābeklis koeficients

AIF – apoptozi inducējošais faktors

AIDS – iegūtais imūndeficīta sindroms

AMP – adenoīnmonofosfāts

ATP – adenoīntrifosfāts

BSA – vērša seruma albumīns

CAS – šūnas apoptozes jutības proteīns (*cellular apoptosis susceptibility protein*)

CPT-1 – karnitīn-palmitoltransferāze-1

DAB – diaminobenzidīns

DHP – 1,4-dihidropiridīni

FCCP – p-trifluorometoksifenilhidrazons

FMN – flavīna mononukleotīds

GBB – gamma-butirobetaīns

GFAP – glijas fibrilārais skābais proteīns

GSH – glutations (reducētā forma)

HAI – histoloģiskās aktivitātes indekss

HB – homogenizācijas buferis

HEB – hemato-encefāliskā barjera

H₂O₂ – ūdeņraža peroksīds

HIV – cilvēka imūndeficīta vīruss

ICAM-1 – intracelulārā adhēzijas molekula 1

IKK – inhibitorā kapa B kināze

iNOS – inducējamā slāpekļa oksīda sintāze

I-κB – inhibitorais kapa B

LDH – laktātdehidrogenāze

MB – mazgāšanas buferis

MPP⁺ – 1-metil-4-fenilpiridīns

MPT – mitohondriju membrānas caurlaidības maiņa

mtDNS – mitohondriālā dezoksiribonukleīnskābe

NADH – nikotīnamīda adenīna dinukleotīds
NF- κ B – kodola faktors kapa B
NO – slāpekļa oksīds
NRTI – nukleozīdu analogu reversās transkriptāzes inhibitors
NNRTI – ne-nukleozīdu analogu reversās transkriptāzes inhibitors
O₂^{•-} – superoksīda radikālis
OCTN2 – organisko katjonu transportieris
ONOO⁻ – peroksinitrīts
PI – proteāzes inhibitors
RCR – elpošanas kontroles koeficients (*respiratory control ratio*)
ROS – reaktīvie skābekļa savienojumi
TNF- α – tumora nekrozes faktors alfa
TPP⁺ – tetrafenilfosfonijs
tRNS – transporta ribonukleīnskābe
 $\Delta\Psi$ – mitohondriālais transmembrānas potenciāls

Publikācijas par promocijas darba tēmu

- I. Klusa V., Pupure J., Isajevs S., Rumaks J., Gordjushina V., Kratovska A., Taivans I., Svirskis S., Viksna L., Kalvinsh I. Protection of azidothymidine-induced cardiopathology in mice by mildronate, a mitochondria-targeted drug. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2006 Oct; 99(4): 323-328
- II. S. Isajevs, J. Pupure, V. Gordjushina, A. Kratovska, I. Taivans, L. Viksna, I. Kalvinsh, V. Klusa. Mildronate protects cardiopathy caused by stavudine and lamivudine. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B*, Vol. 60 (2007), No. 1/2 (648/649), pp. 26-32
- III. J. Pupure, M.A.S. Fernandes, M.S. Santos, A.J.M. Moreno, I. Kalvinsh, V. Klusa, C.R. Oliveira. Mitochondria as the target for mildronate's protective effects in azidothymidine (AZT)-induced toxicity of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biochemistry and Function*, 2008 Sep-Oct;26(5):620-631
- IV. Pupure J., Isajevs S., Gordjushina V., Taivans I., Rumaks J., Svirskis S., Kratovska A., Dzirkale Z., Pilipenko J., Duburs G., Klusa V. Distinct influence of atypical 1,4-dihydropyridine compounds in azidothymidine-induced neuron- and cardiotoxicity in mice *ex vivo*, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2008 Nov; 103(5): 401-406
- V. J. Pupure, S. Isajevs, A. Kratovska, V. Gordjushina, I. Taivans, J. Rumaks, D. Svirina, L. Viksna, I. Kalvinsh, V. Klusa. Mildronate protects from azidothymidine-induced hepatotoxicity in mice liver. *LU Raksti*, 2009, 750. sēj., 160.-170. lpp.
- VI. J. Pupure, S. Isajevs, E. Skapare, J. Rumaks, S. Svirskis, D. Svirina, I. Kalvinsh, V. Klusa. Neuroprotective properties of mildronate, a mitochondria-targeted small molecule. *Neuroscience Letters*, 2010, 470(2): 100-105.
- VII. J. Pupure, S. Isajevs, I. Kalvinsh, V. Klusa. Effects of mildronate in indinavir- and efavirenz-induced toxicity in mice. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, *accepted*

Patenti par promocijas darba tēmu:

1. V.Kluša, S.Isajevs, J.Pupure, J.Rumaks, V.Gordjušina, I.Taivans, I.Kalviņš. “Farmaceitiskā kompozīcija uz apgrieztās transkriptāzes inhibitora un meldonija bāzes”, Pat.Nr. P-05-95, prioritāte no 15.08.05.
2. V.Kluša, J.Pupure, S.Isajevs, J.Rumaks, V.Gordjušina, I.Taivans, Š.Svirskis, E.Bisenieks, J.Poikans, J.Uldriķis, G.Duburs, B.Vīgante. “1,4-dihidropiridīnu atvasinājumi kā antitoksiskas piedevas HIV infekciju ārstēšanas procesos ar azidotimidīnu”. Pat.Nr. P-05-154, prioritāte no 29.11.05.
3. J.Pupure, V.Kluša, I.Kalviņš, M.A.S.Fernandes, M.S.Santos, A.J.M.Moreno, C.R.Oliveira. “Farmaceitiska kompozīcija mitohondriju kompleksa I protekcijai pret ksenobiotiku izsauktiem bojājumiem”, Patenta pieteikuma Nr. P-07-103, prioritāte no 20.09.07.

Tēzes par promocijas darba tēmu:

1. Pupure J., Isajevs S., Rumaks J., Gordjusina V., Taivans I., Viksna L., Svirskis S., Kalvinsh I., Duburs G., Jansone B., Klusa V. Mildronate, cerebrocrast and glutapyrone as highly active cardioprotectors in the AZT-induced cardiomyopathy in mice. East-European Symposium « Central and Peripheral Synaptic Transmission », dedicated to the 80th Anniversary of Prof. M. Papasova.Oct.5-9, 2005, Varna, Bulgaria; Autonomic and Autacoid Pharmacology, January 2006; 26(1): p105.
2. Rumaks J., Pupure J., Isajevs S., Gordjusina V., Taivans I., Viksna L., Svirskis S., Kalvinsh I., Duburs G., Jansone B., Klusa V. Comparative studies of cerebrocrast, glutapyrone and mildronate in azt-induced neurotoxicity in mice. East-European Symposium « Central and Peripheral Synaptic Transmission », dedicated to the 80th Anniversary of Prof. M. Papasova.Oct.5-9, 2005, Varna, Bulgaria, Autonomic and Autacoid Pharmacology 2006, 26 (1): p106.
3. J. Pupure, I. Kalviņš, V. Kluša. Protective effects of mildronate in zidovudine-induced cardio- and neuropathology in mice. Rīgas Stradiņa Universitāte. Pirmā Baltijas jūras reģiona studentu zinātniskā konference medicīnas zinātnē. 21-22 aprīlis, 2006, Rīga, Latvija; Tēžu grāmata, Rīga: RSU 2006, 16-17 lpp.
4. Klusa V., Isajevs S., Pupure J., Rumaks J., Gordjusina V., Svirskis S., Taivans I., Meirena D., Duburs G., Kalvins I. Protective effects of novel drugs in AZT-induced cradiopathology in mice. XVth IUPHAR Congress “The Pharmacology in the 21st century: A Bridge between Past and the New Molecular Frontiers”, July 2-7, 2006, Beijing, China. Acta Pharmacologica Sinica 2006 July: 27 Supplement 1: 1-489, P240007.
5. J. Pupure, S. Isajevs, V. Gordjušina, J. Rumaks, V. Kluša, Š. Svirskis, L. Viksna, I. Kalviņš, G. Duburs. Protection strategies of AZT-induced neurotoxicity in mice by mitochondria-targeted drugs. Central/East European CINP Regional Meeting, October 5-7, 2006, Tallin, Estonia. Book of Abstracts, Tartu University Press 2006, p60.
6. J. Pupure, G. Duburs, V. Klusa. Different effects of atypical 1,4-dihydropyridines in AZT-induced cardiotoxicity. 2nd Baltic Sea Region

- Conference in Medical Sciences, Kaunas, Lithuania, May 11-12, 2007. Abstract Book, p24.
7. J. Pupure, S. Isajevs, J. Rumaks, V. Klusa, G. Duburs. Anti-apoptotic effects of atypical 1,4-dihydropyridines in azidothymidine-induced neurotoxicity. 7th IBRO World Congress of Neuroscience, Melbourne, Australia, July 12-17, 2007. Abstract Book, POS-FRI-090, p119.
 8. V. Klusa, S. Isajevs, L. Klimaviciusa, J. Pupure, J. Rumaks, S. Svirskis, G. Duburs. Anti-inflammatory and anti-apoptotic action of atypical 1,4-dihydropyridine compounds in neurotoxicity models. 21st European Congress of Pathology, Sept.8-13, 2007, Istanbul, Turkey. *Virchow's Archiv*, 2007, 451, No.2, p239.
 9. J. Pupure, M.A.S. Fernandes, C.R. Oliveira, A.J.M. Moreno, M.S. Santos, I. Kalvinsh, V. Klusa. Mitochondria regulating effects of mildronate in azidothymidine-induced toxicity. 3rd Meeting of Russian Pharmacologists, St.Petersburg, Russia, September 24-27, 2007. Abstract Book "Фармакология - практическому здравоохранению", 2007, v.7, 2-1911.
 10. J. Pupure, S. Isajevs, M.A. S. Fernandes, J. Rumaks, V. Klusa, I. Kalvinsh. Mitochondria-targeted neuroprotective effects of mildronate. First Joint Congress of GCNN and SSNN. 5th Global Conference on Neuroprotection and Neuroregeneration. 4th Congress of Society for the Study of Neuroprotection and Neuroplasticity. Bucharest, Romania, March 3-7, 2008. Abstract Book, p94.
 11. V. Klusa, J. Pupure, S. Isajevs, J. Rumaks, S. Svirskis, I. Kalvinsh. Neuroprotective action of mildronate in anti-HIV drug-induced toxicity models in vivo. Congress of the Federation of European Pharmacological Societies, Manchester, UK, 13-17 July, 2008, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, Vol. 22, Suppl. 2, p91.

1. IEVADS

1.1. Mitohondriju loma šūnas funkcionēšanā

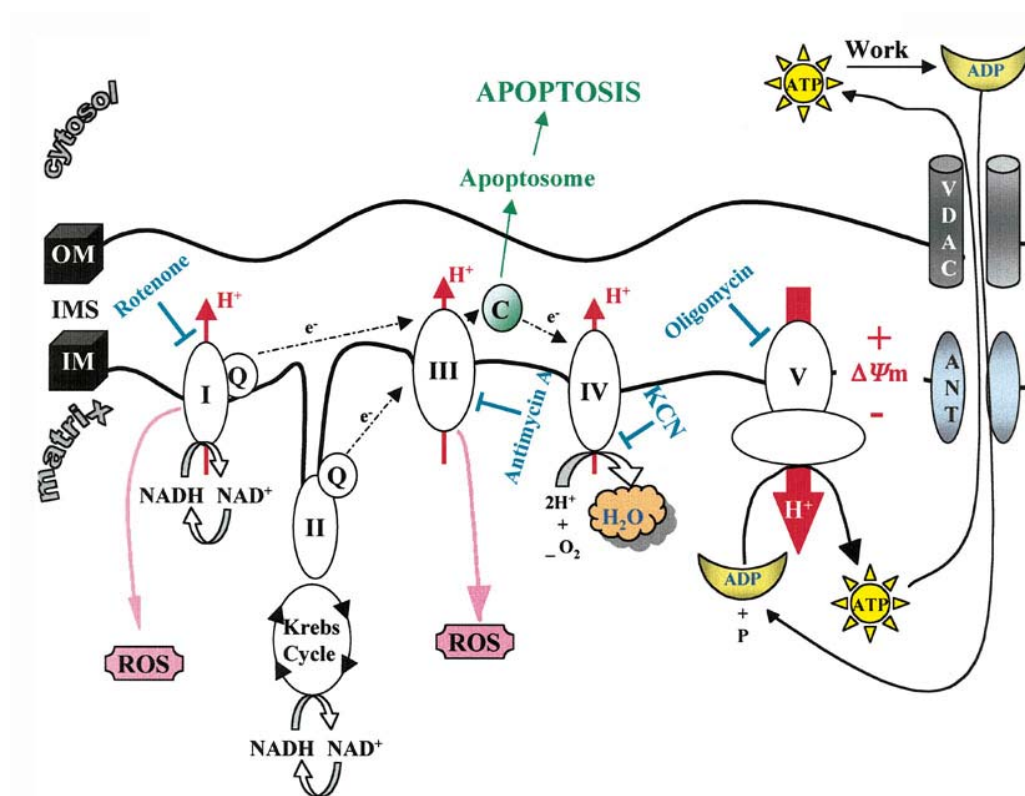
Pēdējā desmitgadē priekšstats par mitohondriju lomu šūnas funkcionēšanā ir kardināli mainījies, ietverot procesus no enerģijas nodrošināšanas un šūnas cikla regulācijas līdz proliferācijai un apoptozei (Cadenas, 2004; Chernyak et al., 2004). Turklāt tiek runāts par jaunām farmakoloģiskām stratēģijām, kas vērstas tieši uz mitohondriju funkciju regulēšanu un uzlabošanu (DiMauro and Mancuso, 2007). Mitohondriji ir kā svarīgs šūnas brīvo radikāļu avots, kā galvenais mērķis brīvo radikāļu modulējošajām un toksiskajām darbībām un kā galvenais avots signālmolekulām, kuras komandē šūnas ciklu, proliferāciju un apoptozi (Cadenas, 2004). Turklāt iekšējās membrānas potenciāls un selektīvā caurlaidība ar tās uni-porta un anti-porta sistēmām nodod signālus šūnas cikla un apoptozes procesos iesaistītajiem bioķīmisko un ģenētisko sistēmu regulatorajiem proteīniem (Cadenas, 2004). Mitohondriju elpošanā adenozinādifosfāts (ADP) regulē mitohondriju elektronu plūsmas un elpošanas parametrus. Stāvokļa-4 elpošana notiek tad, kad ir pieejams elpošanas substrāts, bet ne ADP (elpošana miera stāvoklī), savukārt stāvokļa-3 elpošana (aktīvā elpošana) jeb maksimālā fizioloģiskā proporcija ATP ražošanai un skābekļa patēriņam notiek tad, kad pieejams gan substrāts, gan ADP (Cadenas, 2004). Mitohondriji producē ūdeņraža peroksīdu (H_2O_2) kā blakus produktu elektronu noplūdes rezultātā (Cadenas, 2004). H_2O_2 veidošanās mitohondrijos darbojas kā potenciāls oksidēšanās–reducēšanās reakciju signāls, kas atgriezeniski var aktivēt dažādus proteīnus, ietekmējot arī transkripciju, translāciju vai mitohondriju komponentu degradāciju (Murphy, 2009). Pētījumi parādījuši, ka izolēti mitohondriji veido H_2O_2 , kas savukārt veidojas no superoksīda ($O_2^{\cdot-}$) dismutācijām mitohondrijos (Loschen et al., 1971; Boveris and Chance, 1973). Mitohondriju galvenie reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) veidošanās avoti ir mitohondriālie elpošanas ķēdes kompleksi I un III (Chen et al., 2003). Zīdītāju mitohondriju komplekss I kalpo kā elektronu ieejas vieta no reducētā nikotīnamīda adenīna dinukleotīda (NADH) uz elpošanas ķēdi (Sazanov, 2007). Inhibējot kompleksu I ar rotenonu, palielinās ROS veidošanās mitohondrijos, kas palielinās vēl vairāk, ja tiek oksidēti kompleksa I vai kompleksa II substrāti kompleksa III inhibitora antimicīna A klātbūtnē (Chen et al., 2003). Izolētos mitohondrijos komplekss I NADH klātbūtnē veido $O_2^{\cdot-}$, un rotenons tā

veidošanos palielina, piesaistoties koenzīma Q saistīšanās vietai (Murphy, 2009). Izolētā kompleksā I veidojas $O_2^{\cdot-}$ no skābekļa reakcijas ar flavīna mononukleotīdu (FMN), kas ir pilnībā reducēts (Murphy, 2009). Interesanti ir arī tas, ka $O_2^{\cdot-}$ veidošanos kompleksā I vairāk ietekmē pH gradienta, nevis membrānas potenciāla izmaiņas (Lambert and Brand, 2004). Komplekss III pārnes elektronus no koenzīma Q uz citohromu c, un, kad to inhibē ar antimicīnu A, komplekss veido lielu $O_2^{\cdot-}$ daudzumu (Murphy, 2009). $O_2^{\cdot-}$ vai H_2O_2 veidošanās izolētos elpošanas ķēdes kompleksos vai mitohondrijos palielinās arī apstākļos, kad skābekļa koncentrācija pārsniedz normālo atmosfēras skābekļa 21% līmeni, turklāt šī palielināšanās ir aptuveni proporcionāla skābekļa koncentrācijai (Boveris and Chance, 1973). Nosakot ūdeņraža peroksīda daudzumu izolētos mitohondrijos jāņem vērā vairāki faktori. Pirmkārt, ne vienmēr viss $O_2^{\cdot-}$ konvertējas par H_2O_2 *in vivo* (Murphy, 2009). Otrkārt, no mitohondrijiem izplūstošā H_2O_2 mērījumi ir atkarīgi no tā H_2O_2 , kas veidojas starpmembrānu telpā un ārējā membrānā (Murphy, 2009). Un treškārt, ne viss H_2O_2 , kas veidojas mitohondriju matiksā, tiek izvadīts no mitohondrijiem, jo daļu neitralizē matiksā peroksīdāzes (Murphy, 2009).

Mitohondriju elpošanas ķēde (1. attēls), kas atrodas uz mitohondriju iekšējās membrānas, ir viens no galvenajiem reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) avotiem. Tādējādi metabolīti – $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , slāpekļa oksīds (NO) un peroksinitrīts (ONOO⁻), kas veidojas mitohondrijos, darbojas kā pro-oksidanti, veicinot oksidatīvo stresu (Cadenas, 2004). ROS veicina tādus patoloģiskus procesus kā novecošanos (Herrero & Barja, 1997), apoptozi (Kumar et al., 2002) un šūnas bojājumus išēmijas/reperfūzijas laikā (Lesnefsky et al., 2001). Mitohondriju mediētā apoptoze izpaužas kā membrānas potenciāla zudums, mitohondriju disfunkcija, mitohondriju membrānas caurlaidības maiņas (*Mitochondrial Premeability Transition*, MPT) poru atvēršanās un citohroma c izdalīšanās (Kroemer et al., 1998). Mūsdienās tiek uzskatīts, ka mitohondriji kā brīvo radikāļu mediēto bojājumu mērķi piedalās arī daudzu slimību, to skaitā iekaisuma, aterosklerozes, cistiskās fibrozes, hipertenzijas, vēža, 2. tipa diabēta, Parkinsona, Alcheimera un citu neirodeģeneratīvu saslimšanu patoģenēzē (Jezek & Hlavata, 2005). Arī cilvēka imūndeficīta vīruss (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) un anti-HIV terapija slimniekiem izraisa toksiskus efektus, kas skar visus šūnas procesus, to skaitā arī mitohondriju funkcijas. Galvenais anti-HIV preparātu “mērķis” šūnā ir mitohondriji, kuru struktūrās un funkcijās

veidojas neatgriezeniskas izmaiņas. Visbīstamākie mitohondriālie bojājumi rodas sirds muskulī, taču bojāti tiek arī citi audi.

Mitohondrijus ir pamats uzskatīt par ļoti svarīgiem šūnas komponentiem, tādējādi to aizsargāšana vai funkciju normalizēšana uzskātāma par jaunu pieeju dažādu mitohondriālo slimību ārstēšanā.



1. attēls. Mitohondriju elektronu transporta ķēde. Uz iekšējās membrānas (IM) atrodas kompleksi I-V. Elektronu ieplūst ķēdē caur kompleksi I un II. Kompleksi I, III un IV sūknē protonus no matricas uz starpmembrānu telpu (IMS). Komplekss V pārvērš ADP par ATP, kurš nonāk citosolā caur adenīna nukleotīda transportieri (ANT) un voltāžas atkarīgo anjona kanālu (VDAC). $\Delta\Psi$, transmembrānas potenciāls. Kompleksi I un III ir galvenās reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) rašanās vietas. Kompleksu I inhibē rotenons, kompleksu III – antimicīns A, kompleksu IV – kālija cianīds (KCN), kompleksu V – oligomicīns (Ricci et al., 2003b).

1.2. Anti-HIV preparāti kā mitohondrijus bojājošas vielas

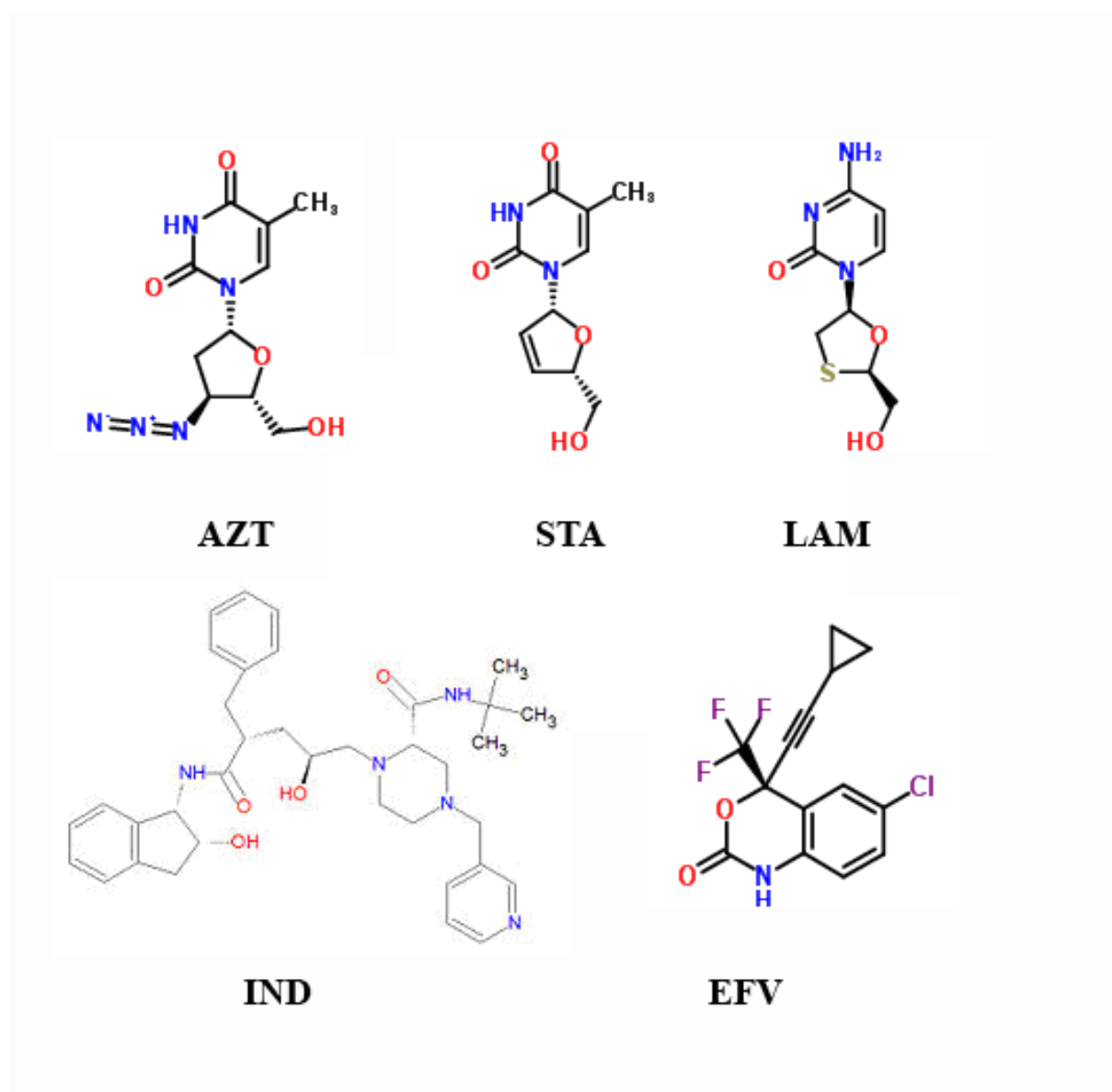
Šajā darbā kā mitohondrijus bojājošas modeļvielas izvēlējamies anti-HIV preparātus. Azidotimidīns (struktūra 2. attēlā) ir pirmais un viens no plašāk lietotajiem preparātiem AIDS (iegūtā imūndeficīta sindroma) ārstēšanā. Tas pieder nukleozīdu analogu reversās transkriptāzes inhibitoru (*Nucleoside Analogue Reverse*

Transcriptase Inhibitors, NRTI) zāļu vielu klasei, kuri inhibē virālās RNS transkripciju par virālo DNS. Azidotimidīns inhibē γ -polimerāzi, kas nodrošina HIV-1 mitohondriālās DNS (mtDNS) replikāciju (Lewis et al., 1994).

Lai azidotimidīns iegūtu antivirālo aktivitāti, to intracelulārās kināzes pārvērš par fosforilētiem anabolītiem, kuri kā ķēdes terminatori iedarbojas uz reversās transkripcijas (no RNS uz DNS) reakciju (Hong et al., 2000; De Clercq, 2002). Fosforilēti NRTI konkurē ar endogēnajiem deoksiribonukleotīdiem par inkorporāciju jaunizveidotajās DNS ķēdēs, tādējādi inhibējot γ -polimerāzi (Lee et al., 2003; Lewis, 2003). Tā kā γ -polimerāze ir nepieciešama mtDNS replikācijai, samazinās mtDNS, izmainās mitohondriālo oksidatīvās fosforilācijas enzīmu aktivitāte un mitohondriju morfoloģija (Petit et al., 2005). Azidotimidīns var radīt arī strukturālas muskuļu mitohondriju izmaiņas, kā piemēram, mitohondriju tūsku, pārrautas kristas un palielinātus mitohondrijus ar parakristālīna ieslēgumiem (Lamperth et al., 1991; De la Asuncion et al., 1998; Tolomeo et al., 2003; Lewis, 2003). Azidotimidīna terapija HIV pacientiem būtiski ietekmē skeleta muskuļu enerģijas metabolismu, samazinot maksimālās muskuļu darba spējas un tieši pārtraucot mitohondriju funkcijas, kas tad arī rada miopātijas (Sinnwell et al., 1995). Azidotimidīna inkorporācija mitohondrijos rada mtDNS un citohroma c bojājumus, oksidatīvās fosforilācijas enzīmu aktivitātes izmaiņas, ROS aktivāciju, kas noved pie anaerobās elpošanas un pienskābās acidozes (Badley et al., 2003; Fromenty et al., 2004), kuru izraisa ilgstoša NRTI lietošana (Tolomeo et al., 2003). ROS un lipīdu peroksidācijas produktu veidošanās izjauc elpošanas ķēdi, kas rada pozitīvo atgriezenisko saiti, producējot vēl vairāk ROS (Fromenty et al., 2004). Uzskata, ka oksidatīvais stress kalpo kā galvenais patofizioloģiskais šūnu bojājuma ceļš iegūtajā imūndeficīta sindroma gadījumā un tā ārstēšanā (Lewis, 2003). Stavudīns un lamivudīns (2. attēls), tāpat kā azidotimidīns, arī pieder NRTI klases preparātiem. Salīdzinot ar azidotimidīnu, stavudīnam un lamivudīnam ir mazāka kardiotoxicitāte, taču tie izraisa lipodistrofiju, palielinot aknu taukskābju oksidāciju un ketonģenēzi pelēm (Maisonneuve et al., 2004; Note et al., 2003). HIV pacientiem šie preparāti izraisa arī perifērās neiropātijas (Browne et al., 1993) un metaboliskos traucējumus (Carr et al., 2000).

Indinavīrs ir proteāzes inhibitors (*Protease Inhibitor*, PI, 2. attēls), savukārt efavirēns – ne-nukleozīdu reversās transkriptāzes inhibitors (*Non-Nucleoside Analogue Reverse Transcription Inhibitor*, NNRTI, 2. attēls). Iepriekšējos *in vitro*

pētījumos adipocītos indinavīrs pasliktināja mitohondriju funkcijas (Viengchareun et al., 2007), savukārt mioblastu šūnu līnijās kavēja proteīnu sintēzi, traucējot translācijas procesus (Hong-Brown et al., 2004). Efavirēns (2. attēls), pretēji citiem reversās transkriptāzes inhibitoriem, cilvēka hepatomas šūnu līnijā neizraisīja mitohondriju toksicitāti (Walker et al., 2002), taču bojāja aknu funkcijas (Kontorinis and Dieterich, 2003), un peļu smadzeņu audos inhibēja kreatīna kināzes aktivitāti, norādot uz centrālās nervu sistēmas toksicitāti (Streck et al., 2008).



2. attēls. Pētīto toksisko modeļvielu – azidotimidīna (AZT), stavudīna (STA), lamivudīna (LAM), indinavīra (IND) un efavirēna (EFV) struktūras.

1.3. Mitochondrijus regulējošas vielas

1.3.1. Mildronāts

Mildronāts pēc savas struktūras pieder pie aza-butirobetaīna klases savienojumiem (struktūra parādīta 3. attēlā). Mildronāts tiek plaši lietots sirds un asinsvadu sistēmas slimību ārstēšanā, jo tam ir izteikta kardioprotektīva darbība (Dambrova et al., 2002). Tāpēc liela daļa iepriekšējo pētījumu veikti tieši sirds audos un asinsvados, uzsverot mildronāta darbību, kas vērsta uz karnitīna koncentrācijas regulēšanu. Mildronāts darbojas arī kā gamma-butirobetaīna (GBB) hidroksilāzes konkurējošais inhibitors (Spaniol et al., 2001), tādējādi inhibējot GBB pārvēršanos par karnitīnu. Žurku aknu mitohondrijos mildronāts inhibē arī karnitīn-palmitoltransferāzi-1 (CPT-1). Uzskata, ka šī mildronāta aktivitāte pasargā mitohondrijus no garo ķēžu taukskābju detergentu iedarbības (Tsoko et al., 1995). Nesen parādīts, ka mildronāta ilgstoša ievadīšana izolētos sirds audos, samazinot karnitīna un palielinot GBB koncentrāciju, samazina infarkta izmēru (Liepinsh et al., 2006) un asins glikozes līmeni, palielinot glikozes transportiera 4 (GLUT4), heksokināzes II (HKII) un insulīna receptoru (INSR) proteīnu ekspresiju (Liepinsh et al., 2008). Mildronāta ilgstoša ievadīšana pelēm samazina aterosklerotisko bojājumu veidošanos aortā (Vilskersts et al., 2009).

Par mildronāta darbību uz centrālo nervu sistēmu līdz šim ir maz datu. Eksperimentos ar pelēm parādīta mildronāta aktivējošā ietekme uz uzvedību, pagarinot peldēšanas laiku piespiedu peldēšanas testā (Germane, 1991). Citi pētījumi liecina, ka mildronāta efekti varētu iet caur alternatīvu (ne karnitīna) mehānismu, kurā dominējošo lomu spēlē slāpekļa oksīda veidošanās žurku smadzeņu asins cirkulācijas traucējumu novēršanā (Sjakste et al., 2005).

Mildronāta netieša regulējoša iedarbība uz mitohondrijiem aprakstīta iepriekš, parādot, ka mildronāts normalizē udeņraža peroksīda (H_2O_2) izraisītās metaboliskās izmaiņas izolētā žurku sirdī (Akahira et al., 1997), kā arī palielina izoproterenola izraisīto samazināto sirds mitohondriju enzīmu aktivitāti (Hanaki et al., 1989). Taču tieša mildronāta iedarbība uz mitohondriālajiem procesiem – bioenerģētikas parametriem, H_2O_2 veidošanos un mitohondriju membrānas caurlaidības maiņu pirmo reizi ir parādīta šajā darbā.

1.3.2. Cerebrokrasts

Cerebrokrasts pieder pie 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumiem (3. attēls), taču atšķirībā no klasiskajiem dihidropiridīniem, kā piem., nifedipīns, kas pārstāv kalcija antagonistu sēriju, cerebrokrasts nav neironālais kalcija antagonists, jo žurku garozas sinaptosomās cerebrokrasts neietekmē Ca^{2+} atpakaļuzņemšanu (Klusa et al., 1992). Cerebrokrasts ir ļoti lipofīls savienojums un spēj penetrēt ne tikai hemato-encefālisko barjeru (HEB), bet arī plazmatiskās un organellu, tai skaitā mitohondriju membrānas (Klusa, 1995). Izolētos žurku skeleta muskuļu uzbriedušos mitohondrijos cerebrokrasts, atbildot uz ATP, izraisa palielinātu mitohondriju kontrakcijas intensitāti un amplitūdu, kā arī samazinātu endogēno elpošanas intensitāti, palielinātu sukcināta oksidācijas intensitāti un normalizētu oksidatīvo fosforilāciju (Vlena et al., 1997). Tādējādi cerebrokrasts spēj labvēlīgi ietekmēt mitohondriālos procesus. Smadzeņušūnu kultūrās cerebrokrasts būtiski samazina neirotoksīna un mitohondriju elpošanas ķēdes kompleksa I inhibitora 1-metil-4-fenilpiridīna (MPP^+) radīto šūnu nāvi, pasargā šūnas no MPP^+ radītās ROS pārprodukcijas un mitohondriju membrānas potenciāla zuduma (Klimaviciusa et al., 2007). Pētījumi rāda, ka cerebrokrasts izolētos žurku aknu mitohondrijos inhibē iekšējās membrānas anjonu kanālu, kā arī K^+/H^+ antiporta sistēmu, tādējādi nepieļaujot pārmērīgu kalcija atpakaļuzņemšanu mitohondrijos (Fernandes et al., 2003). Cerebrokrasts *in vitro* pētījumos spēj pasargāt smadzeņušūnu graudainās šūnas no glikozes un skābekļa deficīta radītajiem šūnu bojājumiem, samazinot LDH daudzumu, turklāt šis savienojums arī stimulē nenobriedušu smadzeņušūnu graudaino šūnu neirītu augšanu (Klimaviciusa et al., 2005).

Cerebrokrastam piemīt arī pretiekaisuma darbība, jo cilvēka monocītu THP-1 šūnu līnijās tas selektīvi inhibē neirotoksisko citokīnu – interleikīnu IL-1 β un IL-6 – sekrēciju (Klegeris et al., 2002). Tādējādi šis savienojums var regulēt iekaisuma intracelulāros citokīnu ceļus. Žurkām, ievadot cerebrokrastu 0,05 mg/kg perorāli un intraperitoneāli, novēro atmiņu stimulējošu efektu pat pēc 20 dienām pēc eksperimenta beigšanas (Klusa et al., 1992). Cerebrokrasts piedalās arī smadzeņu neiroķīmisko mehānismu balansā, jo palielina gan inhibējošā neurotransmitera gamma-aminosviestskābes, gan aktivējošā neurotransmitera noradrenalīna daudzumu (Klusa et al., 1992).

1.3.3. Glutapirons

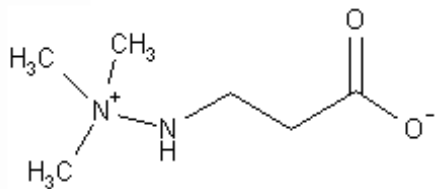
Glutapirons ir glutamātu saturošs 1,4-dihidropiridīna atvasinājums (3. attēls). Līdzīgi kā cerebrokrasts, glutapirons nav tipiskais kalcija antagonists, un savas struktūras dēļ tas ieguvis jaunas kvalitatīvas īpašības – tas ir hidrofilis un ļoti maztoksisks (LD_{50} *per os* pelēm ir $>10000\text{mg/kg}$) savienojums (Karpova et al., 1993). Izolētos žurku skeleta muskuļu uzbriedušos mitohondrijos glutapirons pretēji cerebrokrastam samazina mitohondriju kontrakcijas amplitūdu, atbildot uz ATP, taču tajā pašā laikā tas spēj novērst azidotimidīna izraisīto mitohondriju agregāciju (Velena et al., 1997). Eksperimentā smadzenīšu graudaino šūnu kultūrā glutapirons atšķirtībā no cerebrokrasta nespēj preventēt MPP^+ izraisītos bojājumus – šūnu nāvi, ROS produkciju un mitohondriju membrānas potenciāla zudumu (Klimaviciusa et al., 2007). Taču glutapirons pasargā smadzenīšu graudainās šūnas išēmijas un hipoksijas apstākļos *in vitro* (skābekļa un glikozes deprivācijas modelī) un stimulē neirītu augšanu, lai gan lielākās koncentrācijās nekā cerebrokrasts (Klimaviciusa et al., 2005). Glutapironam piemīt arī antioksidanta darbība, kas novērota miokardā pie dziļas hipotermijas, jo tas inhibē peroksidāciju eritrocītu un miokarda mitohondriju membrānu lipīdos (Utano et al., 1989). Ir noskaidrots, ka glutapirons spēj darboties kā antikonvulsants (Karpova et al., 1993), tas normalizē arī pienskābes daudzumu, uzlabo atmiņu un pasargā maternāli alkoholizētus žurku mazuļus no neurodeficīta izpausmēm (Klusa and Germane, 1996).

1.3.4. Tauopirons

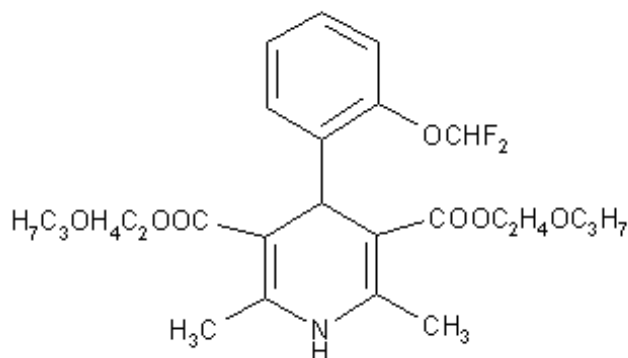
Tauopirons ir vismazāk pētītais jauna tipa 1,4-dihidropiridīnu savienojums, kuram dihidropiridīna cikla 4. pozīcijā pievienota aminoskābe taurīns (3. attēls). Tauopirons ir interesants savienojums, jo tā sastāvā esošā taurīna loma vēl joprojām ir neskaidra, taču ir ziņots, ka taurīns piedalās daudzu bioloģisku un fizioloģisku funkciju veikšanā (Oja and Saransaari, 2007). Taurīns ir sēru saturoša aminoskābe, kas rodas metionīna metabolisma rezultātā un netiek izmantota proteīnu sintēzē, bet gan sastopama brīvā veidā vai vienkāršu peptīdu sastāvā. Taurīns piedalās žultsskābes sāļu sintēzē, darbojas kā antioksidants, membrānu stabilizators un neurotransmiters (Brosnan and Brosnan, 2006; Yancey, 2005), piedalās imūnās sistēmas un kalcija jonu regulācijā un kardiomiocītu kontrakciju kontrolē (Van de Poll et al., 2006). Atrasts, ka taurīns ir mitohondriju transporta ribonukleīnskābes (tRNS) sastāvā (Suzuki et al.,

2002). Turklāt taurīns veicina Ca^{2+} jonu uzņemšanu žurku aknu mitohondrijos, kas liek autoriem domāt par tā protektējošo darbību tādos patoloģiskos apstākļos kā išēmija un oksidatīvais stress, ko izraisa pārmērīga Ca^{2+} jonu akumulācija šūnā (Palmi et al., 1999).

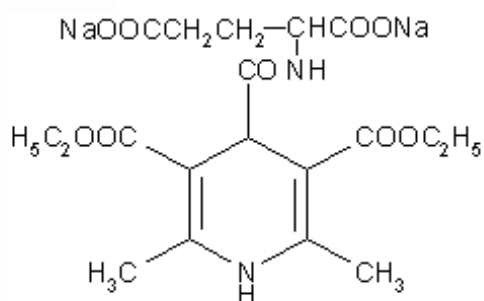
Kas attiecas uz tauropironu, neseni *in vitro* pētījumi rāda, ka tas nespēj aizsargāt smadzenīšu graudainās nervu šūnas no mitohondriju elpošanas ķēdes kompleksa I inhibitora MPP^+ -izraisītās šūnu bojāejas, turklāt šis savienojums pat pastiprina ROS veidošanos (Klimaviciusa et al., 2007). Taču vidējas intensitātes skābekļa-glikozes deprivācijas un glutamāta neirotoksicitātes modelī tauropirons līdzīgi kā cerebrokrasts un glutapirons pasargā smadzenīšu graudainās nervu šūnas no palielinātās laktātdehidrogenāzes (LDH) koncentrācijas un līdz ar to no šūnas bojājumiem (Klimaviciusa et al., 2005).



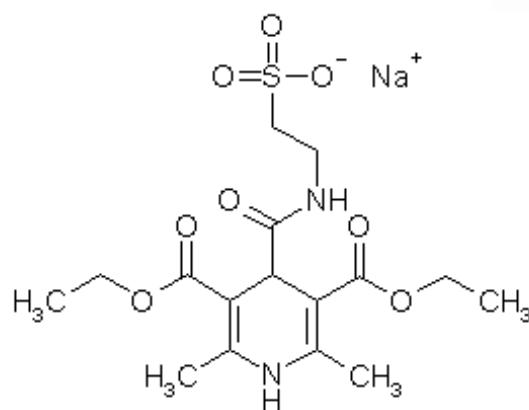
MIL



CER



GLP

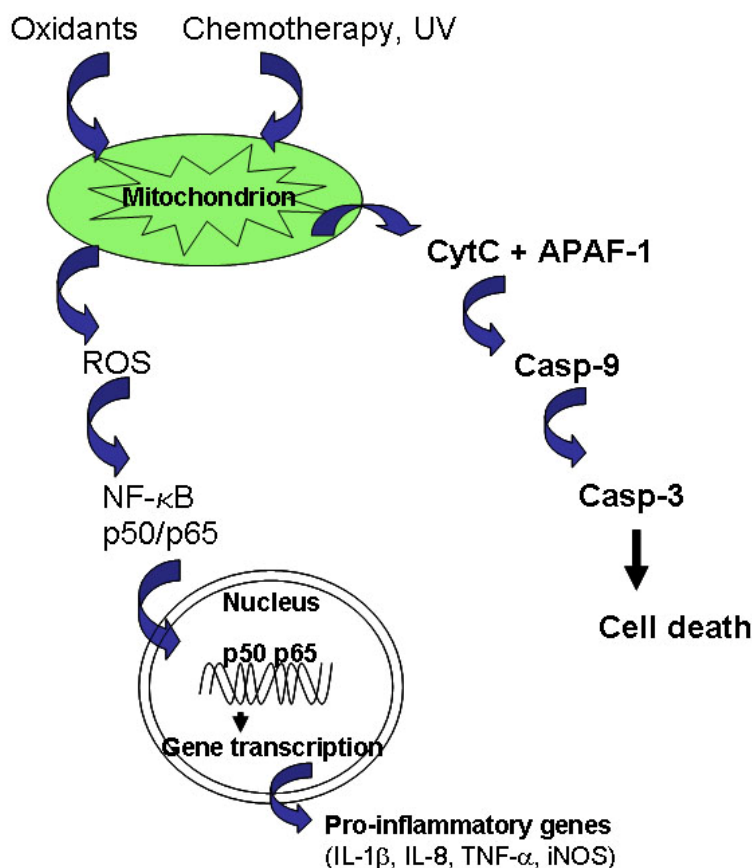


TRP

3. attēls. Pētīto vielu – mildronāta (MIL), cerebrokrasta (CER), glutapirona (GLP) un taupirona (TRP) struktūras.

1.4. Audu bojājumu marķieri

Mitochondriju disfunkcijai ir būtiska loma šūnas bojāejas procesos. Mitochondriju disfunkcija, no vienas puses, var izraisīt kaspāzi aktivējošā citohroma c atbrīvošanos citoplazmā, tādējādi izraisot apoptozi. No otras puses, mitochondriju bojājumi rada arī brīvo radikāļu pārprodukciju. Brīvie radikāļi savukārt var aktivēt iekaisuma faktoros, kā piemēram, kodola faktoru kappa B (NF-κB, 4. attēls).



4. attēls. Mitohondriju loma iekaisuma un apoptozes procesos. Apoptozes stimuli izjauc mitohondriju elpošanas ķēdi, kā rezultātā citohroms c (CytC) nokļūst citoplazmā un kopā ar apoptozes aktivējošo faktoru 1 (APAF-1) aktivē kaspāzes -9 un -3, izraisot šūnas bojāeju. Oksidanti izraisa arī reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) izdalīšanos no mitohondrijiem, kas aktivē kodola faktoru kappaB (NF-κB). Aktivēts NF-κB nonāk kodolā un, saistoties ar DNS, regulē iekaisuma veicinošo gēnu transkripciju (pēc Rahman and MacNee 2000; Andersen et al., 2005).

1.4.1. Kodola faktors kappa B

NF-κB ir viens no faktoriem, kas norāda uz iekaisuma procesiem šūnā. Tā kā azidotimidīns izraisa kardiomiopātijas, NF-κB varētu būt informatīvs rādītājs kardiopatoloģiju novērtēšanai. Zināms, ka NF-κB aktivācija notiek kā atbilde uz audu bojājumu, un šī faktora disregulācija var novest pie iekaisuma slimībām un vēža (Schmitz et al., 2004). Iekaisums ir normāla organisma aizsargreakcija, taču, ja tas notiek pārmērīgi, tad rodas šūnu un audu bojājumi. Iekaisumā tiek atbrīvoti iekaisuma mediatori un citokīni, tādi kā tumora nekrozes faktors alfa (TNF-α), interleikīni IL-1 un IL-8, kas savukārt aktivē galvenos transkripcijas faktoros, to skaitā arī NF-κB (Rahman & MacNee, 1998).

NF- κ B ir fosforilējams, acetilējams un ubikvitinējams proteīns, kuram ir daudz saistīšanās vietu (Schmitz et al., 2004). Tā aktivācija saistīta ar daudziem procesiem, to skaitā šūnu augšanu, vairošanos un apoptozi, arī imūnreakcijām (Pahl, 1999). NF- κ B piedalās daudzu funkciju, tai skaitā arī iedzimtās imunitātes, regulācijā, kad notiek NF- κ B-mediētā citokīnu, hemokīnu, pretmikrobu peptīdu un specifisku enzīmu transkripcija (Schmitz et al., 2004).

NF- κ B pieder pie *Rel* ģimenes proteīniem, kas var būt kā homodimērs vai heterodimērs. Parasti aktīvā NF- κ B forma ir heterodimērs, kas sastāv no divām subvienībām – p65 un p50. Neaktīvās šūnās NF- κ B atrodas citoplazmā un ir saistīts ar inhibitoro proteīnu – inhibitoro kappa B (I κ B), kas nomāc kodola translokācijas signālu, tādējādi neļaujot NF- κ B nonākt kodolā. Iekaisuma gadījumā, kad šūnu stimulē, piemēram, citokīni, NF- κ B atbrīvojas no I κ B, un notiek aktīvā p65/p50 translokācija uz kodolu, kur tas saistās ar specifiskiem mērķa gēnu promotera reģionu motīviem (4. attēls). NF- κ B p50 subvienība veicina piesaistīšanos pie DNS, savukārt p65 nepieciešama atbilstošai transaktivācijai (Rahman & MacNee, 1998). Tiek uzskatīts, ka NF- κ B aktivāciju var modulēt gan oksidanti un antioksidanti, gan iekaisuma un pretiekaisuma faktori (Rahman & MacNee, 1998). NF- κ B ir reducēšanās–oksidēšanās reakciju jutīgs faktors, un oksidatīvais stress izraisa ātru NF- κ B ubikvitinēšanu un fosforilāciju, kā rezultātā tiek degradēts NF- κ B inhibitors – I κ B (Rahman & MacNee, 2000). NF- κ B regulē ekspresiju daudziem iekaisumā iesaistītiem gēniem, kuru produkti veicina iekaisuma reakcijas. Tie ir gan hemokīni (piemēram, IL-8), gan iekaisuma citokīni (IL-1 β , TNF- α , IL-6), gan adhēzijas molekulas (piemēram, intracelulārā adhēzijas molekula-1, ICAM-1), gan inducējamā slāpekļa oksīda sintāze jeb iNOS (Rahman & Macnee, 2000). *In vitro* eksperimentos parādīts, ka arī glutationa (GSH) oksidācija ir saistīta ar NF- κ B aktivāciju un mitohondriālās DNS bojājumu, kas noved pie apoptozes (Dumont et al., 1999). Ir zināms, ka NF- κ B aktivācijas inhibitori, kuri kavē I κ B degradāciju vai inducē I κ B sintēzi, var būt antioksidanti (N-acetil-L-cisteīns, E vitamīns), citokīni (IL-10, IL-4), pretiekaisuma vielas (aspirīns, ciklosporīns A), glikokortikoīdi un citi (Rahman & MacNee, 1998).

Gēnu ekspresijas regulācijā ROS var darboties kā dažādu intracelulāro citokīnu un augšanas faktoru sekundārie ziņneši. ROS piedalās NF- κ B un HIV-1 aktivācijā, ROS fosforilē un degradē I κ B, tādējādi aktivējot NF- κ B (Nose, 2000).

Limfoīdo šūnu kultūrās novērots, ka NF- κ B aktivāciju rada gan ūdeņraža peroksīds, gan azidotimidīns, kas pazemina arī GSH un ATP daudzumu. Eksperimentos ar pelēm parādīts, ka iekaisuma reakcijas un līdz ar to NF- κ B aktivāciju var samazināt ar antioksidantu un glutationa prekursoru N-acetil-L-cisteīnu, inhibējot iekaisuma mediatoru atbrīvošanos (Peristeris et al., 1992). Taču nebūtu vēlams ilgstoši inhibēt NF- κ B aktivāciju, jo šim transkripcijas faktoram ir svarīga loma imūnajās un citās aizsargreakcijās (Rahman & MacNee, 1998).

1.4.2. Inducējamā slāpekļa oksīda sintāze (iNOS)

Slāpekļa oksīda sintāze katalizē aminoskābes L-arginīna oksidāciju, lai izveidotu citrulīnu un NO. Eksistē trīs dažādi slāpekļa oksīda sintāzes izotipi: endoteliālā slāpekļa oksīda sintāze, kuru ekspresē endotēlija šūnas; neironālā slāpekļa oksīda sintāze, kuru ekspresē neironi; un inducējamā slāpekļa oksīda sintāze (iNOS), kuru inducē endotokīni un iekaisuma citokīni (Moncada et al., 1991). Lielas NO koncentrācijas, ko producē iNOS, mijiedarbojas ar pārejas metālu saturošiem proteīniem un var mainīt proteīnu funkcijas vai ierosināt gēnu ekspresiju, lai aizsargātu šūnas. Taču vēl lielākas NO koncentrācijas var novest pie šūnas bojājumiem vai apoptozes (Brüne et al., 1998).

Ir zināms, ka iNOS veicina iekaisuma atbildes, producējot slāpekļa oksīdu (Vallance and Leipner, 2002). Šo enzīmu ekspresē tādi iekaisumu veicinoši citokīni kā γ interferons (IFN- γ) un TNF- α (Petros et al., 1991). Kad NF- κ B nonāk kodolā, tas var aktivēt iNOS gēna transkripciju (Murphy, 1999). Pārmērīga NO producēšanās ir saistīta ar dažādiem patoloģiskiem procesiem CNS, piemēram, epilepsiju, hipoksiski-īšēmisku bojājumu, Alcheimera un Parkinsona slimībām un Hantingtona horejām (Moncada et al., 1991).

1.4.3. Citohroma c oksidāze

Citohroma c oksidāze jeb mitohondriālās elpošanas ķēdes komplekss IV atrodas uz mitohondriju iekšējās membrānas un piedalās aerobo šūnu enerģijas nodrošināšanā, katalizē elpošanas pēdējo stadiju, pārnesot elektronus no citohroma c

uz molekulāro skābekli. Sasaistot arī elektronu pārneši ar protonu translokāciju no mitohondriju matricas uz starpmembrānu telpu, citohroma c oksidāze veicina arī enerģijas uzkrāšanu elektroķīmiskā gradienta veidā, ko tālāk izmanto oksidatīvās fosforilācijas sistēma (komplekss V) ATP sintēzei (Fontanesi et al., 2008). Citohroma c oksidāzes trūkums tiek uzskatīts par visbiežāko iemeslu mitohondriālajām encefalopātijām, kuras raksturo izmaiņas aerobajā enerģijas ražošanā, tā saucamie oksidatīvās fosforilācijas defekti (Fontanesi et al., 2008). Kopumā citohroma c oksidāzes aktivitāte var mainīties atkarībā no šūnas enerģijas prasībām (Fontanesi et al., 2008). Eikariotu citohroma c oksidāze ir veidota no 11-13 subvienībām, kuras kodē gan mitohondriju, gan kodola gēni (Fontanesi et al., 2008).

1.4.4. Kaspāze-3

Apoptoze ir šūnas pašnāvības programma, ko veicina dažāda veida citotoksiski stresa faktori (4. attēls). Kaspāzes ir galvenie apoptozes komponenti, kas iedalās apoptozes iniciatoros (kaspāzes-2, -8, -9, -10) un apoptozes efektoros (kaspāzes-3, -6, -7). Iepriekšējos pētījumos noskaidrots, ka kaspāzes-3 un -7 ir galvenie mediatori, kas iesaistās mitohondriju mediētajā apoptozē (Lakhani et al., 2006). Mitohondrijiem ir ļoti svarīga loma apoptozē (Green & Kroemer, 2004). Mitohondriji satur dažādus pro-apoptotiskus proteīnus, to skaitā citohromu c, apoptozi inducējošo faktoru (AIF), endonukleāzi G, Smac/DIABLO, Omi/HtraA2 un citus. Šie proteīni nonāk citosolā, jo palielinās mitohondriju membrānas caurlaidība, zūd mitohondriju transmembrānas potenciāls ($\Delta\Psi$). Mitohondriju nespēja ražot ATP vai ROS atbrīvošana citosolā veicina šūnas nāvi (Kuribayashi et al., 2006). Ir ziņots, ka tieši kaspāze-3 izjauc mitohondriju elpošanas ķēdes kompleksu I un II darbību, izraisot $\Delta\Psi$ zudumu un ROS veidošanos (Ricci et al., 2003a).

1.4.5. Šūnas apoptozes jutības proteīns

Šūnas apoptozes jutības proteīns (CAS) ir saistīts ar šūnas organelām, kuras piedalās šūnas mitozē, tādējādi šim proteīnam ir būtiska loma šūnas proliferācijā (Behrens et al., 2003). CAS nodrošina genoma stabilitāti šūnas dalīšanās laikā, kā arī ir saistīts ar tumora nekrozes faktora mediēto apoptozi (Brinkmann et al., 1996). Pārlietu liela CAS ekspresija ir saistīta ar pāātrinātu šūnu augšanu, ļaundabīgu transformāciju un iespējams arī mitozes defektiem, kas var izmainīt pareizu hromosomu segregāciju (Brinkmann, 1998). Taču vēl joprojām CAS loma līdz galam

nav noskaidrota. Uzskata, ka CAS kopā ar karstuma šoka proteīnu 70 (Hsp70) mediētumora nomācošā proteīna (PHAPI) aktivitāti, kurš savukārt pastiprina kaspāzes-9 aktivēšanos, veicinot apoptosomas veidošanos un tādējādi aktivējot apoptozi (Kim et al., 2008).

1.4.6. Glijas fibrilārais skābais proteīns

Glijas fibrilārais skābais proteīns (GFAP) ir 53 kDa liels glijas astrocītu struktūras proteīns, tas nodrošina astrocītu mehānisko izturību, iedarbojoties arī ar citiem starpfilamentiem (Zigmond et al., 1999). Pētījumos pierādīts, ka GFAP var tikt izmantots kā neironu un glijas šūnu bojājumu marķieris, jo tā reaktivitāte ir paaugstināta dažādu patoloģiju, piemēram, Parkinsona slimības vai normāla spiediena hidrocefālijas gadījumos (Holmberg et al., 1998; Tullberg et al., 1998).

Pēdējā laikā arvien biežāk pēta ne tikai neironu, bet arī glijas šūnu nozīmi smadzeņu procesos. Glijas astrocīti ir saistīti ar spraugveida savienojumiem (*gap junctions*), kas nodrošina neironu-glijas un glijas-vaskulārās komunikācijas (Giaume et al., 2010). Neseni pētījumi rāda, ka glijai ir liela nozīme patoloģiskos un hronisku sāpju mehānismos, jo gan astrocīti, gan mikroglia atbrīvo un atbild uz dažādām signālmolekulām, kurām ir protektējošas un/vai patoloģiskas funkcijas (Milligan and Watkins, 2009).

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Reaktīvi un aparatūra

Azidotimidīns, (1-[(2*R*,4*S*,5*S*)-4-azido-5-(hidroksimetil)oksolān-2-il]-5-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidīna-2,4-dions, AZT, zidovudīns, *Retrovir*^{*} 100mg kapsulas, *The Wellcome Foundation Ltd.*, Londona, Lielbritānija). Stavudīns, (1-[(2*R*,5*S*)-5-(hidroksimetil)-2,5-dihydrofurān-2-il]-5-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidīna-2,4-dions, d4T, *Zerit*^{*}, 40 mg kapsulas, *Bristol-Myers Squibb*, Francija). Lamivudīns (4-amino-1-[(2*R*,5*S*)-2-(hidroksimetil)-1,3-oksatiolān-5-il]-1,2-dihidropirimidīn-2-ons), 3TC, *Epivir*^{*}, 300 mg kapsulas, *Glaxo Smith Kline*, Lielbritānija). Indinavīrs ((2*S*)-1-[(2*S*,4*R*)-4-benzil-2-hidroksi-4-[(1*S*,2*R*)-2-hidroksi-2,3-dihidro-1*H*-inden-1-il]karbamoil}butil]-*N-terc*-butil-4-(piridīn-3-ilmetil)piperazīna-2-karboksamīds), *Crixivan*^{*}, 400 mg kapsulas, *Merck Sharp & Dohme Ltd.*, Lielbritānija). Efavirēns ((4*S*)-6-hloro-4-(2-ciklopropiletinil)-4-(trifluormetil)-2,4-dihidro-1*H*-3,1-benzoksazīn-2-ons), *Sustiva*^{*}, 100 mg kapsulas, *Bristol-Myers Squibb*, Lielbritānija).

Pētāmās vielas: mldronāts [3-(2,2,2-trimetilhidrazīna) propionāta dihidrāts], no A/S "Grindeks", Rīga, Latvija. Cerebrokrasts (4-[2-(difluorometoksi)fenil-2,6-dimetil-1,4-dihidropiridīna-3,5-dikarboksil skābes di(2-propoksietil)diesteris]; glutapirons [2-(2,6-dimetil-3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidropiridīna-4-karboksamīda) glutārskābe]; taupirons [2-(2,6-dimetil-3,5-dietoksikarbonil-1,4-dihidropiridīn-4-karboksamido)-etānsulfoskābe], no Latvijas Organiskās sintēzes institūta, Rīga, Latvija. Šo modeļvielu devas izvēlētas tuvu tām, kuras izmantotas iepriekšējos pētījumos: mildronāts ap 100 un 200 mg/kg (Dambrova et al., 2002), cerebrokrasts 0,1 mg/kg (Kluša et al., 1995), glutapirons 1,0 mg/kg (Klusa and Germane, 1996) un taupirons 1,0 mg/kg (Klusa et al., 1997).

Mitochondriju funkciju novērtēšanai *in vitro* reaktīvi tika pasūtīti no *Sigma, St Louis, MO, ASV*: ADP, rotenons (kompleksa I inhibitors), *p*-trifluorometoksifenilhidrazons (FCCP, atjūdzējs), antimicīns A (kompleksa III inhibitors), ciklosporīns A (mitochondriālās caurlaidības maiņas inhibitors), katalāze (enzīms antioksidants), buferu komponenti – homogenizācijas buferim (250 mM saharoze, 10 mM Hepes, 0,5 mM EGTA un 0,1% BSA) un mazgāšanas buferim (250 mM saharoze un 10 mM Hepes).

In vitro testiem azidotimidīna šķīdumu pagatavoja sekojoši: 100mg kapsulas saturu izšķīdināja 5 ml ūdens stikla mēģenē un atstāja +4°C uz nakti. Tad šķīdumu centrifugēja pie 3000 apgriezieniem, 10 minūtes. Supernatantu pārlēja ependorfa stobriņos (pa 2 ml katrā) un uzglabāja vēsumā (+4 °C). Azidotimidīna esamība supernatantā tika apstiprināta, veicot UV spektra analīzi (200-400 nm) un koncentrācija tika izrēķināta kā 50 mM, izmantojot molārās ekstinkcijas koeficientu 11650 ar viļņu garumu 226 nm (O'Neil, 2001). Mildronātu izšķīdināja 5 ml destilētā ūdenī, lai iegūtu 50 mM šķīdumu. Vielu – azidotimidīna un mildronāta – pārbaudītās koncentrācijas bija 0,1; 0,2; 0,5; 1,5; 2,5; 5 un 10 mM (jeb 0,1; 0,2; 0,5; 1,5; 2,5; 5 un 10 μmol/mg proteīna).

Ex vivo pētījumi: NF-κBp65 truša poliklonālā antiviela (AbCam, Lielbritānija), atšķaidījums 1:200; aktīvā kaspāzes-3 truša poliklonālā antiviela (AbCam, Lielbritānija), atšķaidījums 1:100; citohroma c oksidāzes (I subvienība) peles monoklonālā antiviela (Santa Cruz Biotechnology, ASV), atšķaidījums 1:100. Glijas fibrilārā skābā proteīna (GFAP, astrocītu marķiera) truša poliklonālā antiviela (DAKO, Dānija), atšķaidījums 1:500; šūnas apoptozes uzņēmības proteīns (CAS), truša poliklonālā antiviela (Abcam, Lielbritānija), atšķaidījums 1:100; inducējamā slāpekļa oksīda sintāze (iNOS), truša poliklonālā antiviela (AbCam, Lielbritānija), atšķaidījums 1:100. Primārās antivielas vizualizācijai tika izmantotas poliklonālais kazas “pret-truša” imūnglobulīns G (IgG, *policlonal goat anti-rabbit IgG*) un poliklonālais truša “pret-kazas” IgG (*policlonal rabbit anti-goat IgG*), vai biotinilēta “pret-peles” antiviela un streptavidīns, vai *Envision* reaģents. DAB (diaminobenzidīns), proteīna bloka reaģents bez seruma, citrāta buferis un 0.5% H₂O₂ (DAKO, Dānija).

Anti-HIV vielu izejas šķīdumus pagatavoja kā suspensiju, attiecīgās vielas pulverim pievienojot vienu/divus pilienus 0,6% TWIN-80 un saberžot piestā, tad, pievienojot fizioloģisko šķīdumu (0,9% NaCl), līdz ieguva 0,5% suspensiju. Mildronāta 2% šķīdumu ieguva pulveri izšķīdinot 0,9% NaCl. Cerebrokrasta 0,01% koncentrātu pagatavoja, to izšķīdinot *Twin-80* šķīdumā, glutapirona un tauropirona 0,01% koncentrātus, atšķaidot ar ūdeni.

Shandon mitrā kamera imūnhistoķīmiskajām reakcijām (*Thermo scientific*, ASV). *Clark* tipa elektrods un tetrafenilfosfonija (TPP⁺) selektīvs elektrods mitohondriju *in vitro* pētījumiem (izgatavoti Koimbras Universitātes Zooloģijas

katedrā, Portugāle). LS 55 Fluorescences Spektrometrs (230V, *Perkin Elmer*, ASV). Gaismas mikroskops (*Leica Microsystems*, Vācija). EPS 301 jaudas padeves iekārta (Amersham Biosciences, ASV) gela elektroforēzei.

2.2. Dzīvnieki

Pieauguši ICR līnijas peļu tēviņi ($17,75 \pm 0,14$) no Rīgas Stradiņa Universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas tika turēti standartizētos laboratorijas apstākļos ($22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 12 h gaismas – tumsas cikls) ar brīvu pieeju standarta laboratorijas barībai un dzeramajam ūdenim. Dzīvniekus sadalīja grupās, katrā pa 10 dzīvniekiem. Zāļu līdzekļus ievadīja intraperitoneāli abās ķermeņa pusēs. Kontroles grupai ievadīja 10 ml/kg fizioloģisko šķīdumu (0.9% NaCl). Anti-HIV vielas ievadīja devā 50 mg/kg, mildronātu – 50 mg/kg, 100 mg/kg, vai 200 mg/kg, cerebrokrastu – 0,1 mg/kg, glutapironu un tauropironu – 1 mg/kg.

Pieauguši *Wistar* līnijas žurku tēviņi (250-350 g), no Koimbras Universitātes, Medicīnas fakultātes centrālā vivārija (Koimbra, Portugāle) tika turēti standartizētos laboratorijas apstākļos ($22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 12 h gaismas – tumsas cikls) ar brīvu pieeju standarta laboratorijas barībai un dzeramajam ūdenim.

2.3. Laboratorijas dzīvnieku ētika

Visi eksperimenti tika veikti saskaņā ar Eiropas Savienības Direktīvas 86/609/EEC vadlīnijām “*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes*” (1986) un saskaņā ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterinārā dienesta dzīvnieku ētikas komitejas atļauju.

2.4. Izolētu mitohondriju funkciju pētījumi

2.4.1. Žurku aknu mitohondriju izolēšana

Mitohondriji tika izolēti no sešu nedēļu vecu *Wistar* žurku tēviņu aknām pēc diferenciālās centrifugēšanas metodēm (Gazotti et al., 1979). Žurku aknas izņēma, sagrieza mazos gabaliņos un nomazgāja homogenizācijas buferī (HB). Tad homogenizēja mehāniski. Homogenātu atšķaidīja ar HB, ievietoja divās stikla mēģenēs un centrifugēja pie 2000 apgriezieniem 10 minūtes ($+4^{\circ}\text{C}$). Pēc tam atdalīja supernatantu, pievienoja vēl HB, lai nobalansētu mēģenes un centrifugēja pie 10000 apgriezieniem 10 min. Tad atdalīja nogulsnes, atšķaidīja tās ar mazgāšanas buferi

(MB) un centrifugēja pie 10000 apgriezieniem 10 min (šo procedūru atkārtoja divas reizes). Beigās atdalīja nogulsnes, maigi samaisīja ar otiņu. Nogulsnes tika atšķaidītas, pievienojot dažus ml MB, lai iegūtu proteīna koncentrāciju aptuveni 50 mg/ml.

1. Tabula

Proteīna daudzuma noteikšana pēc Biureta metodes

Šķīdumi	Standarts	Standarts	Standarts	Standarts	Proteīns	Proteīns	Proteīns
	1	2	3	4	1	2	3
BSA (0,4%), ml	0	0,125	0,25	0,5	-	-	-
Dest H ₂ O, ml	0,5	0,375	0,25	0	0,5	0,5	0,5
MB, µl	25	25	25	25	-	-	-
DOC (10%), µl	100	100	100	100	100	100	100
Proteīni, µl	-	-	-	-	0,25	0,25	0,25
Biureta reaģents, ml	2	2	2	2	2	2	2

Nepieciešamie reaģenti – BSA, destilēts ūdens, mazgāšanas buferis (MB), proteīni, Biureta reaģents, un to daudzumi.

Proteīna daudzums tika noteikts pēc biureta metodes (Gornall et al., 1949),

izmantojot vērša seruma albumīnu (BSA) kā standartu. Standarti tika sagatavoti četrās mēģenēs, savukārt proteīnu koncentrācijas noteikšanai sagatavoja trīs mēģenes (skat. 1. tabulu).

2.4.2. Elpošanas parametru mērījumi

Skābekļa patēriņš tika noteikts polarogrāfiski ar *Clark* tipa elektrodu slēgtā stikla kambarī ar magnētisko maisītāju 30°C. Mitohondriji (1 mg proteīna) tika inkubēti buferī, kas saturēja 250 mM saharozi, 10 mM Hepes (pH 7.2), 20 mM KCl, 5 mM K₂HPO₄ un 2 mM MgCl₂. Maisījumam pievienoja 2 μM rotenonu (kad kā elpošanas substrātu izmantoja sukcinātu). Reakcijas veica bez vielām (kontroles apstākļi) vai ar azidotimidīnu, mildronātu vai mildronātu + azidotimidīnu, tad enerģizēja mitohondrijus ar 10 mM glutamātu/ 5 mM malātu (kompleksa I substrātu) vai 10 mM sukcinātu (kompleksa II substrātu). Lai ierosinātu stāvokļa-3 elpošanu, tika pievienots adenožīndifosfāts (ADP, 100 – 200 μM). Atjūgto elpošanu ierosināja, pievienojot 1 μM p-trifluorometoksifenilhidrazonu (FCCP). O₂ patēriņš tika aprēķināts, ņemot vērā, ka skābekļa piesātinājuma koncentrācija ir 230 nmol O₂/ml. Kontroles lielumi tika izteikti nmol O₂/mg proteīna/min. Elpošanas kontroles koeficients (*respiratory control ratio* (RCR)) un ADP pret skābekli koeficients (ADP/O) tika aprēķināti pēc iepriekš aprakstītas metodes (Chance & Williams, 1956).

2.4.3. Mitohondriālā transmembrānas potenciāla mērījumi

Mitohondriālais transmembrānas potenciāls ($\Delta\Psi$) tika mērīts netieši, balstoties uz lipofīlā katjona tetrafenilfosfonija (TPP⁺) aktivitāti, izmantojot TPP⁺-selektīvu elektrodu kā aprakstīts iepriekš (Kamo et al., 1979). Mitohondriji (1 mg proteīna) tika inkubēti 30 °C 1 ml buferī, kas saturēja 250 mM saharozi, 10 mM Hepes (pH 7.2), 20 mM KCl, 5 mM K₂HPO₄, 2 mM MgCl₂, papildinātu ar 3 μM TPP⁺ un 2 μM rotenonu (kad kā elpošanas substrātu izmantoja sukcinātu). Tāpat kā iepriekš reakcijas veica bez vielām (kontrolē) vai ar azidotimidīnu, mildronātu, un mildronātu + azidotimidīnu. Tad enerģizēja mitohondrijus ar 10 mM glutamātu/ 5 mM malātu (kompleksa I substrātu) vai 10 mM sukcinātu (kompleksa II substrātu). Lai ierosinātu fosforilāciju, pievienoja ADP (100 – 200 μM). Eksperimentā netika veiktas korekcijas pasīvajam TPP⁺ saistīšanās procesam ar mitohondriju membrānām, jo eksperimenta mērķis bija parādīt relatīvas potenciāla izmaiņas, nevis absolūtas vērtības.

2.4.4. Ca²⁺-inducētā mitohondriju iekšējās membrānas caurlaidības maiņa

Lai noteiktu Ca²⁺-inducēto mitohondriju membrānas caurlaidības maiņu (*mitochondrial permeability transition*, MPT), tika izmantoti skābekļa, TPP⁺ elektrodi un buferis, kas satur 200 mM sukrozes, 10 mM HEPES-Tris (pH 7.4), 1 mM KH₂PO₄, 10 μM EGTA, papildināts ar 2 μM rotenonu, ar vai bez pētāmajām vielām. Mitohondriji (1 mg proteīna) tika inkubēti 30 °C temperatūrā vienā mililitrā bufera, enerģizēti ar 5 mM sukcinātu. Pēc tam tika pievienots 20 nmol Ca²⁺/mg proteīna trīs reizes, lai inducētu MPT (Costantini et al., 1996). Tika veikti arī kontroles mērījumi (bez Ca²⁺ un ar Ca²⁺ + 1 μM ciklosporīnu A, CsA). Mitohondriju inkubācija ar 0,85 μM ciklosporīnu A, specifisku MPT inhibitoru (Broekemeier et al., 1989), divas minūtes pirms substrāta sukcināta pievienošanas, ar vai bez pētāmajām vielām pilnībā bloķēja mitohondriju depolarizāciju un palielināja stāvokļa-4 elpošanu, parādot, ka šos efektus ir izraisījusi MPT.

2.4.5. Ūdeņraža peroksīda veidošanās

Ūdeņraža peroksīda (H₂O₂) veidošanās tika mērīta fluorimetriski, izmantojot modificētu iepriekš aprakstītu metodi (Barja, 2002). Mitohondriji (0,375 mg proteīna) tika inkubēti pie 30 °C 1,5 mililitros fosfatāzes buferī, pH 7.4, kas saturēja 5 mM fosfātu, 0,1 mM EGTA, 145 mM KCl, 30 mM HEPES, 0,1 mM homovalīnskābi un 6U/ml mārrutku peroksidāzi (ar vai bez inhibitoriem – rotenona, antimicīna A; antioksidanta katalāzes un pētāmajām vielām). Reakcijas tika uzsāktas, pievienojot 10 mM glutamātu/5 mM malātu vai 10 mM sukcinātu. Reakcijas tika pabeigtas pēc 15 minūtēm ar 0,5 ml auksta 0,1 M glicīna-NaOH šķīdumu (pH 12), kurš saturēja 25 mM EDTA. Mitohondriju suspensijas tika centrifugētas pie 850 apgriezieniem 10 minūtes. Tad supernatantiem tika mērīta fluorescences pie 312 nm izstarošanas un 420 nm emisijas viļņu garumiem. H₂O₂ veidošanās tika aprēķināta, izmantojot H₂O₂ standartlīkni. Standarti un paraugi tika inkubēti vienādos apstākļos.

2.5. Eksperimenta plānojums *in vivo* vielu ievadīšanai

Vielas ievadītas katru dienu intraperitoneāli peles vēdera abās pusēs divas nedēļas:

I grupa: fizioloģiskais šķīdums (kreisā puse) + fizioloģiskais šķīdums (labā puse);

II grupa: fizioloģiskais šķīdums (kreisā puse) + anti-HIV viela (azidotimidīns, stavudīns, lamivudīns, indinavīrs vai efavirēns, 50 mg/kg, labā puse);

III grupa: mildronāts 50 mg/kg (kreisā puse) + fizioloģiskais šķīdums (labā puse);

IV grupa: mildronāts 100 mg/kg (kreisā puse) + fizioloģiskais šķīdums (labā puse);

V grupa: mildronāts 200 mg/kg (kreisā puse) + fizioloģiskais šķīdums (labā puse);

VI grupa: mildronāts 50 mg/kg (kreisā puse) + anti-HIV viela (50 mg/kg, labā puse);

VII grupa: mildronāts 100 mg/kg (kreisā puse) + anti-HIV viela (50 mg/kg, labā puse);

VIII grupa: mildronāts 200 mg/kg (kreisā puse) + anti-HIV viela (50 mg/kg, labā puse).

IX grupa: Cerebrokrasts 0,1 mg/kg (kreisā puse) + fizioloģiskais šķīdums (labā puse);

X grupa: Glutapirons 1 mg/kg (kreisā puse) + fizioloģiskais šķīdums (labā puse);

XI grupa: Tauopirons 1 mg/kg (kreisā puse) + fizioloģiskais šķīdums (labā puse);

XII grupa: Cerebrokrasts (kreisā puse) + anti-HIV viela (labā puse);

XIII grupa: Glutapirons (kreisā puse) + anti-HIV viela (labā puse);

XIV grupa: Tauopirons (kreisā puse) + anti-HIV viela (labā puse).

Piecpadsmītajā eksperimenta dienā pelēm veica dekapitāciju starp 9:00 un 11:00 no rīta. Izolēja sirds, smadzeņu un aknu audus, kurus fiksēja 10% neitrālā buferētā formalīnā un pēc tam parafīnā. *Western blot* analīzei peļu smadzeņu audus izolēja un sasaldēja -20°C temperatūrā.

Parafīnā ieguldītos audus sagrieza četrus mikronu plānos griezumus. Materiāla griezumus no mikrotoma naža pārnesa 48-50°C ūdenī un pēc tam uz tīriem un attaukotiem priekšmetstikliņiem. Imūnhistoķīmijas eksperimentam izmantoja speciālus stikliņus, klātus ar polilizīnu (*Histobond*). Pēc tam histoloģiskie griezumi tika žāvēti termostatā diennakti pie 36°C.

2.6. Imūnhistoķīmija

Imūnhistoķīmija tika veikta pamatojoties uz iepriekš aprakstītu metodi (Di Stefano et al., 2002). Visos eksperimentos izmantoja pozitīvo kontroli (plaušu alveolārie makrofāgi) un negatīvo kontroli (preparātus neinkubējot ar primāro antivielu). Peļu smadzeņu audos smadzeņu garozas visos sešos slāņos noteica kaspāzes-3, citohroma c oksidāzes, CAS un iNOS pozitīvos neironus (gan citoplazmā, gan kodolā), citoplazmā noteica arī GFAP pozitīvos astrocītus. Peļu sirds audos noteica NF-κBp65 pozitīvos kardiomiocītus, kā arī iekaisuma un endotēlija šūnas (tikai kodolā). Peļu aknu audos noteica kaspāzes-3 pozitīvos hepatocītus (kodolā un citoplazmā). Preparāti tika deparafinizēti, ievietojot tos attiecīgajos šķīdumos:

- ksilolā I – 10 min,
- ksilolā II – 5 min,
- 96° spirtā I – 3 min,
- 96° spirtā II – 3 min,
- 70° spirtā I – 3 min,
- 70° spirtā II – 3 min.

Tad audu paraugi tika skaloti destilētā ūdenī divas reizes un trešajā reizē ievietoti destilētajā ūdenī piecas minūtes.

Antigēna demaskēšanai tika izmantota sakarsēšanas metode mikrovilņu krāsnī. Preparāti tika ievietoti citrāta bufera vannā ar pH=6.2 un inkubēti 20 minūtes mikrovilņu krāsnī *Electrolux* pie 300W. Tad preparāti tika atdzesēti istabas temperatūrā 20 minūtes un skaloti TBS buferī trīs reizes. Imūnhistoķīmisko krāsošanas protokolu veica pēc biotīna avidīna metodes, izmantojot poliklonālo kazas “pret-truša” IgG un poliklonālo truša “pret-kazas” IgG, vai biotinilēto “pret-peles” antivielu un streptavidīnu. Visas reakcijas tika veiktas *Shandon* mitrajā kamerā istabas temperatūrā. Preparāti tika inkubēti 10 minūtes peroksidāzes bloķētājreaģenta klātbūtnē, pēc tam skaloti TBS buferī. Lai nobloķētu primārās antivielas nespecifisko saistīšanos, griezumi tika inkubēti proteīnu bloka reaģentā (vērša kazeīns) 10 minūtes.

Tālāk sekoja inkubācija ar primāro antivielu. Preparāti tika inkubēti ar truša poliklonālo NF-κBp65 antivielu (atšķaidījumā 1:200) 18 stundas 4°C temperatūrā, vai ar truša poliklonālo kaspāzes-3, CAS un iNOS antivielām, peles monoklonālo citohroma c oksidāzes antivielu (atšķaidījumā 1:100), un truša poliklonālo GFAP antivielu (atšķaidījumā 1:500) vienu stundu istabas temperatūrā.

Primārās antivielas (NF- κ Bp65, kaspāzes-3 un GFAP) noteikšanai tika izmantotas sekundārā un terciārā antiViela, kas bija iezīmētas ar mārutku peroksidāzi – poliklonālais kazas “pret-truša” IgG (sekundārā antiViela) un poliklonālais truša “pret-kazas” IgG (terciārā antiViela). Pēc primārās antivielas griezumi tika inkubēti ar sekundāro antiVielu 30 minūtes mitrajā kamerā (atšķaidījumā 1:100). Tad sekoja pusstundu ilga inkubācija ar terciāro antiVielu (1:100 atšķaidījumā). Pēc katras antivielas preparāti tika trīs reizes skaloti TBS. Savukārt citohroma c oksidāzes saistīšanos noteica, inkubējot preparātus 30 minūtes ar biotinilētu sekundāro “pret-peles” antiVielu un streptavidīnu. CAS un iNOS noteikšanai preparātus inkubēja 30 minūtes ar *Envision* reaģentu. Talāk visiem preparātiem sekoja piecu līdz septiņu minūšu ilga vizualizācijas reakcija ar DAB, iekrāsojot brūnus pozitīvo šūnu kodolus un/vai citoplazmu. Pēc preparātu skalošanas destilētā ūdenī, tos krāsoja ar hematoksilīnu divas minūtes, iekrāsojot kodolus zilus. Tad uz griezumiem uzpilināja *Glycergel* līmi, uzlika segstikliņu un mikroskopēja.

NF- κ Bp65, kaspāzes-3, citohroma c oksidāzes, CAS, iNOS vai GFAP pozitīvās šūnas laboratorijas dzīvnieku audos novērtēja 20 laukos (palielinājumā x400) un šūnu skaitu izteica uz laukuma vienību – kvadrātmilimetru. Citohroma c oksidāzes imūnkrāsojuma intensitāti noteica 10 redzes laukos (palielinājumā x400) ballēs no 0 līdz 3 (kur 0-nav krāsojuma, 1-vājš, 2-vidējs, 3-izteikts krāsojums).

2.7. *Western Blot* analīze

Western blot analīze tika veikta saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Liepinsh et al., 2008). Saldēti peļu smadzeņu paraugi tika homogenizēti attiecībā 1:10 ar *Ultra Turrax® T 10* homogenizatoru ledus aukstā buferī, kas saturēja 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM NaF un proteāzes inhibitorus (10 μ M leipeptīnu, 1 μ M pepstatīnu, 1 μ M aprotinīnu, un 100 μ M PMSF). Homogenātu centrifugēja pie 2000 apgriezieniem 10 min 4 °C temperatūrā. Supernatantu nolēja un izmantoja poliakrilamīda gela elektroforēzes – *Western blot* analīzei, lai noteiktu CAS, kaspāzes-3 un iNOS antiVielas. Supernatantu centrifugēja divas reizes pie 10000 apgriezieniem 10 min 4 °C temperatūrā, nogulsnes atšķaidīja ar homogenizācijas buferi un izmantoja poliakrilamīda gela elektroforēzes – *Western blot* analīzei, lai noteiktu ctohroma c oksidāzes antiVielu.

Smadzeņu homogenātu proteīnus (40 μ g no kopējiem ekstraktiem) sildīja 90 °C temperatūrā 5 min divkāršā *loading* buferī un sadalīja 8-10% nātrija dodecilsulfāta

poliakrilamīda gela elektroforēzes (SDS-PAGE) gelos 1 h pie 100 V. Proteīnus pārnesa uz polivinilidēna fluorīda (PVDF) membrānām (*Immobilon, Millipore*) 20-30 min pie 180 mA. Membrānas bloķēja ar 3% BSA atšķaidītu PBS (136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ un 1.75 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 1 h un tad inkubēja 1-2 h ar vienu no sekojošām antivielām: truša poliklonālo anti-CAS, anti-kaspāzi-3, anti-iNOS un peles monoklonālo anti-citohromna c oksidāzi (visas atšķaidījumā 1:1000), un truša poliklonālo anti-β-aktīnu. Pēc skalošanas ar PBS, membrānas inkubēja 30 min ar peroksidāzes saistīto kazas anti-truša IgG (1:10000, *AbCam*) vai truša anti-peles IgG (1:10000, *Sigma*), tad atkal skaloja PBS šķīdumā. Membrānas apstrādāja ar hemiluminiscējošiem reaģentiem (*Millipore*). Tās pašas membrānas inkubēja ar β-aktīna antivielu (1:5000, *AbCam*), ko izmantoja kā iekšējo kontroli.

2.8. Morfoloģija

Morfoloģiskai izpētei preparāti tika krāsoti pēc hematoksilīna un eozīna metodes, iemērcot priekšmetstikliņus šķīdumos:

- ksilos I – 5 min,
- ksilols II – 5 min,
- spirts I 96° – 3 min,
- spirts 96° – 3 min,
- hematoksilīns – 5 min,
- skalošana ar tekošu ūdeni (līdz zilai krāsai),
- eozīns – 1-3 min,
- skalošana ar tekošu ūdeni,
- spirts I 70° – 2-3 min,
- spirts II 96° – 5 min,
- karbolksilols – 10 min.

Beigās preparātiem uzklāja polistirolu un nosedza ar segstikliņu.

2.8.1. Sirds morfoloģiskā izmeklēšana

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai sirds audus fiksēja 10% formalīnā 48 stundas, pēc tam atūdeņoja un ieguldināja parafīnā un pagatavoja 4µm biezus griezumus, kurus krāsoja ar hematoksilīnu-eozīnu. Morfometrisko sirds audu analīzi veica, izmantojot datorprogrammu *Motic Image Advanced 3.2* (Motic, Ķīna).

Nekrozes zonas miokardā pie palielinājuma x400 tika skaitītas 10 laukos un rezultāti izteikti kā nekrotiskās zonas lielums procentos no kopējā lauka. Šūnu (limfocitāro) infiltrāciju analizēja 10 palielinājuma laukos (palielinājums x400) un novērtēja sekojoši: 0 – nav infiltrācijas, 1 – infiltrācija, kas aizņem <25% miokarda, 2 – 25-50% infiltrācija, 3 – 50-75% infiltrācija, 4 – >75% šūnu infiltrācija miokardā.

2.8.2. Smadzeņu morfoloģiskā izmeklēšana

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai smadzenes fiksēja 10% formalīnā 48 stundas, pēc tam atūdeņoja un ieguldināja parafīnā un pagatavoja 4µm biezus griezumus, kurus krāsoja ar hematoksilīnu-eozīnu. Iekaisuma šūnu infiltrācija smadzeņu audos tika analizēta palielinājumā ×400 šādās smadzeņu garozas struktūrās: 1) subkortikāli perivaskulāri; 2) subkortikāli parenhimāli; un 3) intrakortikāli perivaskulāri. Perivaskulāri infiltrāti tika definēti kā iekaisuma šūnas, kas atrodas ne vairāk par trim šūnām slāņiem no asinsvadiem. Iekaisuma šūnas, kas atrodas tālāk par trim slāņiem no asinsvadu sienas tika definētas kā parenhimālie infiltrāti. Iekaisuma šūnu infiltrācija tika novērtēta četru skalu sistēmā (0 - nav infiltrācijas, 1 - viegla infiltrācija; 2 - mērena infiltrācija; 3 – izteikta infiltrācija, 4 - ļoti izteikta infiltrācija, kas aizņem vairāk nekā 25% no kopējā redzeslauka).

2.8.3. Aknu morfoloģiskā izmeklēšana

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai aknas fiksēja 10% formalīnā 48 stundas, pēc tam atūdeņoja un ieguldināja parafīnā un pagatavoja 4µm biezus griezumus, kurus krāsoja ar hematoksilīnu-eozīnu, Šiffa reaģentu (ogļhidrātu maiņas noteikšanai) un Van Gizona krāsvielu (fibrozes novērtēšanai).

Tika veikta aknu morfometriskā izmeklēšana, novērtējot bojājuma pakāpi pēc 18 ballu sistēmas, saskaitot atsevišķu procesu intensitātes novērtējumu (histoloģiskās aktivitātes indeksu, HAI) pēc Ishak et al., 1995:

iekaisuma šūnu infiltrācija - 0 - 4 balles;

hepatocītu nekroze ap centrālo vēnu – 0 - 6 balles;

hepatocītu nekroze un apoptoze daiviņu perifērijā – 0 - 4 balles;

portālo traktu iekaisuma pārmaiņas - 0 - 4 balles.

2.9. Statistika

Darba statistiskā analīze tika veikta, izmantojot datorprogrammas *GraphPad Prism 4* un *Microsoft Office Excel*. Rezultāti izteikti kā vidējais \pm standartklūda, un ticamība izteikta pie $p < 0.05$ (*one-way ANOVA*, kam sekoja nesapārotais t-tests vai *Mann-Whitney U*-tests imūnhistoķīmiskajiem, *Western blot* un morfoloģiskajiem datiem); *one-way ANOVA*, kam sekoja *Dunnnett* tests (mitohondriālo funkciju noteikšanas datiem).

3. REZULTĀTI

3.1. Mildronāta ietekme uz azidotimidīna radītām bioenerģētikas, ūdeņraža peroksīda veidošanās un kalcija izraisītas membrānas caurlaidības izmaiņām izolētos žurku aknu mitohondrijos (publikācija III)

Mūsu pētījumi tika vērsti uz mildronāta efektu novērtēšanu izolētos mitohondrijos, kā modeļvielu izmantojot vistoksiskāko anti-HIV vielu – azidotimidīnu. Mēs parādījām azidotimidīna, mildronāta un mildronāta + azidotimidīna ietekmi uz glutamāta/malāta vai sukcināta nodoršinātiem elpošanas parametriem – stāvokļa-4 (substrāts viens pats), stāvokļa-3 (ADP stimulēta elpošana) un FCCP-stimulētu (atjūgto) elpošanu, kā arī elpošanas rādītājiem RCR un ADP/O izolētos žurku aknu mitohondrijos. Koncentrācijas zem 2,5 mM šajā darbā nav uzrādītas, jo neietekmēja mitohondriālos procesus. Neviena no vielām neietekmēja stāvokļa-4 elpošanu, savukārt azidotimidīns (10 mM = 10 μmol/mg proteīna) inhibēja stāvokļa-3 elpošanu par 62% un 23%, attiecīgi ar glutamātu/malātu un sukcinātu kā elpošanas substrātiem. Azidotimidīns (10 mM) būtiski inhibēja (par 45%) arī atjūgto elpošanu, izmantojot glutamātu/malātu, savukārt ar sukcinātu šis efekts bija ievērojami mazāks (inhibīcija par 3%). Azidotimidīns (10mM) būtiski samazināja RCR (aptuveni no 5 uz 3) ar glutamātu/malātu, taču ne ar sukcinātu, kā elpošanas substrātu. ADP/O koeficientu azidotimidīns tajā pašā koncentrācijā inhibēja par 46% (ar glutamātu/malātu kā substrātu) un par 23% (ar sukcinātu). Pretēji azidotimidīnam, mildronāts koncentrācijās līdz 10 mM (10 μmol/mg proteīna) neietekmēja nevienu no augstākminētajiem parametriem, izmantojot glutamātu/malātu vai sukcinātu kā elpošanas substrātus. Kombinēta mildronāta (10 mM) un azidotimidīna (10 mM) ievadīšana būtiski uzlaboja azidotimidīna izraisīto atjūgtās elpošanas inhibīciju (ar glutamātu/malātu kā elpošanas substrātu) un ADP/O inhibīciju (ar sukcinātu).

Pētījām arī azidotimidīna, mildronāta un mildronāta + azidotimidīna efektus uz mitohondriju transmembrānas potenciālu ($\Delta\Psi$) un fosforilācijas laiku, izmantojot glutamātu/malātu vai sukcinātu kā elpošanas substrātus. Azidotimidīns (10 mM) samazināja $\Delta\Psi$, vairāk ar glutamātu/malātu (no -208 mV uz -196 mV), nekā ar sukcinātu (no -215 mV uz -208 mV) kā elpošanas substrātu. Arī fosforilācijas laiku azidotimidīns (10 mM) palielināja vairāk ar glutamātu/malātu (par 77%), mazāk ar sukcinātu (par 36%) kā elpošanas substrātu. Mildronāts (līdz 10 mM) būtiski

neietekmēja $\Delta\Psi$ un fosforilācijas laiku ne ar vienu no elpošanas substrātiem. Mildornāts + azidotimidīns (abi 10 mM) novērsa azidotimidīna izraisīto $\Delta\Psi$ samazināšanos (izmantojot glutamātu/malātu) un fosforilācijas laika pieaugumu (izmantojot gan glutamātu/malātu, gan sukcinātu).

Azidotimidīna, mildronāta un mildronāta + azidotimidīna ietekmi uz ūdeņraža peroksīda veidošanos žurku aknu mitohondrijos *in vitro* pētījām, izmantojot gan glutamātu/malātu, gan sukcinātu kā elpošanas substrātus. Bez pētāmajām vielām H_2O_2 veidošanās (izmantojot glutamātu/malātu) būtiski pieauga rotenona (mitohondriālā kompleksa I inhibitora) klātbūtnē, kā arī rotenona + antimicīna A (mitohondriālā kompleksa III inhibitora) klātbūtnē. Palielināto H_2O_2 veidošanos samazināja antioksidants katalāze līdz līmenim, kas zemāks par bazālajiem apstākļiem (kad mitohondrijiem pievienots tikai substrāts glutamāts/malāts). Katalāzes pievienošana kalpoja kā H_2O_2 kontroles rādītājs. Azidotimidīns (koncentrācijās līdz 10 mM) būtiski palielināja H_2O_2 veidošanos, ar glutamātu/malātu kā substrātu, rotenona klātbūtnē un bazālajos apstākļos, taču neietekmēja H_2O_2 veidošanos rotenona + antimicīna A klātbūtnē. Vislielāko H_2O_2 pieaugumu (par aptuveni 70%) novēroja azidotimidīnam koncentrācijā 10 mM, rotenona klātbūtnē un bazālajos apstākļos. Savukārt mildronāts koncentrācijās līdz 10 mM neietekmēja H_2O_2 veidošanos nevienos apstākļos. Taču mildronāta + azidotimidīna vienlaicīga ievadīšana (abi 10 mM) būtiski samazināja azidotimidīna radīto H_2O_2 veidošanos bazālos apstākļos (par aptuveni 55%) un rotenona klātbūtnē (par aptuveni 34%).

Līdzīgi kā ar glutamātu/malātu, H_2O_2 veidošanās ar sukcinātu kā substrātu būtiski pieauga rotenona un rotenona + antimicīna A klātbūtnē. Efektu samazināja katalāze līdz līmenim, kas zemāks par bazālajiem apstākļiem (mitohondrijiem pievienots substrāts sukcināts + rotenons). Azidotimidīns (10 mM) palielināja H_2O_2 veidošanos (par aptuveni 58%) ar sukcinātu kā substrātu bazālajos apstākļos. Azidotimidīns neietekmēja H_2O_2 veidošanos rotenona + antimicīna A klātbūtnē. Mildronāts tāpat kā iepriekš neietekmēja H_2O_2 veidošanos nevienos no minētajiem apstākļiem. Pretēji glutamāta/malāta inducētai elpošanai, ar sukcinātu kā elpošanas substrātu kombinēta mildronāta + azidotimidīna (abi 10 mM) ievadīšana būtiski nesamazināja azidotimidīna radīto palielināto H_2O_2 veidošanos bazālajos apstākļos.

Azidotimidīna, mildronāta un mildronāta + azidotimidīna ietekmi uz mitohondriju membrānas caurlaidības maiņu (*mitochondrial permeability transition*, MPT) *in vitro* novērtējām, mērot parametrus - $\Delta\Psi$ kritumu un skābekļa patēriņa

pieaugumu – kurus parasti novēro pēc MPT indukcijas. Kontroles apstākļos pievienojot 5 mM sukcinātu $\Delta\Psi$ bija ≈ -217 mV (negatīvs mitohondriju iekšpusē), kas atbilda stāvokļa-4 elpošanai. Pirmā Ca^{2+} pievienošana (20 nmol/mg proteīna) izraisīja strauju depolarizāciju ($\Delta\Psi$ samazināšanās), kam sekoja neliela repolarizācija ($\Delta\Psi$ atjaunošanās). Depolarizāciju radīja Ca^{2+} ieplūšana elektronegatīvajā mitohondriju matriksā, kam sekoja H^+ izplūšana, atjaunojot $\Delta\Psi$. Tā rezultātā stāvokļa-4 elpošana pieauga no 13 līdz 17 nmol O_2 /mg proteīna/min. Otrā un trešā Ca^{2+} pievienošana (20 nmol/mg proteīna) radīja pilnīgu mitohondriju membrānas depolarizāciju un stāvokļa-4 elpošana sasniedza maksimumu (61 nmol O_2 / min/ mg proteīna). Mitohondriji spēj uzkrāt noteiktu daudzumu Ca^{2+} (60 nmol/ mg proteīna kontroles grupai), līdz to spējas tiek pārsniegtas un mitohondriji pilnībā depolarizējas neatgriezenisku iekšējās membrānas caurlaidības izmaiņu dēļ. Azidotimidīns koncentrācijās līdz 5 mM un mildronāts koncentrācijās līdz 10 mM divas minūtes pirms substrāta sukcināta pievienošanas būtiski neietekmēja mitohondriju spēju akumulēt Ca^{2+} , kas norāda, ka šīs vielas vāji ietekmē Ca^{2+} -inducēto MPT. Taču azidotimidīns (5-10 mM) samazināja mitohondriju spēju uzkrāt Ca^{2+} līdz 40 nmol/ mg proteīna. Mildronāts kopā ar azidotimidīnu novērsa šo azidotimidīna radīto efektu līdz kontroles līmenim (60 nmol/ mg proteīna).

3.2. Pētīto vielu ietekme uz anti-HIV vielu izraisītajām imūnhistoķīmiskām un morfoloģiskām izmaiņām peļu sirds audos *ex vivo*

3.2.1. Mildronāta efekti (publikācijas I, II, VII)

Mūsu pētījumi tika veikti, lai noskaidrotu mildronāta trīs dažādu devu (50, 100 un 200 mg/kg) ietekmi uz azidotimidīna radītajiem toksiskajiem efektiem (publikācija I). Mēs noteicām kopējo NF- κ Bp65 ekspresiju peļu sirds audu kardiomiocītu, iekaisuma un endotēlija šūnu kodolos. Azidotimidīna grupai novēroja būtiski lielāku NF- κ Bp65 ekspresiju peļu sirds audos, salīdzinot ar kontroles grupu (attiecīgi $88,1 \pm 6,9$ pret $22,7 \pm 1,8$ šūnas/mm², $p < 0,0001$, 5. attēls). Mildronāta (50 mg/kg) grupai arī novēroja statistiski ticamu NF- κ Bp65 ekspresiju, salīdzinot ar kontroli (attiecīgi $43,4 \pm 4,1$ pret $22,7 \pm 1,8$ šūnas/mm², $p = 0,0004$), lai gan tā nebija tik liela kā azidotimidīna grupai. Mildronāta (100 mg/kg) grupai NF- κ Bp65 ekspresija bija nedaudz lielāka nekā kontroles grupai, taču statistiski ticama ($27,9 \pm 1,5$ pret $22,7 \pm 1,8$ šūnas/mm²,

$p=0,038$). Vislielākā mildronāta deva (200 mg/kg) neizraisīja būtiskas atšķirības NF- κ Bp65 ekspresijā, salīdzinot ar kontroles grupu ($23,5 \pm 0,7$ pret $22,7 \pm 1,8$ šūnas/mm², $p>0,05$, 5. attēls). Visu trīs mildronāta devu kombinācija ar azidotimidīnu būtiski samazināja NF- κ Bp65 pozitīvo šūnu skaitu peļu sirds audos. Visefektīvāk, līdz kontroles līmenim, NF- κ Bp65 ekspresija samazinājās (salīdzinot ar azidotimidīna grupu), kombinējot mildronātu devā 200 mg/kg ar azidotimidīnu ($22,9 \pm 1,3$ pret $88,1 \pm 6,9$ šūnas/mm², $p<0,0001$). Lai gan mildronāta 50 mg/kg un 100 mg/kg kombinācijas ar azidotimidīnu nesamazināja NF- κ Bp65 ekspresiju līdz kontroles līmenim, tomēr tā bija statistiski ticama. Mildronāts (50 mg/kg) būtiski samazināja NF- κ Bp65 pozitīvās šūnas, salīdzinot ar azidotimidīnu ($28,8 \pm 1,6$ pret $88,1 \pm 6,9$ šūnas/mm², $p<0,0001$). Arī mildronāts (100 mg/kg) būtiski samazināja NF- κ Bp65 ekspresiju, salīdzinot ar azidotimidīnu (attiecīgi $36,8 \pm 2,3$ pret $88,1 \pm 6,9$ šūnas/mm², $p<0,0001$, 5. attēls).

Azidotimidīns izraisīja arī morfoloģiskas pārmaiņas peļu sirds audos (publikācija I), kas izpaudās kā taukainā deģenerācija, perēklveida kardiomiocītu nekroze, perivaskulārā tūska un leikocītu infiltrācija. Mildronāta (50 mg/kg) grupai nenovēroja būtiskas morfoloģiskas izmaiņas, bet mildronāta 100 mg/kg un 200 mg/kg devas izraisīja nelielu perivaskulāro tūsku. Savukārt, kombinējot azidotimidīnu ar mildronātu (50, 100 un 200 mg/kg), visas šīs morfoloģiskās izmaiņas būtiski samazinājās. Morfometriskā datu analīze liecina, ka peļu sirds audos kardiomiocītu nekrozi un limfohistiocitāro šūnu infiltrāciju novēroja tikai azidotimidīna grupai un vielu kombinācijām. Mildronāta 50, 100 un 200 mg/kg devas peļu sirds audos samazināja azidotimidīna izraisīto kardiomiocītu nekrozi, salīdzinot ar azidotimidīna grupu: attiecīgi $8,3 \pm 0,3\%$, $5,0 \pm 0,3\%$ un $4,7 \pm 0,4\%$ pret $11,7 \pm 0,8\%$ ($p<0,001$, $p<0,0001$ un $p<0,0001$). Šīs mildronāta devas – 50, 100 un 200 mg/kg – samazināja arī azidotimidīna izraisīto limfohistiocitāro šūnu infiltrāciju sirds audos (rezultāti novērtēti ballu sistēmā, skalā no 0 līdz 4), salīdzinot ar azidotimidīna grupu: attiecīgi $2,2 \pm 0,1$, $2,0 \pm 0,2$ un $2,0 \pm 0,2$ pret $3,1 \pm 0,2$ ($p<0,004$, $p<0,004$ un $p<0,002$).

Arī stavudīns un lamivudīns (publikācija II) būtiski palielināja NF- κ Bp65 ekspresiju, salīdzinot ar kontroles grupu: stavudīns $92,5 \pm 6,3$ pret $34,7 \pm 2,8$ šūnas/mm², $p<0,0001$; lamivudīns $100,1 \pm 5,5$ pret $34,7 \pm 2,8$ šūnas/mm², $p<0,0001$. Savukārt mildronāta kombinēta ievadīšana ar stavudīnu un lamivudīnu būtiski samazināja šo anti-HIV vielu izraisīto pārmērīgo NF- κ Bp65 ekspresiju. Mildronāta un

stavudīna vienlaicīga ievadīšana samazināja NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu līdz kontroles līmenim, salīdzinot ar stavudīna kontroles grupu: $36,6 \pm 3,4$ pret $92,5 \pm 6,3$ šūnas/mm², $p < 0,0001$. Savukārt mildronāta un lamivudīna vienlaicīga ievadīšana samazināja NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu līdz $64,3 \pm 6,1$ šūnām/mm², salīdzinot ar lamivudīna kontroli $100,1 \pm 5,5$ šūnas/mm², $p = 0,0008$.

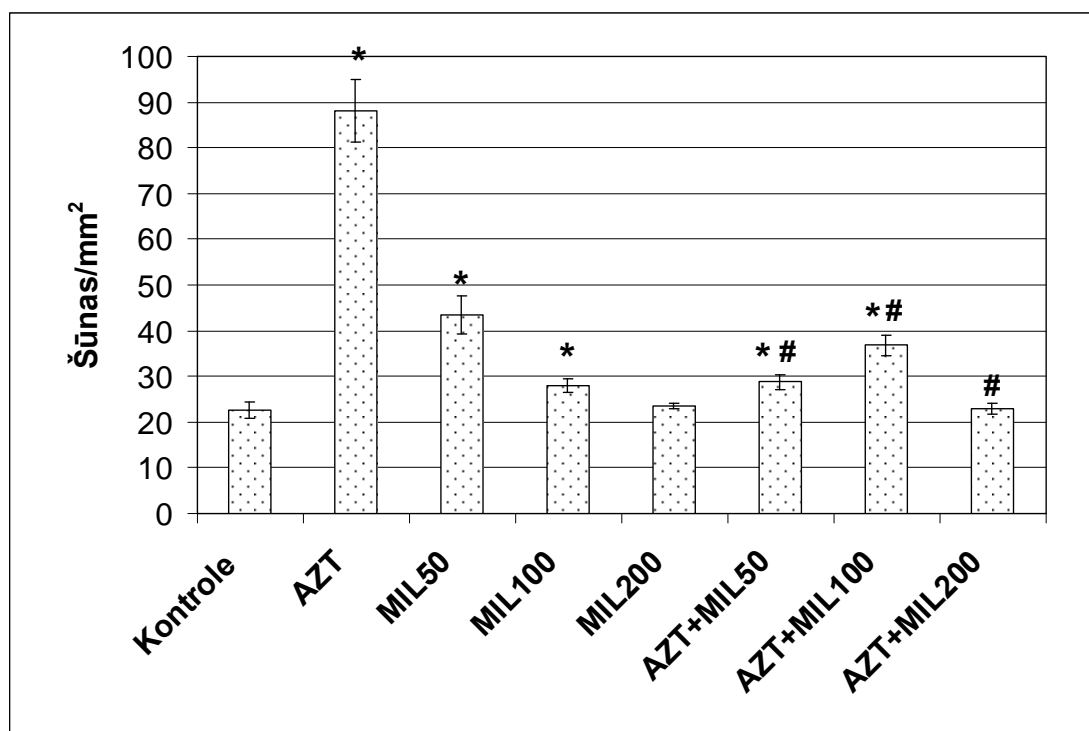
Stavudīns un lamivudīns izraisīja arī deģeneratīvas un iekaisuma reakcijas peļu miokardā, kas izpaudās kā neliela perēkļveida taukainā deģenerācija, kardiomiocītu vakuolizācija, miocitolīze un palielināta iekaisuma šūnu infiltrācija (publikācija **II**). Taču šīs morfoloģiskās pārmaiņas atšķīrās starp šīm divām anti-HIV vielām. Mildronāts samazināja gan stavudīna izraisīto nekrozi ($2,0 \pm 0,2$ pret $3,3 \pm 0,5$ %, $p = 0,03$), gan arī lamivudīna izraisīto nekrozi ($4,4 \pm 0,4$ pret $6,6 \pm 0,6$ %, $p = 0,01$). Lamivudīns palielināja iekaisuma šūnu infiltrāciju peļu sirds audos līdz $2,1 \pm 0,1$ ballēm, $p = 0,0006$, savukārt stavudīns šūnu infiltrāciju palielināja līdz $1,4 \pm 0,2$ ballēm, $p = 0,04$ (abi salīdzināti pret kontroles grupas lielumu $0,6 \pm 0,2$ balles). Mildronāts (100 mg/kg) kombinācijā ar lamivudīnu vai stavudīnu samazināja šo anti-HIV vielu izraisīto šūnu infiltrāciju, taču dati nebija statistiski ticami.

Proteāzes inhibitors indinavīrs (publikācija **VII**) būtiski palielināja NF-κBp65 ekspresiju peļu sirds audos, salīdzinot ar kontroli ($103,4 \pm 10,4$ pret $34,7 \pm 2,8$ šūnas/mm², $p < 0,0001$). Mildronāts (100 mg/kg) pats neizraisīja palielinātu NF-κBp65 ekspresiju, salīdzinot ar kontroli ($38,8 \pm 5,0$ pret $34,7 \pm 2,8$ šūnas/mm², $p > 0,05$). Savukārt grupai, kurai kombinēti ievadīja mildronātu un indinavīru, novēroja samazinātu NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu, salīdzinot ar indinavīra kontroles grupu ($49,6 \pm 2,6$ pret $103,4 \pm 10,4$ šūnas/mm², $p < 0,0001$). Taču NNRTI efavirēns (50 mg/kg) neietekmēja ne NF-κBp65, ne kaspāzes-3 ekspresiju peļu sirds audos.

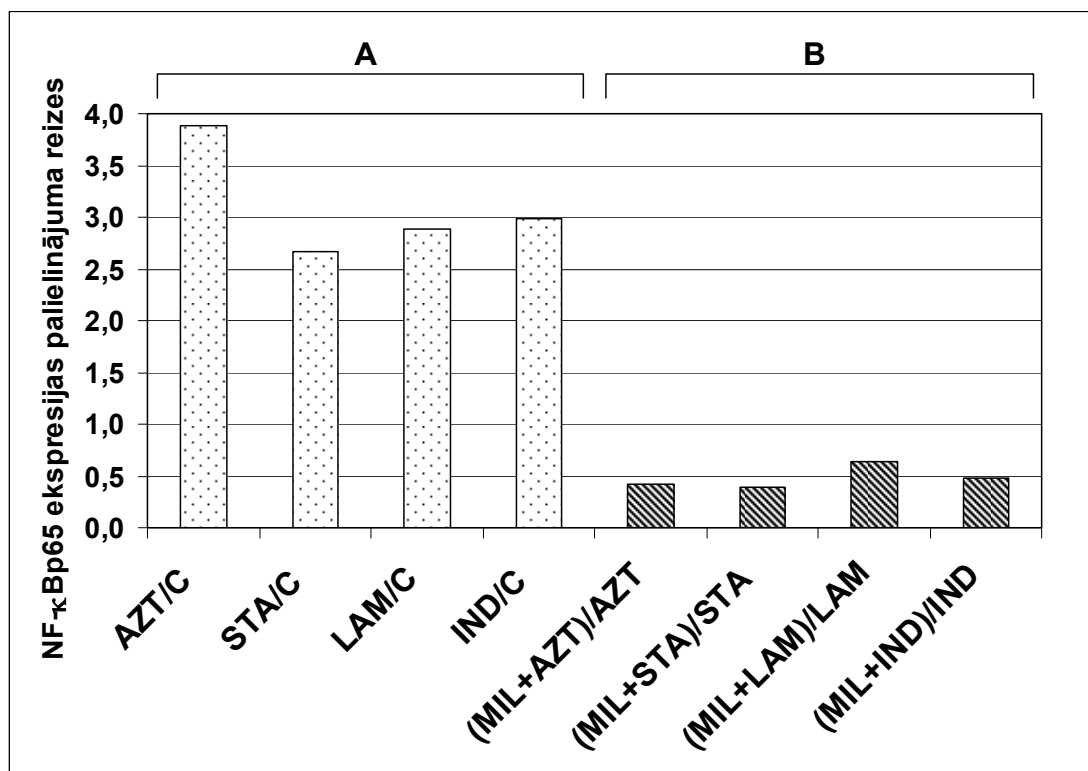
Proteāzes inhibitors (PI) indinavīrs izraisīja arī sīkperēkļainu kardiomiocītu nekrozi miokardā ($4,5 \pm 0,8$ %), lai gan mildronāta kombinācija ar indinavīru to neietekmēja ($4,5 \pm 0,8$ pret indinavīra kontroli $4,5 \pm 0,7$ %, $p > 0,05$, publikācija **VII**). Turklāt indinavīrs izraisīja sīkperēkļainu kardiomiocītu tauku deģenerāciju un vakuolizāciju, bet tā bija mazāk izteikta nekā azidotimidīnam, lamivudīnam un stavudīnam. Mildronāta kombinācija ar indinavīru neietekmēja kardiomiocītu sīkperēkļainu tauku deģenerāciju. Indinavīrs divkārti pastiprināja šūnu infiltrāciju miokardā ($1,9 \pm 0,3$ balles). Mildronāts uzrādīja tendenci to samazināt ($1,1 \pm 0,1$ pret

1,9 ± 0,3 balles, $p > 0,05$), bet ne pilnīgi novērst. NNRTI efavirēns devā 50 mg/kg, ievadīts divas nedēļas neradīja būtiskas histopatoloģiskās izmaiņas peļu miokardā.

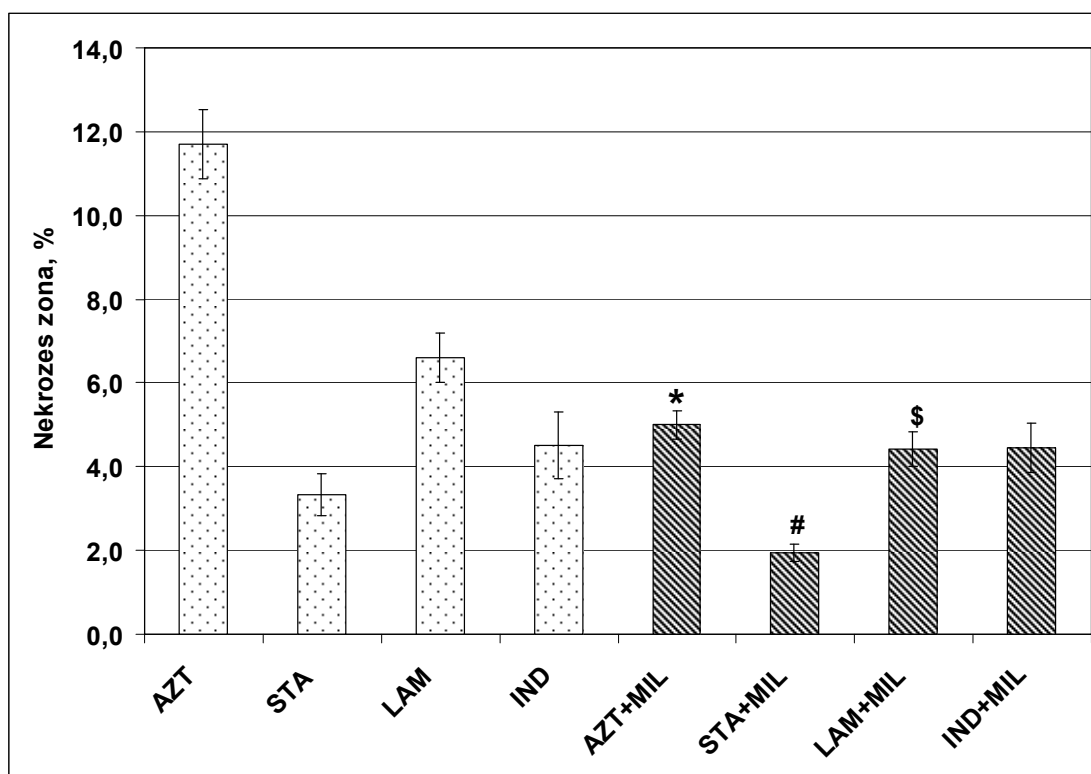
Salīdzinošu anti-HIV vielu (azidotimidīna, stavudīna, lamivudīna un indinavīra) ietekmi uz NF- κ Bp65 ekspresiju, kā arī mildronāta (devā 100 mg/kg) spēju samazināt šo anti-HIV vielu izraisīto NF- κ Bp65 ekspresiju peļu sirds audos, var redzēt 6. attēlā. Salīdzinošu anti-HIV vielu (azidotimidīna, stavudīna, lamivudīna un indinavīra) izraisīto nekrozi, kā arī mildronāta (devā 100 mg/kg) spēju samazināt šo nekrozi peļu sirds audos, var redzēt 7. attēlā.



5. attēls. Kodola faktora NF κ B65 ekspresija peļu sirds audos (šūnas/mm²). Azidotimidīns (AZT, 50 mg/kg), mildronāts (MIL, 50, 100 vai 200 mg/kg) ievadīti pelēm intraperitoneāli vienreiz dienā divu nedēļu garumā. Statistiskā ticamība izteikta: * $p < 0,05$ pret Kontrolas grupu, # $p < 0,05$ pret AZT grupu, nesapārotais t-tests vai *Mann-Whitney U*-tests.



6. attēls. **A:** Salīdzinoša anti-HIV vielu ietekme uz NF-κBp65 ekspresiju peļu sirds audos (kardiomiocītos, iekaisuma un endotēlija šūnās) salīdzinot ar kontroli: azidotimidīna pret kontroli (AZT/C), stavudīna pret kontroli (STA/K), lamivudīna pret kontroli (LAM/K), indinavīra pret kontroli (IND/K) grupas. **B:** Mildronāta (MIL) protektīvais efekts, vienlaicīgi ievadot ar anti-HIV vielu (MIL+AZT, MIL+STA, MIL+LAM vai MIL+IND), samazinot NF-κBp65 ekspresiju. Vielas ievadītas intraperitoneāli divas nedēļas: kontrole – 0,9% NaCl 10ml/kg; AZT, STA, LAM vai IND (50 mg/kg); MIL (100 mg/kg).



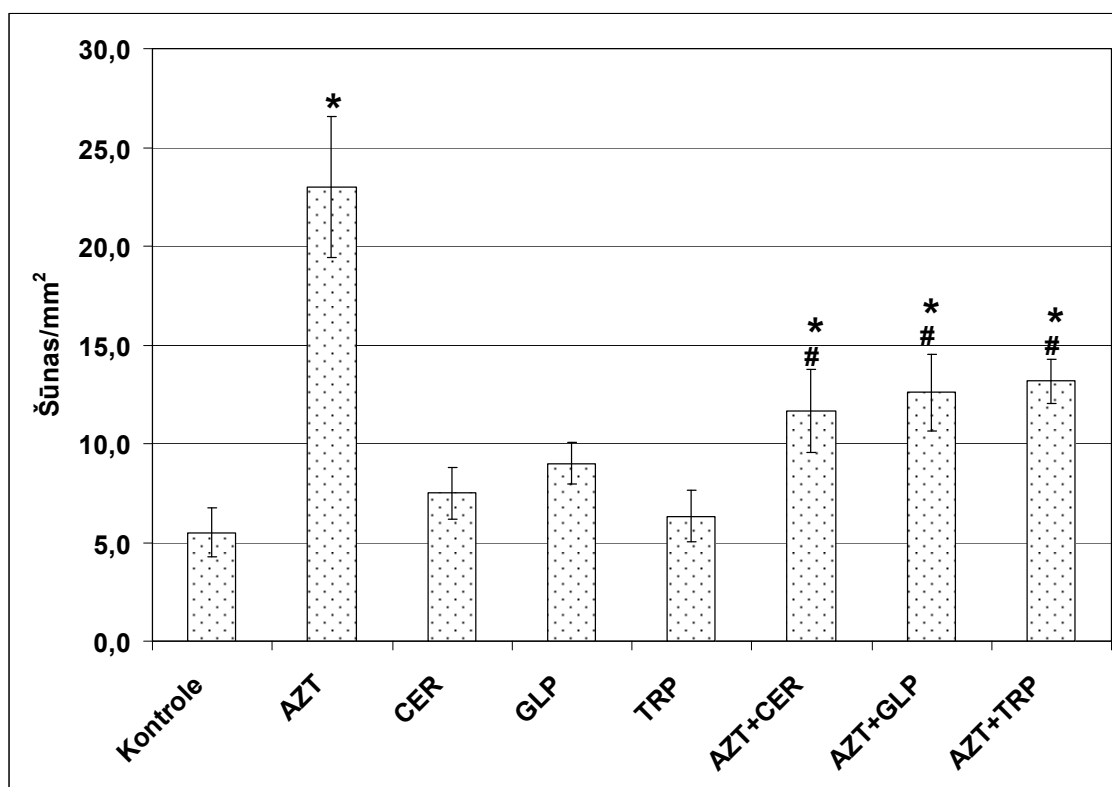
7. attēls. Kardiomiocītu nekrozes perēkļu laukums (%) peļu miokardā salīdzinoši azidotimidīna (AZT, 50 mg/kg), stavudīna (STA, 50 mg/kg), lamivudīna (LAM, 50 mg/kg), indinavīra (IND, 50 mg/kg) grupām un to kombinācijām ar mildronātu (MIL, 100 mg/kg). Vielas ievadītas pelēm intraperitoneāli vienreiz dienā divu nedēļu garumā. Statistiskā ticamība izteikta: * $P < 0,05$ pret AZT grupu, # $p < 0,05$ pret STA grupu, \$ $p < 0,05$ pret LAM grupu, nesapārotais t-tests vai *Mann-Whitney U*-tests.

3.2.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV)

Parbaudījām trīs dažādu 1,4-dihidropiridīnu – cerebrokrasta, glutapirona un tauropirona ietekmi uz azidotimidīna izraisītajām pārmaiņām peļu sirds audos. Peļu miokardā azidotimidīns radīja būtisku NF- κ Bp65 pozitīvo šūnu skaita pieaugumu, salīdzinot ar kontroles grupu ($98,0 \pm 5,0$ pret $21,0 \pm 2,0$ šūnas/mm², $p < 0,0001$). Cerebrokrasts ($43,0 \pm 3,0$ šūnas/mm²) un glutapirons ($35,0 \pm 3,0$ šūnas/mm²) arī palielināja NF- κ Bp65 ekspresiju, taču šis efekts bija tikai aptuveni puse no azidotimidīna efekta. Savukārt tauropirons negaidīti palielināja NF- κ Bp65 ekspresiju gandrīz tik pat daudz, cik azidotimidīns ($84,0 \pm 4,0$ pret $21,0 \pm 2,0$ šūnas/mm², salīdzinot ar kontroli, $p < 0,0001$). Visi trīs 1,4-dihidropiridīni kombinācijā ar azidotimidīnu nedaudz, taču statistiski ticami samazināja NF- κ Bp65 pozitīvās šūnas, salīdzinot ar azidotimidīna efektu. Azidotimidīns palielināja arī kaspāzes-3 ekspresiju peļu miokardā ($23,0 \pm 4,0$ pret $6,0 \pm 1,0$ šūnas/mm², salīdzinot ar kontroli, $p = 0,0009$, 8. attēls). Neviens no testētajiem 1,4-dihidropiridīniem neizmainīja kaspāzes-3

aktivitāti peļu sirdī. Savukārt kombinācijās ar azidotimidīnu, cerebrokrasts, glutapirons un tauropirons būtiski samazināja azidotimidīna inducēto kaspāzes-3 pozitīvo šūnu skaitu peļu miokardā (attiecīgi $12,0 \pm 2,0$ pret $23,0 \pm 4,0$ ($p=0,02$), $13,0 \pm 2,0$ pret $23,0 \pm 4,0$ ($p=0,04$) un $13,0 \pm 1,0$ pret $23,0 \pm 4,0$ ($p=0,03$) šūnas/mm², 8. attēls).

Peļu miokardā azidotimidīns, salīdzinot ar kontroles grupu, radīja ievērojamas histopatoloģiskas izmaiņas, kas izpaudās kā miokarda taukainā deģenerācija, šūnu infiltrācija un neliela perēkļveida kardiomiocītu nekroze. Cerebrokrasts un glutapirons radīja nelielu perēkļveida taukaino deģenerāciju, savukārt tauropironam bija tendence palielināt miokarda šūnu infiltrāciju. Kombinācijās ar azidotimidīnu cerebrokrasts būtiski samazināja azidotimidīna radīto kardiomiocītu perēkļveida nekrozi ($6,8 \pm 1,0$ pret $11,7 \pm 0,8$ %, $p=0,003$) un šūnu infiltrāciju ($2,4 \pm 0,2$ pret $3,1 \pm 0,2$, $p=0,04$, balles), salīdzinot ar azidotimidīnu. Glutapironam kopā ar azidotimidīnu bija tendence samazināt azidotimidīna radīto mazo perēkļveida kardiomiocītu nekrozi ($9,2 \pm 0,9$ pret $11,7 \pm 0,8$ %, $p=0,09$), un tas būtiski samazināja šūnu infiltrāciju ($2,4 \pm 0,2$ pret $3,1 \pm 0,2$, $p=0,04$, balles), salīdzinot ar azidotimidīnu. Tauropironam šādus efektus nenovēroja.



8. attēls. Kaspāzes-3 ekspresija peļu sirds audos (šūnas/mm²). Azidotimidīns (AZT, 50 mg/kg), cerebrokrasts (CER, 0,1 mg/kg), glutapirons (GLP, 1 mg/kg) un tauropirons (TRP, 1 mg/kg) ievadīti pelēm intraperitoneāli vienreiz dienā divu nedēļu garumā. Statistiskā ticamība izteikta: * p<0,05 pret Kontrolē grupu, #p<0,05 pret AZT grupu, nesapārotais t-tests vai *Mann-Whitney U*-tests.

3.3. Pētīto vielu ietekme uz anti-HIV vielu izraisītajām izmaiņām peļu smadzeņu audos *ex vivo* (imūnhistoķīmiskās, *Western blot* un morfoloģiskās metodes)

3.3.1. Mildronāta efekti (publikācijas VI un VII)

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka azidotimidīns (50 mg/kg intraperitoneāli, ievadīts divas nedēļas) izraisīja perēkļveida apoptozi, kas izpaudās kā vismaz trīskārša kaspāzes-3 ekspresija, salīdzinot ar kontroli (publikācija VI). Mildronāts pats neietekmēja kaspāzes-3 ekspresiju. Kombinējot azidotimidīnu ar mildronātu, novēroja šādus mildronāta efektus: visizteiktāk azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju smadzenēs samazināja mildronāts devā 50 mg/kg ($1,4 \pm 0,4$ pret $4,7 \pm 0,8$ šūnas/mm², p=0,002). Arī mildronāta deva 100 mg/kg samazināja azidotimidīna izraisītu kaspāzes-3 ekspresiju smadzenēs ($2,3 \pm 0,3$ pret $4,7 \pm 0,8$ šūnas/mm², p=0,02). Azidotimidīna kombinācijā ar mildronātu devā 200 mg/kg

novēroja tikai tendenci novērst azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju smadzenēs ($3,1 \pm 0,4$ pret $4,7 \pm 0,8$ šūnas/mm², $p > 0,05$). *Western blot* analīze apstiprina, ka azidotimidīns palielināja kaspāzes-3 ekspresiju, kuru efektīvi samazināja mildronāts devā 50 mg/kg ($p = 0,04$). Taču mildronāts (100 un 200 mg/kg) nesamazināja azidotimidīna izraisīto palielināto kaspāzes-3 ekspresiju.

Azidotimidīns peļu smadzeņu audos samazināja citohroma c oksidāzes ekspresiju aptuveni trīs reizes, salīdzinot ar kontroles grupas datiem ($31,0 \pm 2,8$ pret $108,4 \pm 15,0$ šūnas/mm², $p = 0,001$). Mildronāts pats neietekmēja citohroma c oksidāzes ekspresiju nevienā pārbaudītajā devā, taču kopā ar azidotimidīnu būtiski pasargāja peļu smadzeņu audus no azidotimidīna izraisītās samazinātās citohroma c oksidāzes ekspresijas visās trīs devās. Visaktīvākās mildronāta devas bija 50 un 200 mg/kg (attiecīgi pret azidotimidīna grupu $85,2 \pm 5,1$ pret $31,0 \pm 2,8$ šūnas/mm², $p < 0,0001$, un $86,8 \pm 3,8$ pret $31,0 \pm 2,8$ šūnas/mm², $p < 0,0001$). Taču azidotimidīns palielināja citohroma c oksidāzes krāsojuma intensitāti smadzeņu garozas neironos ($2,71 \pm 0,48$ pret $1,71 \pm 0,48$ balles, $p = 0,01$). Mildronāts devās 50 un 100 mg/kg būtiski neietekmēja krāsojuma intensitāti, taču mildronāts devā 200 mg/kg nedaudz, bet statistiski ticami, to palielināja. Mildronāts devās 50 un 100 mg/kg, bet ne 200 mg/kg, samazināja azidotimidīna izraisīto citohroma c oksidāzes krāsojuma intensitāti.

Western blot analīze parāda, ka azidotimidīnam bija tendence palielināt citohroma c oksidāzes ekspresiju, un mildronāts visās trīs devās uzrādīja tendenci samazināt azidotimidīna izraisīto citohroma c oksidāzes ekspresiju.

Azidotimidīns 10 reizes palielināja CAS ekspresiju peļus smadzeņu audos, salīdzinot ar kontroles grupu ($51,0 \pm 8,0$ pret $5,0 \pm 1,4$, $p = 0,0007$, publikācija VI, 9. attēls). Mildronāts *per se* neietekmēja CAS ekspresiju. Mildronāts devās 50, 100 un 200 mg/kg būtiski samazināja azidotimidīna izraisīto palielināto CAS ekspresiju (9. attēls). *Western blot* analīze apstiprināja imūnhistoķīmijas datus.

Azidotimidīns palielināja iNOS ekspresiju peļu smadzeņu audos, nosakot imūnhistoķīmiski un ar *Western blot* metodēm (publikācija VI). Mildronāts visās trīs devās samazināja azidotimidīna izraisīto palielināto iNOS ekspresiju, nosakot ar *Western blot* analīzi. Imūnhistoķīmiskie pētījumi parādīja, ka mildronāts devās 50 un 200 mg/kg samazināja iNOS pozitīvo šūnu skaitu (attiecīgi $p = 0,05$ un $p = 0,04$).

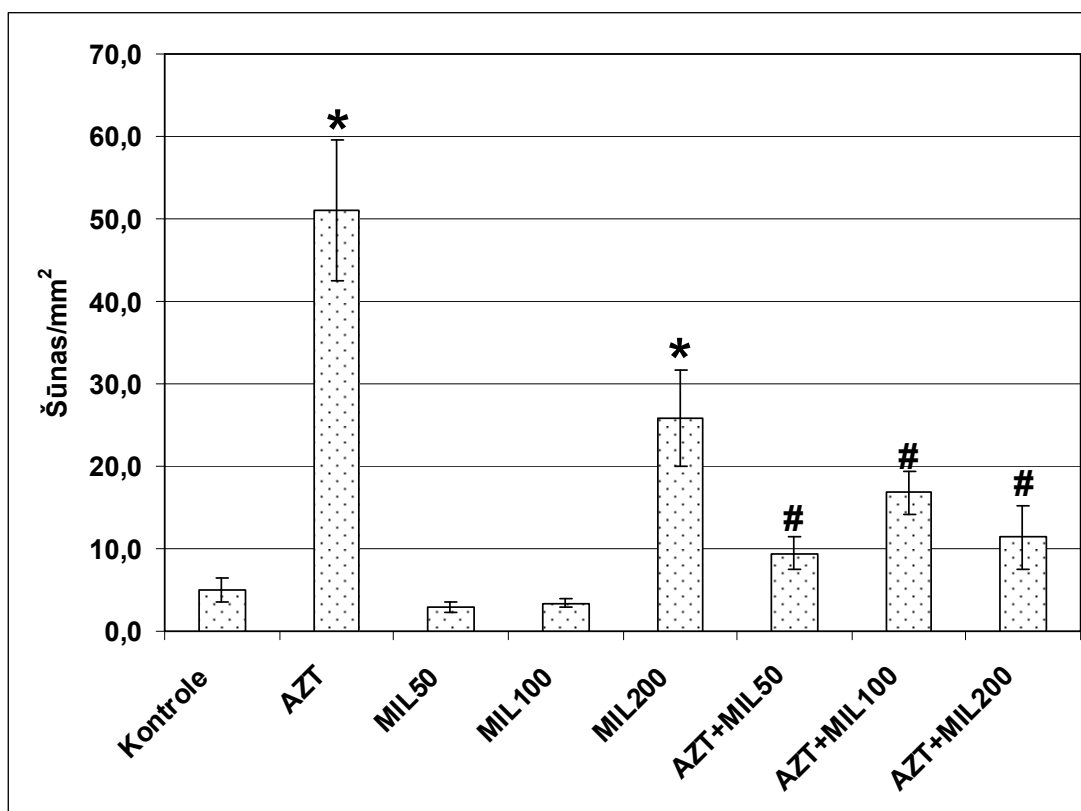
Azidotimidīns palielināja arī GFAP pozitīvo astrocītu skaitu peļu smadzeņu audos, salīdzinot ar kontroli ($133,8 \pm 27,5$ pret $23,0 \pm 5,1$ šūnas/mm², $p = 0,003$).

Mildronāts *per se* neietekmēja glijas fibrillārā skābā proteīna (GFAP) ekspresiju. Mildronāts (100 un 200 mg/kg) būtiski samazināja azidotimidīna radīto palielināto GFAP ekspresiju (attiecīgi $46,8 \pm 9,4$ pret $133,8 \pm 27,5$ šūnas/mm², $p=0,02$; un $65,5 \pm 7,8$ pret $133,8 \pm 27,5$ šūnas/mm², $p=0,006$). Mildronāts devā 50 mg/kg uzrādīja tikai tendenci samazināt GFAP ekspresiju.

Azidotimidīns izraisīja arī deģeneratīvas un iekaisuma pārmaiņas peļu smadzenēs (publikācija VI), kas izpaudās kā perēkļveida neironu un perivaskulārā tūska un perivaskulārā limfocitārā infiltrācija. Mildronāts pats devās 50, 100 mg/kg neradīja morfoloģiskās pārmaiņas smadzenēs, salīdzinot ar kontroles grupu. Taču devā 200 mg/kg mildronāts izraisīja nelielu perivaskulāru tūsku un limfocītu infiltrāciju. Mildronāta kombinācija ar azidotimidīnu neietekmēja azidotimidīna izraisīto perivaskulāru limfocītu infiltrāciju, taču samazināja parenhimatozu limfocītu infiltrāciju. Vislabākais protektīvais efekts attiecībā uz parenhimatozu limfocītu infiltrāciju tika novērots mildronāta devā 100mg/kg ($1,8 \pm 0,1$ pret $3,0 \pm 0,3$ balles, $p=0,002$), mazāks protektīvs efekts bija mildronāta devā 200 mg/kg kombinācijai ($2,2 \pm 0,1$ pret $3,0 \pm 0,3$ balles, $p=0,02$), bet mildronāta 50 mg/kg kombinācijai ar azidotimidīnu bija tendence samazināt parenhimatozu limfocītu infiltrāciju ($2,4 \pm 0,2$ pret $3,0 \pm 0,3$ balles, $p>0,05$).

Efavirēnam novērojām lielāku ietekmi uz smadzeņu audiem nekā tā bija sirds audos (publikācija VII), jo tas palielināja kaspāzes-3 ekspresiju peļu smadzeņu audos, salīdzinot ar kontroles grupu ($3,9 \pm 0,4$ pret $2,4 \pm 0,6$ šūnas/mm², $p=0,04$). Mildronāts (devā 100 mg/kg) neatšķīrās no kontroles grupas ($2,9 \pm 0,4$ pret $2,4 \pm 0,6$ šūnas/mm², $p>0,05$). Savukārt, mildronāts kopā ar efavirēnu spēja samazināt efavirēna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju peļu smadzeņu audos ($2,2 \pm 0,1$ pret $3,9 \pm 0,4$ šūnas/mm², $p=0,02$). Efavirēns (50 mg/kg) palielināja arī GFAP pozitīvo šūnu skaitu, salīdzinot ar kontroli ($40,0 \pm 4,8$ pret $23,0 \pm 5,1$ šūnas/mm², $p=0,03$). Mildronāts devā 100 mg/kg neietekmēja GFAP ekspresiju ($16,6 \pm 2,1$), un šie dati bija salīdzināmi ar kontroles grupu. Kombinācijā ar efavirēnu mildronāts samazināja efavirēna izraisīto GFAP ekspresiju ($25,1 \pm 1,8$ pret $40,0 \pm 4,8$ šūnas/mm², $p=0,006$).

Efavirēns izraisīja nelielas deģeneratīvās pārmaiņas peļu smadzenēs (publikācija VII), kas izpaudās kā perēkļveida neironu un perivaskulārā tūska, perivaskulārā limfocītu infiltrācija. Mildronāts kombinācijā ar efavirēnu samazināja neironu pericelulāro un perivaskulāro tūsku.



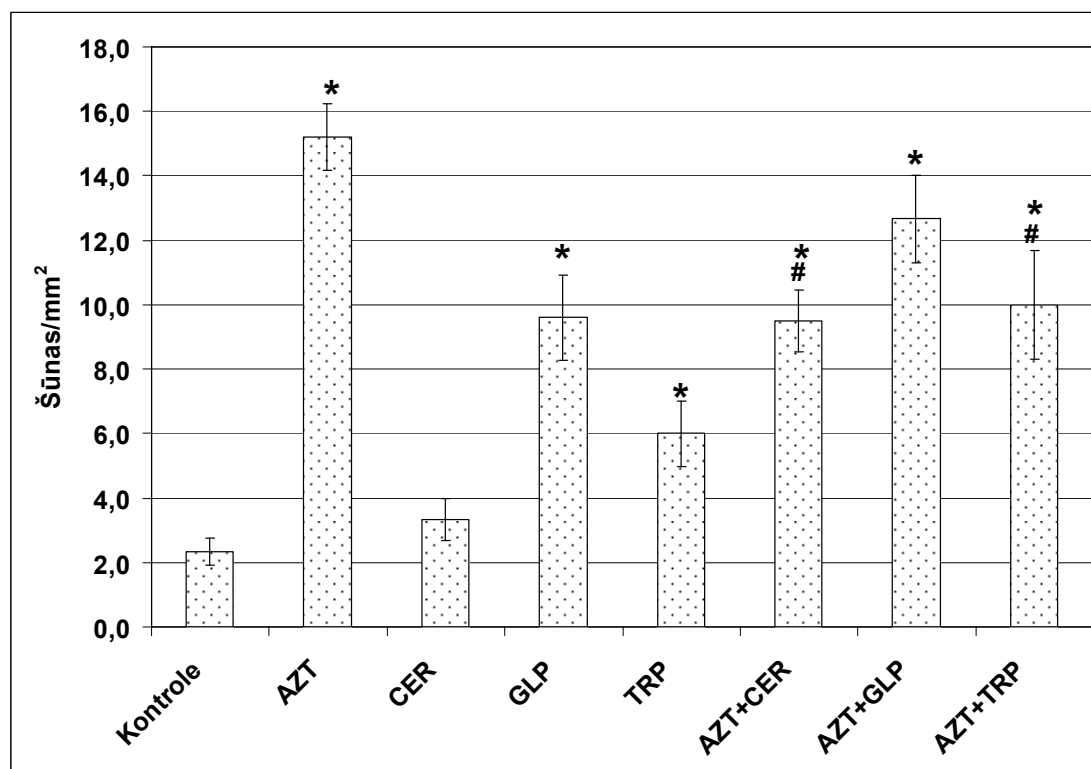
9.attēls. Šūnas apoptozes jutības proteīna (CAS) ekspresija peļu smadzeņu audos (šūnas/mm²). Azidotimidīns (AZT, 50 mg/kg), mildronāts (MIL, 50, 100 vai 200 mg/kg) ievadīti pelēm intraperitoneāli vienreiz dienā divu nedēļu garumā. Statistiskā ticamība izteikta: * p<0,05 pret Kontrolē grupu, #p<0.05 pret AZT grupu, nesapārotais t-tests vai *Mann-Whitney* U-tests.

3.3.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV)

Peļu smadzeņu garozā azidotimidīns izraisīja būtisku (aptuveni pieckārtēju) kaspāzes-3 ekspresiju, salīdzinot ar kontroli ($15,0 \pm 1,0$ pret $2,0 \pm 1,0$ šūnas/mm², $p=0,0002$, 10. attēls). Cerebrokrasts pats neizraisīja palielinātu kaspāzes-3 ekspresiju, savukārt kombinācijā ar azidotimidīnu tas būtiski samazināja azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju ($10,0 \pm 1,0$ pret $15,0 \pm 1,0$ šūnas/mm², $p=0,03$, 10. attēls). Tauopirons un glutapirons palielināja (attiecīgi divkārti un trīskārti) kaspāzes-3 pozitīvo šūnu skaitu, salīdzinot ar kontroli (attiecīgi $6,0 \pm 1,0$ pret $2,0 \pm 1,0$ ($p=0,01$), un $10,0 \pm 1,0$ pret $2,0 \pm 1,0$ ($p=0,0003$) šūnas/mm²). Kombinācijā ar azidotimidīnu tauopirons ($10,0 \pm 2,0$ pret $15,0 \pm 1,0$, šūnas/mm², $p=0,03$), bet ne glutapirons samazināja azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju (10. attēls).

Smadzeņu garozā azidotimidīns izraisīja perēkļveida pericelulāru, perivaskulāru tūsku un perivaskulāru šūnu infiltrāciju. Cerebrokrasts, glutapirons un tauopirons paši neradīja būtiskas histopatoloģiskas pārmaiņas peļu smadzeņu garozā.

Glutapironam un taupironam kombinācijā ar azidotimidīnu bija tendence samazināt azidotimidīna radītos deģeneratīvos un iekaisuma procesus, ieskaitot smadzeņu garozas pericelulāro tūsku un perivaskulāro šūnu infiltrāciju, savukārt cerebrokrastam bija visizteiktākās protektējošās spējas.



10. attēls. Kaspāzes-3 ekspresija peļu smadzeņu audos (šūnas/mm²). Azidotimidīns (AZT, 50 mg/kg), cerebrokrasts (CER, 0,1 mg/kg), glutapirons (GLP, 1 mg/kg) un taupirons (TRP, 1 mg/kg) ievadīti pelēm intraperitoneāli vienreiz dienā divu nedēļu garumā. Statistiskā ticamība izteikta: *p<0,05 pret Kontrolē grupu, #p<0.05 pret AZT grupu, nesapārotais t-tests vai *Mann-Whitney* U-tests.

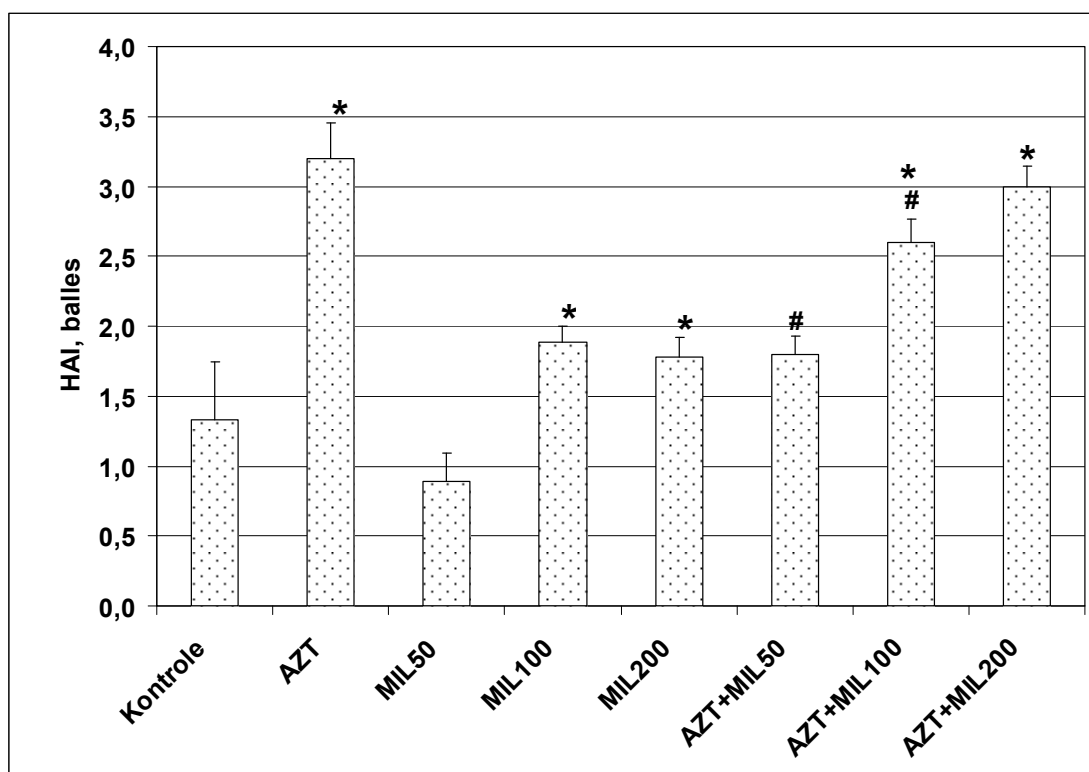
3.4. Mildronāta ietekme uz anti-HIV vielu izraisītajām imūnhistoķīmiskām un morfoloģiskām izmaiņām peļu aknu audos *ex vivo* (publikācijas V un VII)

Azidotimidīns (50 mg/kg) palielināja kaspāzes-3 ekspresiju aknās, salīdzinot ar kontrolē grupu – $33,0 \pm 3,9$ pret $6,2 \pm 1,4$ šūnas/mm², p<0,0001 (publikācija V). Mildronāts devā 200 mg/kg palielināja kaspāzes-3 ekspresiju aknās salīdzinot ar kontrolē grupu, taču šis efekts bija mazāk izteikts kā azidotimidīnam ($17,8 \pm 2,6$ pret $6,2 \pm 1,4$ šūnas/mm², p=0,0008). Mildronāts kombinācijā ar azidotimidīnu devā 50 mg/kg būtiski samazināja azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju peļu aknu audos ($17,7 \pm 2,0$ pret $33,0 \pm 3,9$ šūnas/mm², p=0,003). Mildronāts devā 100mg/kg arī

statistiski ticami samazināja kaspāzes-3 ekspresiju ($21,7 \pm 2,6$ pret $33,0 \pm 3,9$ šūnas/ mm^2 , $p=0,03$), savukārt mildronāta 200 mg/kg kombinācija neietekmēja azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju aknās.

Azidotimidīns izraisīja deģeneratīvās un iekaisuma pārmaiņas peļu aknās (publikācija **V**), kas izpaudās kā hepatocītu vakuolārā un taukainā deģenerācija, paplašināti un infiltrēti ar iekaisuma šūnām portālie trakti, palielināts megakariocītu skaits, samazināts glikogēna saturs hepatocītos, perēkļveida hepatocītu nekroze un apoptoze. Šie kritēriji tika novērtēti pēc histoloģiskā aktivitātes indeksa (HAI) 18 ballu sistēmā: Azidotimidīns izraisīja aknu bojājumu, kas, salīdzinot ar kontroli, pēc HAI skalas atbilda $10,6 \pm 0,6$ pret $1,3 \pm 0,4$, $p<0,0001$ (11. attēls). Mildronāts pats devā 50mg/kg neradīja morfoloģiskās pārmaiņas aknās, salīdzinot ar kontroles grupu, taču devās 100mg/kg un 200mg/kg tas radīja nelielu hepatocītu vakuolāru un taukainu deģenerāciju; HAI attiecīgi pret kontroli: $3,6 \pm 0,4$ pret $1,3 \pm 0,4$ ($p=0,002$), un $3,9 \pm 0,4$ pret $1,3 \pm 0,4$ ($p=0,003$). Kombinējot azidotimidīnu ar mildronātu, konstatējam mildronāta protektīvo darbību, kas visizteiktāk izpaudās mildronāta devā 50 mg/kg, kas statistiski ticami novērsa azidotimidīna izraisītās deģeneratīvās un iekaisuma pārmaiņas ($5,0 \pm 0,2$ pret $10,6 \pm 0,6$ $p<0,0001$, 11. attēls). Mildronāts 100 mg/kg arī samazināja azidotimidīna izmainīto histoloģiskās aktivitātes indeksu: $8,1 \pm 0,6$ pret $10,6 \pm 0,6$, $p=0,01$), bet mildronāta 200 mg/kg kombinācija ar azidotimidīnu neietekmēja azidotimidīna izraisītās morfoloģiskās izmaiņas aknās (11. attēls).

NNRTI viela efavirēns (50 mg/kg), tāpat kā fizioloģiskā kontroles grupa un mildronāta (100 mg/kg) grupa būtiski neietekmēja kaspāzes-3 ekspresiju peļu aknu audos (publikācija **VII**), taču efavirēns izraisīja nelielas deģeneratīvās pārmaiņas peļu aknās, kas izpaudās kā sīkperēkļaina hepatocītu vakuolārā un taukainā deģenerācija. Konstatēja paplašinātus portālos traktus un iekaisuma šūnu infiltrāciju, palielinātu megakariocītu skaitu. Iegūtie kritēriji tika novērtēti pēc HAI četru ballu sistēmā. Efavirēns izraisīja aknu bojājumu, kas pēc HAI skalas, salīdzinājumā ar kontroli atbilst $3,1 \pm 0,3$ pret $0,9 \pm 0,3$ balles, $p<0,0001$. Mildronāts devā 100 mg/kg radīja nelielu hepatocītu vakuolāru un sīkperēkļainu taukainu deģenerāciju, un līdz ar to palielināja HAI, salīdzinot ar kontroles grupu ($1,8 \pm 0,2$ pret $0,9 \pm 0,3$ balles, $p=0,03$). Mildronātam 100 mg/kg kombinācijā ar efavirēnu bija tendence samazināt aknu bojājumus ($2,6 \pm 0,2$ pret $3,1 \pm 0,3$, $p>0,05$).



11. attēls. Deģeneratīvās un iekaisuma pārmaiņas peļu aknu audos izteiktas ar histoloģiskās aktivitātes indeksu (HAI, ballēs). Azidotimidīns (AZT, 50 mg/kg), mildronāts (MIL, 50, 100 vai 200 mg/kg) ievadīti pelēm intraperitoneāli vienreiz dienā divu nedēļu garumā. Statistiskā ticamība izteikta: * $p < 0,05$ pret Kontrolē grupu, # $p < 0,05$ pret AZT grupu, nesapārotais t-tests vai *Mann-Whitney* U-tests.

4. DISKUSIJA

4.1. Mildronāta mitohondrijus protektējošie efekti *in vitro* (publikācija III)

Šajā darbā eksperimentos *in vitro* iegūtie dati liecina par mildronāta protektīvo darbību azidotimidīna izraisītajā mitohondriju toksicitātes testā.

Azidotimidīnu izvēlējamies kā toksisku vielu un parādījām tā mitohondrijus bojājošo efektu, kas sakrīt arī ar literatūras datiem. Mūsu rezultāti rāda, ka azidotimidīns lielās koncentrācijās (5-10 mM) ietekmēja žurku aknu mitohondriju bioenerģētiku, samazinot elpošanas rādītājus (RCR, ADP/O), inhibējot stāvokļa-3 un atjūgto elpošanu un samazinot $\Delta\Psi$ un fosforilācijas efektivitāti galvenokārt ar glutamātu/malātu kā elpošanas substrātu. Tas liecina, ka galvenais azidotimidīna mērķis mitohondrijos ir elpošanas ķēdes komplekss I. Citi dati, kas demonstrē azidotimidīna spēju inhibēt kompleksa I enzīmu NADH citohroma c reduktāzi, liek autoriem domāt par mitohondriju elpošanas ķēdes kompleksu I kā azidotimidīna mērķi šūnā (Lamperth et al., 1991; Modica-Napolitano, 1993). Azidotimidīns rada mitohondriju struktūras izmaiņas, ietekmē elpošanas ķēdes enzīmu aktivitāti, samazina mitohondriālā ATP daudzumu, aktivē reaktīvos skābekļa savienojumus (ROS), palielina pienskābes producēšanos, kā arī rada mitohondriālā DNS un citohroma c bojājumus (Corcuera Pindado et al., 1994; McCurdy and Kennedy, 1998; Badley et al., 2003). Šajā darbā iegūtie rezultāti par lielu azidotimidīna koncentrāciju (5-10 mM) ietekmi uz mitohondriju bioenerģētiku kompleksa I līmenī saskan ar citiem līdzīgiem pētījumiem žurku aknu, nieru, skeleta un sirds muskuļu mitohondrijos (Pereira et al., 1998). Savukārt citu autoru pētījumos azidotimidīns zemās koncentrācijās (0,1 mM) inhibē glutamāta/malāta atkarīgu RCR, kas rodas stāvokļa-4 elpošanas palielināšanās dēļ (Lund and Wallace, 2004).

Azidotimidīns lielās koncentrācijās veicināja ūdeņraža peroksīda (H_2O_2) veidošanos, izmantojot glutamātu/malātu kā elpošanas substrātu. Tā kā azidotimidīns neietekmēja H_2O_2 veidošanos mitohondrijos inhibitoru rotenona + antimicīna A klātbūtnē, tas izslēdz azidotimidīna ietekmi uz H_2O_2 veidošanos kompleksa III līmenī. Turklāt azidotimidīns spēja palielināt H_2O_2 veidošanos bazālos apstākļos (bez inhibitoriem), kas ļauj uzskatīt azidotimidīnu par pro-oksīdantu. Šajā kontekstā interesanti atzīmēt, ka azidotimidīns palielina H_2O_2 veidošanos žurku peritoneālajos

makrofāgos (Komarov et al., 2004) un peļu muskuļu mitohondrijos *ex vivo* pēc azidotimidīna saņemšanas ar dzeramo ūdeni (De la Asuncion et al., 1998).

Azidotimidīns lielās koncentrācijās (5-10 mM) veicināja Ca^{2+} izraisīto MPT tikai par 33%, ko apstiprina arī citu autoru dati žurku aknu (Elimadi et al., 1997) un sirds mitohondrijos (Lund and Wallace, 2004).

Lai noskaidrotu mildronāta protektīvo efektu, pārbaudījām arī pašas vielas ietekmi uz dažādiem rādītājiem izolētos žurku aknu mitohondrijos. Viens no novērojumiem bija tāds, ka mildronāts *per se* neietekmēja žurku aknu izolētu mitohondriju bioenerģētiku, jo neizmainīja elpošanas parametrus – stāvokļa-3 un stāvokļa-4 elpošanu, p-trifluorometoksifenilhidrazona (FCCP) atjūgto elpošanu un elpošanas kontroles koeficientu (RCR), adenozīndifosfāts/skābeklis koeficientu (ADP/O), mitohondriālo transmembrānas potenciālu ($\Delta\Psi$) un fosforilācijas efektivitāti. Iegūtie rezultāti liecina arī, ka mildronāts ne inducēja, ne pasargāja mitohondrijus no kalcija izraisītās mitohondriju membrānas caurlaidības maiņas (MPT). Mildronāts neietekmēja ūdeņraža peroksīda (H_2O_2) veidošanos mitohondriju elpošanas ķēdes kompleksu I un II līmenī, kas norāda, ka mildronāts neveicina un arī nesamazina mitohondriju H_2O_2 veidošanos. Tas norāda, ka savienojums nav toksisks mitohondrijiem.

Svarīgs šī darba atklājums ir tas, ka mildronāts (5-10 mM) uzrādīja mitohondrijus protektējošu efektu samazot azidotimidīna izraisīto stāvokļa-3 un atjūgto elpošanu (ar glutamātu/malātu), kā arī $\Delta\Psi$ inhibīciju un izmaiņas fosforilācijas efektivitātē. Mildronāts ar sukcinātu kā substrātu samazināja azidotimidīna izraisīto fosforilācijas efektivitātes inhibīciju, uz ko norādīja ADP/O koeficients un palielināts fosforilācijas laiks. Šie dati norāda, ka mildronāts pasargā mitohondrijus no azidotimidīna izraisītās toksicitātes, darbojoties kompleksa I līmenī. Mūsu dati saskan ar citu autoru pētījumiem, kuros mildronāts spēja stabilizēt H_2O_2 izraisītās metaboliskās izmaiņas izolētā žurku sirdī, normalizējot samazinātos ATP un ADP daudzumus un palielinot AMP (Akahira et al., 1997). Mildronāta regulatorās spējas kompleksa I līmenī apstiprina šā pētījuma dati, jo mildronāts būtiski samazināja azidotimidīna radīto H_2O_2 veidošanos bazālajos apstākļos un rotenona klātbūtnē (ar glutamātu/malātu kā substrātu). Turklāt mūsu dati rāda, ka mildronāts (līdz 10 mM)

pilnībā novērsa azidotimidīna spēju veicināt Ca^{2+} -inducēto MPT. Tas liecina par mildronāta mitohondrijus protektējošu darbību elpošanas ķēdes kompleksa I līmenī. Kompleksa I disfunkcija var radīt dažādas mitohondriju patoloģijas. Mildronāta spēja normalizēt azidotimidīna izsauktās izmaiņas attiecībā uz bioenerģētikas parametriem, oksidatīvo stresu un membrānas caurlaidības maiņu tika parādīta pirmo reizi šajā darbā. Tam var būt liela nozīme dažādu patoloģiju novēršanā, kuru mērķis ir mitohondriju elpošanas ķēdes komplekss I. Uzska, ka mitohondriālās elpošanas ķēdes kompleksa I bojājumi izraisa ne tikai enerģijas producēšanās traucējumus, bet tie ir arī būtiski neurodeģeneratīvo slimību izraisītāji (Lazarou et al., 2009).

4.2. Pētīto vielu kardioprotektīvie efekti (publikācijas I, II un IV)

4.2.1. Mildronāta efekti (publikācijas I un II)

Šajā pētījumā iegūtie rezultāti rāda, ka mildronāts statistiski ticami samazina anti-HIV vielu izraisīto palielināto kodola faktora kapa Bp65 (NF- κ Bp65) ekspresiju peļu sirds audos. NF- κ B marķieris šajā pētījumā tika izvēlēts, zinot, ka šis transkripcijas faktors ievērojami ekspresējas pie ļoti daudzām slimībām, piemēram, iekaisuma slimībām un vēža (Shmitz et al., 2004). Normāli mitohondriji producē noteiktu reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) daudzumu, kurus inaktīvā glutatona atkarīgas peroksidāzes katalizētas reakcijas. Savukārt oksidatīvā stresa radītā endogēnā antioksidanta glutatona oksidācija ir saistīta ar NF- κ B aktivāciju un mtDNS bojājumu (Dumont et al., 1999). NF- κ B regulē hroniskos iekaisuma procesos iesaistīto iekaisuma mediatoru darbību (Rahman and MacNee, 2000). Turklāt NF- κ B aktivācija ir arī viens no stresa stāvokļu, tai skaitā DNS un audu bojājumu, indikatoriem (Shmitz et al., 2004). NF- κ B aktivāciju var inhibēt glikokortikoīdi, antioksidanti, pretiekaisuma un citas vielas, kas darbojas inhibējot I κ B degradāciju vai inducējot I κ B- α sintēzi (Rahman and MacNee, 1998). Atrasts, ka kardiomiocītos lipopolisaharīds aktivē NF- κ B, samazinot tieši I κ B- β izoformas, nevis I κ B- α daudzumu (Wright et al., 2002). Enzīmi inhibitora kapa B kināzes (IKK), kas fosforilē inhibitoros kapa B (I κ B), atšķiras savā starpā. IKK α piedalās keratinocītu diferenciācijā, kamēr IKK β ir absolūti nepieciešama iekaisuma faktoru izraisītajai NF- κ B aktivācijai (Valen et al., 2001).

Šajā darbā parādījām, ka anti-HIV preparāti izraisa deģeneratīvas un iekaisuma reakcijas sirds audos, izmainot audu morfoloģiskos rādītājus un palielinot

iekaisuma marķiera NF- κ Bp65 ekspresiju. Turklāt šīs anti-HIV vielu (un īpaši azidotimidīna) izraisītās imūnhistoķīmiskās izmaiņas sirds audos korelē ar morfoloģiskajām izmaiņām, kas izpaužas kā perivaskulārā tūska, neliela perēkļveida miokarda taukainā deģenerācija, leukocītu infiltrācija un neliela perēkļveida nekroze. Stavudīna un lamivudīna divu nedēļu intraperitoneāla ievadīšana arī izraisīja morfoloģiskas un histoloģiskas pārmaiņas peļu sirds audos, taču tās bija mazāk izteiktas nekā azidotimidīnam. Ja azidotimidīns palielināja NF- κ Bp65 ekspresiju četras reizes, tad stavudīns un lamivudīns – trīs reizes. To var skaidrot ar šo anti-HIV vielu dažādajām struktūrām. Salīdzinot šo trīs NRTI vielu struktūras, stavudīna struktūra ir līdzīga azidotimidīnam, taču tam nav azido- grupas 3'-pozīcijā, un tas pieder pie 3'-deoksitimidīna 2',3'-didehidro atvasinājumiem. Savukārt lamivudīns pieder pie 2',3'-dideoksi citidīna 3'-tia atvasinājumiem, un 3'-pozīcijā satur sēra grupu. Taču indinavīrs (PI) un efavirēns (NNRTI) pieder anti-HIV vielām, kas atšķiras no NRTI ne tikai ar struktūru, bet arī ar dažādiem darbības mehānismiem. Indinavīrs (PI klases viela) izraisīja kardiomiocītu nekrozi, taukaino deģenerāciju un vakuolizāciju, kā arī palielināja NF- κ Bp65 ekspresiju aptuveni trīs reizes, salīdzinot ar azidotimidīna efektu. Taču efavirēns (NNRTI klases viela) neizraisīja nekādas patoloģiskas pārmaiņas sirds audos. Ātšķirībā no NRTI vielām indinavīra un efavirēna toksiskā darbība uz mitohondrijiem nav skaidri definēta. Lai gan indinavīrs *in vitro* pētījumos pasliktināja mitohondriju funkcijas adipocītos, tā efekts bija vājāks nekā stavudīnam (Viengchareun et al., 2007), savukārt efavirēns, salīdzinājumā ar citiem reversās transkriptāzes inhibitoriem, cilvēku hepatomas šūnu līnijās neizraisīja mitohondriju toksicitāti (Walker et al., 2002). Tādējādi iespējams, ka indinavīra un efavirēna toksiskie efekti tiek realizēti caur citiem mehānismiem.

Mēs pirmo reizi parādījām mildronāta spēju pasargāt sirds audus anti-HIV vielu kardiotoksicitātes modelī pelēm. Salīdzinot mildronāta trīs devu (50, 100, vai 200 mg/kg) efektu uz azidotimidīna izraisītajiem sirds audu bojājumiem, iegūti rezultāti, kas liecina, ka mildronāts atkarībā no devas darbojas dažādi. Pārsteidzoši, ka mildronāts devās 50 un 100 mg/kg izraisīja lielāku, turklāt statistiski ticamu NF- κ Bp65 ekspresiju, ko nenovēroja devā 200 mg/kg. Taču tajā pašā laikā visu trīs mildronāta devu kombinācijas ar azidotimidīnu būtiski samazināja NF- κ Bp65 pozitīvo šūnu skaitu, un visaktīvākā mildronāta deva bija 200 mg/kg, kas kombinācijā

ar azidotimidīnu samazināja NF-κBp65 ekspresiju līdz kontroles līmenim. Jautājumi, kāpēc mildronāta mazākas devas (50 un 100 mg/kg), bet ne lielākā (200 mg/kg), izraisa palielinātu NF-κBp65 ekspresiju, un kāpēc visas mildronāta devas samazina azidotimidīna izraisīto NF-κBp65 pārmērīgo ekspresiju, paliek atklāti. Mūsu pētījumā visefektīvākā mildronāta deva, kas samazināja palielināto NF-κBp65 ekspresiju sirds audos, bija 200 mg/kg. NF-κB piedalās daudzos šūnu procesos. Zināms, ka NF-κB regulē daudzu iekaisumā iesaistītu gēnu, piemēram, iekaisuma citokīnu – IL-1β, IL-6, TNF-α, ekspresiju (Rahman and Macnee, 2000). Taču izolētos kardiomiocītos parādīts, ka NF-κB aktivatori – IL-1β un sintētiskā viela PMA (forbola 12-miristāta 13-acetāts) – aktivējot šo transkripcijas faktoru, tomēr neaktivē TNF-α. Tādējādi var domāt, ka NF-κB ne tikai piedalās citokīnu veidošanā, bet arī (caur citiem ceļiem) var aizsargāt kardiomiocītus (Wright et al., 2002). NF-κB piedalās arī apoptozes regulācijā, pasargājot šūnas no bojāejas. Tādēļ šī transkripcijas faktora nozīme šūnu izdzīvošanas spējā ir multidimensionāla (Valen et al., 2001). Iespējams, ka eksistē kāds šī transkripcijas faktora aktivācijas sliekšnis, kuru pārsniedzot, novēro patoloģiskas pārmaiņas audos, taču to nepārsniedzot, novēro protektīvu darbību. Tādēļ var izteikt hipotēzi, ka NF-κB aktivācija, kas ir apmēram līdz divām reizēm lielāka par kontroles lielumu (kā šajos rezultātos no mildronāta 50 un 100 mg/kg devām) darbojas kardioprotektīvi. Šie mūsu dati zināmā mērā saskan ar pētījumiem, kur mildronāts ietekmēja šūnas kodola funkcijas, aktivējot DNS replikāciju un reparāciju daudzos orgānos, tai skaitā sirdī, kā arī pastiprinot genoma ekspresiju un palielinot pre-mRNS (pre matricas ribonukleīnskābes) sintēzi (Шутенко и др., 1995). Tajā pašā laikā NF-κB aktivācija, kas to pārsniedz (šajā pētījumā azidotimidīna grupai novēro četras reizes lielāku NF-κBp65 pozitīvo šūnu skaitu nekā kontroles grupai), liecina par iekaisuma procesiem peļu sirds audos. Šie dati saskan arī ar morfoloģiskajiem pētījumiem, kas uzrāda, ka azidotimidīna grupai novēro kardiomiocītu nekrozi, taukaino deģenerāciju, perivaskulāro tūsku un limfohistiocitāro infiltrāciju. Savukārt mildronāta mazākā deva (50 mg/kg) neizraisa nekādas morfoloģiskas izmaiņas, kamēr mildronāta lielākās devas (100 un 200 mg/kg) izraisa tikai nelielu perivaskulāro tūsku. Taču visu trīs mildronāta devu kombinācija ar azidotimidīnu samazina azidotimidīna izraisītās morfoloģiskās izmaiņas. Mildronāta protektīvo darbību azidotimidīna kardiotoksicitātes modelī varētu skaidrot ar tā mitohondriju protektējošo darbību.

Mildronāts (100 mg/kg) statistiski ticami samazināja arī stavudīna un lamivudīna izraisīto palielināto NF-κBp65 ekspresiju un nekrozi, taču neietekmēja šūnu infiltrāciju. Mildronāts devā 100 mg/kg arī būtiski samazināja indinavīra radīto NF-κBp65 ekspresiju, taču neietekmēja morfoloģiskās izmaiņas šajā toksicitātes modelī. Iespējams, ka citas anti-HIV toksiskās modeļvielas darbojas ne tikai caur mitohondriāliem, bet arī caur citiem šūnas procesiem, tādēļ mildronāta kardioprotektīvā darbība katrā modelī ir atšķirīga.

Mildronātam arī iepriekšējos pētījumos parādīti kardioprotektīvi efekti, kas izskaidroti ar dažādiem darbības mehānismiem. Piemēram, mildronāta divu nedēļu ievadīšana caur karnitīna regulāciju efektīvi samazina infarkta lielumu žurku sirdīs (Liepinsh et al., 2006), un ilgstoša mildronāta ievadīšana aizkavē aterosklerozes attīstību peļu aortās (Vilskersts et al., 2009). Šie kardioprotektīvie rezultāti tiek skaidroti ar karnitīna biosintēzes inhibīciju, palielinot gamma butirobetaīna (GBB) koncentrāciju, kas var aktivēt NO sintēzi audos (Dambrova et al., 2002). Savukārt NO piemīt citoprotektējoša un pretiekaisuma darbība, inhibējot NF-κB mediēto gēnu ekspresiju (Hattori et al., 2004; Lozano et al., 2005). Citu autoru pētījumi rāda, ka mildronāts samazina pienskābes un palielina ATP daudzumu sirds audos pēc sirds artēriju oklūzijas (Hayashi et al., 2000), kā arī novērš ATP daudzuma samazināšanos izoletās žurku sirdīs hipoksijas laikā (Asaka et al., 1998).

4.2.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV)

Interesanti rezultāti tika iegūti, pētot 1,4-dihidropiridīnu ietekmi uz azidotimidīna-izraisīto toksicitāti peļu sirds audos. Cerebrokrasts (0,1 mg/kg) samazināja ne tikai NF-κBp65 un kaspāzes-3 ekspresiju, bet arī azidotimidīna izraisītās histopatoloģiskās izmaiņas peļu sirds audos, tādējādi uzrādot pretiekaisuma un anti-apoptotisku darbību. Šie dati ļauj domāt, ka cerebrokrasts darbojas kardioprotektīvi, iesaistot mitohondriālos procesus. Par to liecina arī citi pētījumi. Cerebrokrastam *in vitro* testos novērota pozitīva ietekme uz mitohondriālajiem procesiem (Vlena et al., 1997). Šis savienojums, atbildot uz ATP, palielina uzbriedušu mitohondriju kontrakcijas intensitāti un amplitūdu, kā arī normalizē oksidatīvo fosforilāciju (Vlena et al., 1997). Cerebrokrasts samazina kompleksa I inhibitora MPP⁺ radīto ROS produkciju un mitohondriju membrānas potenciāla zudumu (Klimaviciusa et al., 2007), kā arī pasargā mitohondriju iekšējo membrānu,

nepieļaujot pārmērīgu kalcija jonu atpakaļuzņemšanu mitohondrijos (Fernandes et al., 2003). Ļoti būtisks cerebrokrasta efekts ir uz iekaisuma procesiem, jo pētījumi rāda, ka cilvēku monocītu THP-1 šūnu līnijās tas selektīvi inhibē IL-1 β un IL-6 sekrēciju (Klegeris et al., 2002). Tā kā NF- κ B regulē daudzu iekaisumā iesaistītu gēnu, tai skaitā arī iekaisuma citokīnu IL-1 β un IL-6, ekspresiju, var uzskatīt, ka cerebrokrasts, inhibējot šo neirotoksisko citokīnu ekspresiju, inhibē arī NF- κ B aktivāciju.

Glutapirona (1 mg/kg) darbība sirds audos bija līdzīga cerebrokrasta darbībai, taču mazāk izteikta. Glutapirons statistiski ticami samazināja gan NF- κ Bp65, gan kaspāzes-3 ekspresiju, savukārt no azidotimidīna radītajam morfoloģiskajām izmaiņām glutapirons ticami samazināja tikai šūnu infiltrāciju. Glutapironam, atšķirībā no cerebrokrasta, iepriekšējos pētījumos nav novērots pozitīvs efekts uz MPP⁺ radītajiem bojājumiem (Klimaviciusa et al., 2007), taču tas spēj *in vitro* testos novērst azidotimidīna izraisīto mitohondriju agregāciju (Veleno et al., 1997). Turklāt glutapironam piemīt arī antioksidanta īpašības, un tas pasargā miokarda mitohondriju membrānu lipīdus no peroksidācijas (Utano et al., 1989).

Turpretī tauropirons sirds audos palielināja NF- κ Bp65 ekspresiju gandrīz līdz azidotimidīna līmenim, kā arī uzrādīja tendenci palielināt miokarda šūnu infiltrāciju, kas liecina par iekaisuma procesiem. Tas zināmā mērā saskan ar pētījumiem smadzenīšu graudainajās nervu šūnās, kur 10 μ M tauropirons palielināja MPP⁺-izraisīto ROS veidošanos (Klimaviciusa et al., 2007). Tā kā palielināta ROS veidošanās var aktivēt NF- κ B (Gauss et al., 2007), šī pētījuma dati apstiprina tauropirona spēju radīt iekaisuma reakcijas. Pārsteidzoši, ka tauropirons samazināja azidotimidīna radīto pārmērīgo NF- κ Bp65 ekspresiju un kaspāzes-3 aktivāciju sirds audos līdzīgi cerebrokrastam un glutapironam, kas liecina par šī savienojuma duālo darbību. Šo aminoskābju saturošo DHP savienojumu darbības mehānismi pagaidām paliek neizskaidroti. Tauropirons līdz šim vēl nav pētīts *in vivo* un tā farmakoloģiskās īpašības nav zināmas. Pētīt tauropironu salīdzinājumā ar citiem DHP šajā darbā šķita intriģējoši tā sastāvā esošā taurīna dēļ. Taurīns, sēru saturoša aminoskābe, kas rodas metionīna metabolisma rezultātā, netiek izmantots proteīnu sintēzē un pārsvarā atrodas brīvā veidā vai vienkāršos peptīdos. Lai gan taurīna loma nav īsti zināma, ir aprakstītas dažādas tā bioloģiskas un fizioloģiskas īpašības, tai skaitā antioksidanta, pretiekaisuma, neimodulējošas, imūnmodulējošas īpašības un spēja aizsargāt fotoreceptorus (Lombardini, 1991; Lourenco and Camilo, 2002; Bouckennooghe et al.,

2006). Literatūrā par taurīnu ir atrodamī pretrunīgi dati. Gan *in vitro*, gan *in vivo* pētījumi ir uzrādījuši, ka taurīns darbojas protektīvi. Piemēram, 1-10 mM taurīns pasargāja miokarda mitohondrijus, samazinot mitohondriju iekšējās membrānas caurlaidības maiņu (Palmi et al., 1999). Izolētos žurku sirds audos taurīns (10 mM) atjaunoja sirds funkciju pēc ilgstošas hipotermijas, samazinot DNS oksidāciju un šūnas apoptozi (Oriyanhan et al., 2005). Klīniskie pētījumi uzrādījuši, ka taurīnam (1,5 – 6 g/dienā) ir pozitīvi efekti sirds sastrēguma slimības, diabēta, hipertenzijas un hiperlipidēmijas pacientiem, taču tā darbības mehānismi vēl nav noskaidroti (Xu et al., 2008).

4.3. Pētīto vielu neiroprotektīvie efekti (publikācijas IV, VI)

4.3.1. Mildronāta efekti (publikācija VI)

Lai novērtētu vielu ietekmi uz smadzeņu audiem, mēs izvēlējāmies marķierus, kas liecina par neironu mitohondriju bojājumiem (citohroma c oksidāze) un neironu bojāeju (kaspāze 3; šūnas apoptozes uzņēmības proteīns, CAS), iekaisumu (inducējamā slāpekļa oksīda sintāze, iNOS) kā arī glijas astrocītu bojājumiem (glijas fibrilārais skābais proteīns, GFAP). Mitohondriju bojājumi pārrauj mitohondriju elpošanas ķēdi, kas izraisa citohroma c nonākšanu citoplazmā, kaspāžu aktivāciju un tai sekojošu šūnas bojāeju.

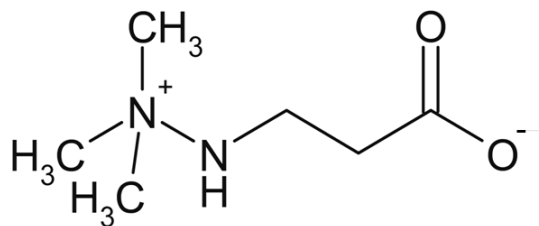
Šī pētījuma dati parāda, ka azidotimidīns arī smadzeņu audos izraisa deģeneratīvās un iekaisuma pārmaiņas peļu smadzenēs, kas izpaužas kā palielināta iNOS ekspresija, perēkļveida neironu un perivaskulārā tūska, perivaskulārā limfocitārā infiltrācija, astroglioze (pastiprināta GFAP ekspresija), perēkļveida neironu apoptoze (palielināta kaspāzes-3 un CAS ekspresija), kā arī mitohondriju elpošanas ķēdes bojājumi (samazināta citohroma c oksidāzes ekspresija). Interesanti rezultāti tika iegūti attiecībā uz citohroma c oksidāzes ekspresiju. Azidotimidīns peļu smadzeņu audos palielināja citohroma c oksidāzes ekspresiju, nosakot ar *Western blot* un semi-kvantitatīvi pēc imūnkrāsojuma intensitātes, taču tajā pašā laikā samazināja citohroma c oksidāzes pozitīvo šūnu skaitu, nosakot imūnhistoķīmiski. Šo efektu varētu skaidrot ar to, ka citohroma c oksidāze ir ekspresēta visos smadzeņu neironos (kontroles grupai novērojam vieglu un vidēju imūnkrāsojuma intensitāti), taču azidotimidīna grupai bija samazināts citohroma c oksidāzes pozitīvos šūnu skaits un palielināta imūnkrāsojuma intensitāte. Palielināta imūnkrāsojuma intensitāte

iespējams rodas no pārlietu lielas citohroma c oksidāzes aktivācijas, kas iespējams ir saistīta ar šūnu oksidatīvo stresu un bojājumiem. Savukārt samazināts citohroma c oksidāzes pozitīvo šūnu skaits varētu būt tādēļ, ka bojātās šūnas neekspresē šo enzīmu. Mūsu datus zināmā mērā arī izskaidro neseni pētījumi, kur pacientiem ar hronisku nieru slimību novēroja palielinātu citohroma c oksidāzes ekspresiju un tajā pašā laikā samazinātu citohroma c oksidāzes aktivitāti, to skaidrojot ar mitohondriju oksidatīvās forforilācijas sistēmas kompensatorajiem mehānismiem (Granata et al., 2009). Arī efavirēns, kurš neradīja toksisku ietekmi uz peļu sirds audiem, smadzenēs palielināja kaspāzes-3 un GFAP ekspresiju, kā arī morfoloģiski izraisīja nelielu tūsku un iekaisuma šūnu infiltrāciju.

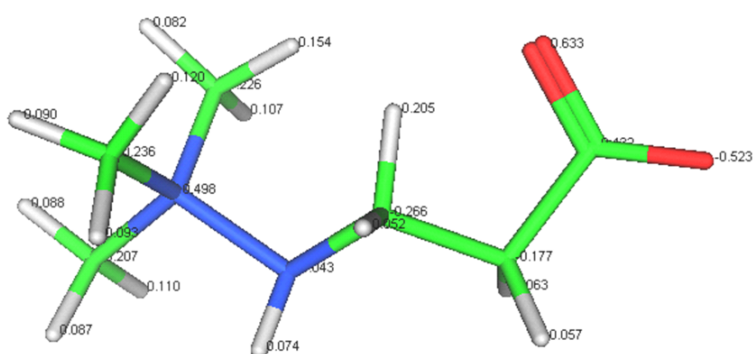
Visizteiktākā mildronāta pret iekaisuma (samazinot iNOS ekspresiju un morfoloģiskās izmaiņas) un anti-apoptotiskā (samazinot kaspāzes-3 un CAS ekspresiju) darbība izpaudās devās 50 un 100 mg/kg, savukārt GFAP ekspresiju samazināja devas 100 un 200 mg/kg. Mildronāts arī normalizēja citohroma c oksidāzes ekspresiju. Devā 200 mg/kg mildronāts *per se* radīja nelielu perivaskulāru tūsku un limfocītu infiltrāciju, norādot, ka iespējams šī deva ir toksiska smadzeņu audiem. Efavirēna toksicitātes modelī mildronāts devā 100 mg/kg arī būtiski samazināja kaspāzes-3 un GFAP ekspresiju, kā arī samazināja perivaskulāru un pericelulāru tūsku. Līdzīgi kā NF- κ B, iNOS var gan aizsargāt šūnas, gan, pārmērīgi ekspresēts, izraisīt šūnu bojājumus (Brüne et al., 1998) un veicināt iekaisuma reakcijas (Vallance and Leipner, 2002). Kaspāze-3 un CAS abi ir apoptozes marķieri, taču tiem ir atšķirīgas lomas apoptozes procesā. Kaspāze-3 darbojas kā viens no galvenajiem apoptozes izpildītājiem (Lakhani et al., 2006). Lai gan CAS loma vēl nav skaidri definēta, var uzskatīt, ka šis proteīns aktivē tieši apoptozes iniciatorus, piemēram, kaspāzi-9 (Kim et al., 2008). Mūsu dati liecina par mildronāta protektīvo darbību ne tikai neironu, bet arī astroglijas līmenī. GFAP ir nozīmīgs glijas astrocītu strukturāls proteīns, kas nodrošina signāla pānesi starp neironiem, glijas šūnām un asinsvadiem (Allen and Barres, 2009). Šis proteīns nodrošina mehānisko izturību, iedarbojoties arī ar citiem starpfilamentiem (Zigmond et al., 1999). Pētījumos pierādīts, ka GFAP var tikt izmantots kā neironu un glijas šūnu bojājumu marķieris, jo tas ir paaugstināts dažādu patoloģiju gadījumos (Holmberg et al., 1998; Tullberg et al., 1998). Neuroiekaisuma laikā astrocīti pārcieš reaktīvu astrogliozi, kam raksturīga ne tikai palielināta GFAP ekspresija, bet arī šūnu proliferācija, hipertrofija, palielināta

neirotrofīnu, pleijotrofīnu un iekaisuma mediatoru sintēze (Marchetti and Abbraccio, 2005). Šāda veida astroglioze novērojama neurodeģeneratīvu saslimšanu un traumatisku vai hipoksisku insultu gadījumos (Di Virgilio et al., 2009).

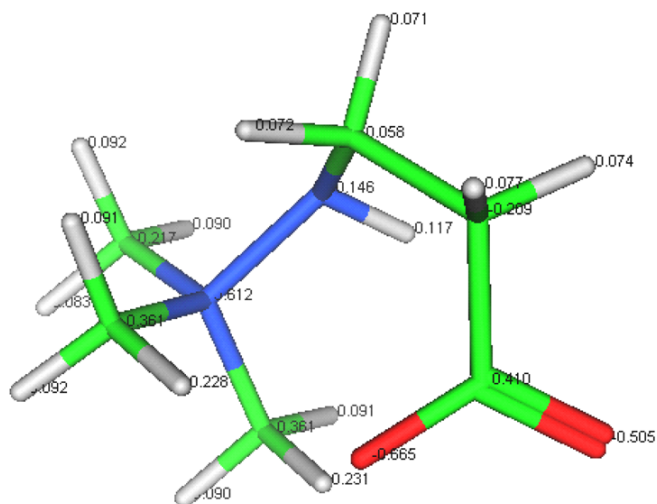
Mildronāta efekti uz peļu smadzeņu audiem *ex vivo* līdz šim vēl nebija veikti, tādēļ iegūtie dati par tā anti-apoptotisko un anti-deģeneratīvo darbību ir vērā ņemami. Iepriekšējos citu autoru pētījumos bija parādīta mildronāta efektivitāte smadzeņu cirkulācijas traucējumos un centrālās nervu sistēmas funkciju nodrošināšanā, iespējams darbojoties caur slāpekļa oksīda atkarīgu mehānismu, jo mildronāta (50 mg/kg) intraperitoneāla ievadīšana palielināja slāpekļa oksīda daudzumu žurku smadzeņu garozā un smadzenītēs (Sjakste et al., 2005). Mēs domājam, ka mildronāta protektīvā darbība smadzenēs ir saistīta ar tā spēju regulēt mitohondriālos procesus. Mūsu dati rāda, ka mildronāta protektīvā darbība peļu smadzeņu audos pret azidotimidīna izraisītajām deģeneratīvajām un iekaisuma pārmaiņām tika novērota visās trīs devās atkarībā no noteiktā proteīna, taču lielāku aktivitāti mildronāts tomēr uzrādīja mazākajās (50 un 100 mg/kg) devās, norādot uz to, ka smadzeņu audi ir jutīgāki pret mildronātu iespējams pateicoties tā spējai tikt transportētam uz smadzeņu šūnām. Pašlaik nav iespējams viennozīmīgi atbildēt, vai un kā mildronāts šķērso hemato-encefālisko barjeru, taču ir vairāki argumenti, kas liecina par tā penetrācijas spēju. Pirmkārt, mūsu pētījuma rezultāti rāda, ka mildronāts ietekmē smadzeņu šūnu procesus. Otrkārt, lai gan agrākos pētījumos bija noskaidrots, ka mildronāts darbojas kā organiskā katjonu transportiera OCTN2 (kurš efektīvi transportē karnitīnu šūnā) konkurējošais inhibitors (Grube et al., 2006), nesen cilvēka embrija nieru šūnu līnijā novēroja, ka OCTN2 nodrošina gan mildronāta, gan strukturāli līdzīgā karnitīna, efektīvu transportu cauri plazmātiskajai membrānai (Grigat et al., 2009). Turklāt ir ziņas, ka šāds transportieris atrodas arī šūnās, kas veido hemato-encefālisko barjeru (Miecz et al., 2008), tādējādi iespējams, ka tas transportē arī mildronātu uz smadzenēm. Treškārt, mēs uzskatām, ka mildronāts ir mazo struktūru (*small molecules*) pārstāvis ar būtisku farmakoforu – pozitīvi lādētu slāpekli, kas saistoties ar molekulas negatīvi lādēto skābekli, spēj izveidot ciklisku struktūru (12. attēls). Ciklisku struktūru spēja vieglāk nekā lineāru struktūru penetrēt barjeras ir vispārzināma. Līdz ar to var spriest, ka mildronāta struktūra ir piemērota penetrācijai caur šūnas membrānai un mitohondriju ārējai membrānai, sasniedzot iekšējo membrānu un uz tās esošos kompleksus. Līdz ar to tas var veicināt mildronāta spēju darboties mitohondriju līmenī un realizēt daudzpusīgas funkcijas.



A



B



C

12. attēls. Mildronāta struktūra (A) un tā lineārās (B) un cikliskās (C) konformācijas modeļi, kas atkarīgi no vides pH. Lineārajai konformācijai ir hidrofilas īpašības, līdz ar to mildronāts ir ūdenī šķīstošs, tāpēc ka abi lādētie atomi (slāpekklis zilā krāsā un skābeklis – sarkanā) spēj mijiedarboties, tos var šķīdināt ūdens molekulas vai tie var iedarboties ar asins serumā esošajām skābēm vai bāzēm. Pretēji, kad mildronāts ir cikliskā konformācijā, lādētie atomi kompensē abpusējo elektrisko lādiņu caur intramolekulāro elektrostātisko mijiedarbību, un lipofīlie ūdeņraža atomi (pelekā krāsā) tiek eksponēti uz mildronāta molekulas virsmas. Šādā formā mildronāts ir garndrīz neitrāla molekula, kas viegli spēj penetrēt smadzenēs un šūnās caur lipīdu dubultslānim. Cipari parāda atomu parciālo lādiņu (negatīvi lādētais skābeklis ir sarkanā krāsā).

4.3.2. Dihidropiridīnu efekti (publikācija IV)

Interesantu efektus uzrādīja pētītie 1,4-dihidropiridīnu analogi. Cerebrokrasts (0,1 mg/kg) smadzeņu audos samazināja azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3 ekspresiju un histopatoloģiskās izmaiņas, tādējādi uzrādot anti-apoptotisku darbību, taču atšķirībā no mildronāta efekta cerebrokrasta aktivitāte nerasniedza kontroles līmeni. Cerebrokrasta neiroprotektīvā darbība azidotimidīna toksicitātes modelī *ex vivo* domājams ir pateicoties tā bicikliskajai struktūrai, fluora joniem un garajām alifātiskajām 2-propoksietil- sānu ķēdēm, kas piešķir molekulai augstu lipofilitāti. Tādējādi cerebrokrasts var viegli šķērsot ne tikai HEB, bet arī šūnas plazmas membrānu, sasniedzot mitohondriju iekšējās membrānas komponentus, to skaitā kompleksu I, ko apstiprina iepriekšējie pētījumi (Klimaviciusa et al., 2007; Fernandes et al., 2003). Cerebrokrasts uzrādīja arī ilgstošus neiroprotektīvus efektus dažādos neirodeficīta modeļos (Klusa, 1995).

Savukārt glutapirons, kura molekula satur glutamīnskābes atlikumu, piesaistītu DHP ciklam ceturtajā pozīcijā, uzrādīja pro-apoptotisku darbību (pieckārtīgi palielinot kaspāzes-3 aktivitāti), bet nespēja samazināt azidotimidīna izraisīto apoptozi, kas norāda uz audu specifisku darbību, jo sirids audos šis 1,4-dihidropiridīnu savienojums būtiski samazināja azidotimidīna izraisīto palielināto kaspāzes-3 ekspresiju. Iespējams, ka glutapirona efektus smadzeņu audos nosaka tā sastāvā esošais glutamāts, kura loma kalcija jonu regulācijā ir vispārzināma.

Tauropirons, kuram DHP cikla ceturtajā pozīcijā piesaistīta aminoskābe taurīns, peļu smadzeņu garozā arī uzrāda darbības duālismu – gan pro-, gan anti-apoptotiskus efektus. Šos efektus grūti izskaidrot ar struktūras determinantēm – taurīnu vai dihidropiridīna gredzenu. Līdz šim bijuši publicēti dati pārsvarā tikai par taurīnu. Iepriekšējos pētījumos taurīns (1 mM) samazināja iekšūnas Ca^{2+} homeostāzi, uzlabojot mitohondriju funkcijas un regulējot iekšūnas (citoplazmas un mitohondriālo) kalcija homeostāzi (El Idrissi & Trankner, 2003). Dzeramajam ūdenim pievienotais taurīns (0.05%) aizsargāja neironus no kaināta citotoksicitātes un regulēja kalcija homeostāzi (El Idrissi et al., 2003), kā arī *per os* devā 60 mg/kg pelēm uzrādīja anksiolītisku efektu (Chen et al., 2004). Taču augstākminētie taurīna efekti ir uzrādīti daudz lielākās devās, nekā šajā pētījumā tauropirona sastāvā. Tādēļ aktīvējošos (iekaisumu un apoptozi veicinošos) taurīnu saturošā DHP atvasinājuma efektus šajā pētījumā var uzskatīt par mazas devas fenomenu, kam iespējams nav sakara ar brīvā

taurīna efektiem. Tauropirons uzrādījis interesantus rezultātus iepriekšējos *in vitro* pētījumos, pastiprinot ROS veidošanos un nepasargājot smadzenīšu graudainās nervu šūnas (Klimaviciusa et al., 2007), taču pasargājot šīs šūnas no vidējas intensitātes skābekļa-glikozes deprivācijas (Klimaviciusa et al., 2005).

Salīdzinot pētītos DHP var secināt, ka tikai bicikliskās struktūras savienojums cerebrokrasts šajā darbā uzrāda pilnīgu pretiekaisuma un anti-apoptotisku darbību. Tas atšķir cerebrokrastu no aminoskābju saturošajiem DHP glutapirona, kurš uzrādīja pro-apoptotisku darbību, un tauropirona, kuram novēroja duālu – pro- un anti-apoptotisku darbību.

4.4. Mildronāta hepatoprotektīvais efekts (publikācija V)

Azidotimidīns (50 mg/kg, ievadīts pelēm intraperitoneāli, vienreiz dienā, divas nedēļas) izraisīja deģeneratīvās un iekaisuma pārmaiņas peļu aknās un palielināja (vismaz piecas reizes) kaspāzes-3 ekspresiju, kas liecina par azidotimidīna hepatotoksisko darbību. Arī NNRTI viela efavirēns izraisīja nelielas deģeneratīvas izmaiņas peļu aknu audos, kā piemēram, hepatocītu vakuolāro un taukaino deģenerāciju, taču neietekmēja kaspāzes-3 ekspresiju.

Mildronāts *per se* devā 50 mg/kg neizraisīja histopatoloģiskas izmaiņas, taču 100 mg/kg palielināja histoloģiskās aktivitātes indeksu (HAI) trīs reizes, galvenokārt izraisot hepatocītu sīkperēkļaino taukaino deģenerāciju, bet neradot apoptozi. Savukārt deva 200 mg/kg divreiz palielināja kaspāzes-3 ekspresiju, tātad bija pro-apoptotiska, un izraisīja hepatocītu sīkperēkļaino taukaino deģenerāciju un nelielu iekaisuma šūnu infiltrāciju portālajos traktos. Hepatoprotektīva mildronāta darbība azidotimidīna toksicitātes modelī izpaudās devās 50 un 100 mg/kg, bet ne 200 mg/kg. Efavirēna hepatotoksicitātes modelī mildronāts (100 mg/kg) līdzīgi kā azidotimidīna gadījumā pats radīja nelielu hepatocītu taukaino deģenerāciju, bet kombinācijā ar efavirēnu uzrādīja tendenci samazināt efavirēna radītās morfoloģiskās pārmaiņas.

Šī pētījuma dati par mildronāta lielās devas (200 mg/kg) iespējamo toksisko darbību aknu audos zināmā mērā sakrīt ar iepriekšējiem pētījumiem. Tajos parādīts, ka žurkām, kuras 3-6 nedēļas saņēma mildronātu 200 mg/kg devā, novēroja aknu taukaino deģenerāciju, garo ķēžu acil-koenzīma A akumulāciju hepatocītu citosolā, aknu peroksisomu proliferāciju, izteiktu aknu karnitīna samazināšanos, samazinātu palmitāta metabolismu *in vivo* un palielinātu ļoti zema blīvuma lipoproteīnu daudzumu (Spaniol et al., 2003). Pretrunas mildronāta dažādu devu iedarbībā uz aknu

audiem ir grūti viennozīmīgi izskaidrot. Acīmredzot, aknu audi, līdzīgi smadzeņu audiem, ir jutīgāki nekā sirds audi, kuros 200 mg/kg deva neuzrādīja nekādas būtiskas toksiskas pazīmes.

Vispārējie secinājumi

Šajā darbā mēs demonstrējām četru dažādu vielu – azabutirobetaīna klases pārstāvja mildronāta un 1,4-dihidropiridīnu atvasinājumu – cerebrokrasta (ar tipisku biciklisku struktūru), glutapirona un tauopirona (aminoskābju saturošus) – protektīvo darbību anti-HIV vielu toksicitātes modeļos *in vitro* un *ex vivo* testos. Pirmo reizi esam parādījuši mildronāta spēju protektēt mitohondriālos procesus kompleksa I līmenī. No pētītajām vielām visstabilākos efektus *ex vivo* uzrādīja mildronāts un cerebrokrasts, protektējot sirds, smadzeņu un aknu audus no anti-HIV vielu izraisītajiem iekaisuma un apoptotiskajiem bojājumiem. Mildronāta pretiekaisuma un anti-apoptotiskā darbība variēja atkarībā no devas un no audu veida. Piemēram, ja peļu sirds audos visefektīvākā pretiekaisuma deva bija 200 mg/kg, tad aknu un smadzeņu audos izteikti anti-apoptotisku darbību mildronāts uzrādīja mazākajās devās – 50 un 100 mg/kg. Arī cerebrokrasts peļu sirds un smadzeņu audos uzrādīja pretiekaisuma un antiapoptotisku efektu, taču tie nerasniedza kontroles līmeni. Savukārt aminoskābes saturošie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi glutapirons un tauopirons izraisīja darbības duālismu – gan iekaisumu un apoptozes veidošanos, gan protektīvu darbību, kas liek domāt, ka mitohondriji nav glutapirona un tauopirona galvenie mērķi šūnā.

Mildronāta un cerebrokrasta protektīvie efekti dažādos šūnas funkciju un signālmolekulu līmeņos ļauj spriest, ka šo vielu struktūru elementiem (farmakoforiem) ir būtiska loma mitohondriju aizsargāšanā. Mildronāts, kas satur četrvērtīgu slāpekli, un cerebrokrasts, kura bicikliskā struktūra ietver trīsvērtīgo slāpekli, acīmredzot, ir optimālas struktūras, kas spēj nodrošināt šūnas izdzīvošanai nepieciešamo regulējošo/protektējošo/stabilizējošo darbību plašā enzimatisko kaskāžu un proteīnu molekulu diapazonā. To lielā mērā nodrošina vielu darbības fokuss uz šūnas mērķi – mitohondrijiem. Uz šo vielu bāzes var dizainēt jaunus savienojumus, kuri būtu perspektīvi mitohondriālo patoloģiju novēršanā. Tas dod cerību radīt preparātus dažādu deģeneratīvu saslimšanu, to skaitā neurodeģeneratīvo slimību (Parkinsona slimības, Alzheimeras slimības u.c.) profilaksei un terapijai.

SECINĀJUMI

1. Mildronāts (aza-butirobetaīna klases viela) protektē azidotimidīna izraisītās izmaiņas žurku aknu izolētu mitohondriju bioenerģētikā, mitohondriju membrānas caurlaidībā un ūdeņraža peroksīda veidošanās procesā, uzlabojot galvenokārt mitohondriju elpošanas ķēdes funkcijas kompleksa I līmenī. Šie dati liecina, ka mitohondriji ir būtisks mildronāta darbības mērķis.
2. Anti-HIV modeļvielas (NRTI vielas – stavudīns, lamivudīns un īpaši azidotimidīns, PI – indinavīrs un NNRTI – efavirēns), kas ievadītas 50 mg/kg devā intraperitoneāli (i.p.) divas nedēļas, rada toksiskas izmaiņas peļu sirds, smadzeņu un aknu audos *ex vivo*, izraisot iekaisuma un deģeneratīvas pārmaiņas. Tās izpaužas kā palielināta iekaisuma, apoptozes un glijas reaktivitātes marķieru – NF-κBp65, iNOS, kaspāzes-3, CAS, GFAP ekspresija, izmainīta citohroma c oksidāzes ekspresija, kā arī patoloģiska morfoloģiskā aina.
3. Mildronāts pēc divu nedēļu i.p. ievadīšanas 50, 100 un **īpaši** 200 mg/kg devās ievērojami protektē azidotimidīna izraisīto kardiotoksicitāti, samazinot pārmērīgi ekspresēto NF-κBp65 līmeni un morfoloģiskās izmaiņas, kas liecina par mildronāta pretiekaisuma darbību sirds audos.
4. Pirmo reizi esam parādījuši, ka mildronāts peļu smadzeņu audos, galvenokārt 50 un 100 mg/kg devās (mazāk 200 mg/kg), uzrāda izteiktu neiroprotektīvu darbību, samazinot azidotimidīna izraisīto kaspāzes-3, CAS, iNOS un GFAP ekspresiju, normalizējot citohroma c oksidāzes ekspresiju. Iegūtie dati norāda uz mildronāta anti-deģeneratīvo un pretiekaisuma darbību, kas atspoguļojas arī audu morfoloģiskajā ainā.
5. Mildronāts (50 un 100, bet ne 200 mg/kg) uzrāda hepatoprotektējošu darbību, samazinot kaspāzes-3 ekspresiju un morfoloģiskās izmaiņas peļu aknu audos, kuras izraisījis azidotimidīns un efavirēns pēc divu nedēļu ievadīšanas.

6. 1,4-Dihidropiridīna atvasinājums cerebrokrasts (0,1 mg/kg, i.p., divas nedēļas) peļu sirds un smadzeņu audos būtiski samazina azidotimidīna izraisīto NF- κ Bp65 un kaspāzes-3 ekspresiju, kā arī novērš morfoloģiskās izmaiņas audos. Tas liecina par cerebrokrasta pretiekaisuma un anti-apoptotiskiem efektiem. Savukārt aminoskābes saturošie 1,4-dihidropiridīna atvasinājumi glutapirons un taupirons (abi 1 mg/kg) uzrāda darbības duālismu – gan veicinot iekaisumu un apoptozi, gan samazinot azidotimidīna efektus.
7. Iegūtie rezultāti ļauj domāt, ka mildronāta un cerebrokrasta izteiktās kardio-, neuro- un hepatoprotektējošās aktivitātes pamatā ir mitohondriālo procesu aizsargājošie mehānismi, kuru nodrošināšanā nozīmīga vieta ir šo vielu struktūru farmakoforiem. Tos savukārt var izmantot jaunu vielu dizainā, lai radītu jauna tipa perspektīvus – uz mitohondrijiem mērķētus preparātus dažādu audu deģeneratīvu patoloģiju (piem., neurodeģeneratīvo saslimšanu, diabēta) profilaksei un terapijai.

PATEICĪBAS

Pētījuma finansiālais atbalsts: Latvijas Zinātņu Padomes grants Nr.05-1418, ESF grants ESS2004/3, Līgumdarba projekts A/s Grindeks” – LU: Nr. 2362, un L'ORÉAL Latvijas stipendija “Sievietēm Zinātnē” ar UNESCO Latvijas Nacionālās komisijas un Latvijas Zinātņu akadēmijas atbalstu. ESF grants IDP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/031.

Izsaku pateicību Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Patoloģijas katedras doktoram Sergejam Isajevam par sniegto apmācību imūnhistoķīmisko analīžu metodē un morfoloģiskajiem pētījumiem, kā arī Patoloģijas katedras vadītājam profesoram Immanuelam Taivanam par iespēju strādāt viņa vadītajā katedrā.

Izsaku pateicību Komibras Universitātes (Portugāle) Zooloģijas katedras bioloģijas doktorei Marijai Augustai Fernandesai par apmācību mitohondriālo procesu pētīšanā *in vitro*, kā arī profesoriem M.S. Santosai un A.J.M. Moreno par iespēju strādāt laboratorijā.

Izsaku lielu pateicību saviem kolēģiem no Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes Farmakoloģijas katedras – asociētajam profesoram Šimonam Svirskim un doktorantam Jurim Rumakam – par sniegto apmācību darbam ar laboratorijas dzīvniekiem un datu statistiskajā apstrādē.

Pateicība doktorantei Elīnai Škaparei un Dr.pharm. Edgaram Liepiņam par palīdzību pie *Western blot* metodes, kā arī Dr.pharm. Maijai Dambrovai par iespēju strādāt viņas vadītajā laboratorijā.

Pateicība arī Latvijas Organiskās sintēzes institūta profesoriem Ivaram Kalviņam un Gunāram Duburam par protektējošajām zāļu vielām, un Latvijas Infektoloģijas centra profesorei Ludmilai Vīksnai par anti-HIV vielām šim pētījumam.

Vislielākā pateicība, protams, mana darba vadītājai profesorei Vijai Klušai.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Andersen MH, Becker JC, Straten PT. 2005. Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 4: 399-409.
2. Akahira M, Hara A, Abiko Y. 1997. Effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on myocardial derangements induced by hydrogen peroxide in the isolated perfused rat heart. *Fundam Clin Pharmacol*, 11: 356-364.
3. Akasaka Y, Morimoto N, Ishikawa Y, Fujita K, Ito K, Kimura-Matsumoto M, Ishiguro S, Morita H, Kobayashi Y, Ishii T. 2006. Myocardial apoptosis associated with the expression of proinflammatory cytokines during the course of myocardial infarction. *Mod Pathol*, 19: 588-598.
4. Allen NJ, Barres BA. 2009. Glia – more than just brain glue. *Nature*, 457: 675-677.
5. Asaka N, Muranaka Y, Kirimoto T, Miyake H. 1998. Cardioprotective profile of MET-88, an inhibitor of carnitine synthesis, and insulin during hypoxia in isolated perfused rat hearts. *Fundam Clin Pharmacol*, 12: 158-163.
6. Badley AD, Roumier T, Lum JJ, Kroemer G. 2003. Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci*, 24: 298-305.
7. Barja G. 2002. The quantitative measurement of H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 34: 227-233.
8. Behrens P, Brinkmann U, Wellmann A. 2003. CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis. *Apoptosis*, 8: 39-44.
9. Bouckenoghe T, Remacle C, Reusens B. 2006. Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9: 728-733.
10. Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J*, 134: 707-716.
11. Brinkmann U. 1998. CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am J Hum Genet*, 62: 509-513.
12. Brinkmann U, Brinkmann E, Gallo E, Scherf U, Pastan I. 1996. Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene *CSE1* in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis. *Biochemistry*, 35: 6891-6899.
13. Broekemeier KM, Dempsey ME, Pfeiffer DR. 1989. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J Biol Chem*, 264: 7826-7830.
14. Brosnan JT, Brosnan ME. 2006. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr*, 136: 1636S-1640S.
15. Browne MJ, Mayer KH, Chafee SB, Dudley MN, Posner MR, Steinberg SM, Graham KK, Geletko SM, Zinner SH, Denman SL. 1993. 2',3'-dideoxythymidine (d4T) in patients with AIDS or AIDS-related complex: a phase I trial. *J Infect Dis*, 167: 21-29.
16. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB. 1998. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 351: 261-272.
17. Cadenas E. 2004. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*, 25: 17-26.
18. Carr A, Miller J, Law M, Cooper DA. 2000. A syndrome of lipoatrophy, lactic acidemia and liver dysfunction associated with HIV nucleoside analogue

- therapy: contribution to protease inhibitor-related lipodystrophy syndrome. *AIDS*, 14: F25-F32.
19. Chance B, Williams GR. 1956. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol*, 17: 65-134.
 20. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria. *J Biol Chem*, 19: 36027-36031.
 21. Chernyak BV, Pletjushkina OY, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Avetisyan AV. 2005. Bioenergetics and death. *Biochemistry*, 70: 240-245.
 22. Corcuera Pindado MT, Lopez Bravo A, Martinez-Rodriguez R, Picazo Talavera A, Gomez Aguado F, Roldan Contreras M, Perez Alvarez MJ, Fernandez Garcia A, Alonso Martin MJ. 1994. Histochemical and ultrastructural changes induced by zidovudine in mitochondria of rat cardiac muscle. *Eur J Histochem*, 38: 311-318.
 23. Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P. 1996. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem*, 271: 6746-6751.
 24. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. 2002. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 12: 275-279.
 25. De Clercq E. 2002. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 1: 13-25.
 26. De la Asuncion JG, Del Olmo ML, Sastre J, Millan A, Pellin A, Pallardo FV, Viña J. 1998. AZT treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria. *J Clin Invest*, 102: 4-9.
 27. DiMauro S, Mancuso M. 2007. Mitochondrial diseases: therapeutic approaches. *Biosci Rep*, 27: 125-137.
 28. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. 2002. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J*, 20: 556-563.
 29. Di Virgilio F, Ceruti S, Bramanti P, Abracchio MP. 2009. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci*, 32: 79-87.
 30. Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML. 1999. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF- κ B. *Oncogene*, 18: 747-757.
 31. El Idrissi A, Messing J, Scalia J, Trenkner E. 2003. Prevention of epileptic seizures by taurine. *Adv Exp Med Biol*, 526: 515-525.
 32. El Idrissi A, Trankner E. 2003. Taurine regulates mitochondrial calcium homeostasis. *Adv Exp Med Biol*, 526: 527-536.
 33. Elimadi A, Morin D, Albengres E, Chauvet-Monges AM, Allain V, Crevat A, Tillement JP. 1997. Differential effects of zidovudine and zidovudine triphosphate on mitochondrial permeability transition and oxidative phosphorylation. *Br J Pharmacol*, 121: 1295-1300.
 34. Fernandes MA, Santos MS, Vicente JA, Moreno AJ, Velēna A, Duburs G, Oliveira CR. 2003. Effects of 1,4-dihydropyridine derivatives (cerebrocrast, gammapyrone, glutapyrone, and diethone) on mitochondrial bioenergetics and oxidative stress: a comparative study. *Mitochondrion*, 3: 47-59.

35. Fontanesi F, Soto IC, Barrientos A. 2008. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation. *IUBMB Life*, 60: 557-568.
36. Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. 2004. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab*, 30: 121-138.
37. Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, Deleo FR, Quinn MT. 2007. Role of NF- κ B in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor- α . *J Leukoc Biol*, 82: 729-741.
38. Gazotti P, Malmström K, Crompton MA. 1979. Laboratory manual on transport and bioenergetics, in: E. Carafoli, G. Semenza (Eds.), *Membrane Biochemistry*, Springer, New York, pp. 62-69.
39. Germane S. 1991. Experimental study of mildronate effect on the central nervous system. *Eksp Kli Farmakoter (Riga)*, 19: 44-50.
40. Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci*, 11: 87-99.
41. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, 177: 751-766.
42. Granata S, Zaza G, Simone S, Villani G, Latorre D, Pontrelli P, Carella M, Schena FP, Grandaliano G, Pertosa G. 2009. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC Genomics*, 10: 388.
43. Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305: 626-629.
44. Grigat S, Fork C, Bach M, Golz S, Geerts A, Schoming E, Grundemann D. 2009. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *Drug Metab Dispos*, 37: 330-337.
45. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Präger D, Haney J, Möritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Böhm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. 2006. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*, 113: 1114-1122.
46. Hanaki Y, Sugiyama S, Ozawa T. 1989. Effect of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate, gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on isoproterenol-induced mitochondrial dysfunction. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 64: 157-160.
47. Hattori Y, Kasai K, Gross SS. 2004. NO suppresses while peroxynitrite sustains NF- κ B: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO. *Cardiovasc Res*, 63: 31-40.
48. Hayashi Y, Kiromoto T, Asaka N, Nakano M, Tajima K, Miyake H, Matsuura N. 2000. Beneficial effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor in rats with heart failure following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*, 395: 217-224.
49. Herrero A, Barja G. 1997. Sites and mechanisms responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Aging Dev*, 98: 95-111.
50. Holmberg B, Rosengren L, Karlsson JE, Johnels B. 1998. Increased cerebrospinal fluid levels of neurofilament protein in progressive supranuclear

- palsy and multiple-system atrophy compared with Parkinson's disease. *Mov Disord*, 13: 70–77.
51. Hong M, Schlichter L, Bendayan R. 2000. A novel zidovudine uptake system in microglia. *J Pharmacol Exp Ther*, 296: 141-149.
 52. Hong-Brown LQ, Brown CR, Lang CH. 2004. Indinavir impairs protein synthesis and phosphorylations of MAPKs in mouse C2C12 myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287: C1482-C1492.
 53. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN. 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*, 22: 696-699.
 54. Jezek P, Hlavata L. 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol*, 37: 2478-2503.
 55. Kamo N, Muratsugu M, Hongoh R, Kobatake N. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J Membr Biol*, 49: 105-121.
 56. Karpova M, Germane S, Cebers G, Pankov O, Klusa V, Duburs G, Bisenieks E. 1993. The anticonvulsant properties of glutapyrone – a new type of derivate of amino acid-containing 1,4-dihydropyridines. *Bull Exp Biol Med*, 116: 283-286.
 57. Kim HE, Jiang X, Du F, Wang X. 2008. PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1. *Mol Cell*, 30: 239-247.
 58. Klegeris A, Liutkevicius E, Mikalauskiene G, Duburs G, McGeer PL, Klusa V. 2002. Anti-inflammatory effects of cerebrocrast in a model of rat paw edema and on mononuclear THP-1 cells. *Eur J Pharmacol*, 441: 203-208.
 59. Klimaviciusa L, Klusa V, Duburs G, Kaasik A, Kalda A, Zharkovsky A. 2007. Distinct effects of atypical 1,4-dihydropyridines on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced toxicity. *Cell Biochem Funct*, 25: 15-21.
 60. Klimaviciusa L, Klusa V, Duburs G, Kaasik, Kalda A, Zharkovsky A. 2005. Neuroprotective (oxygen-glucose deprivation model) and neurotrophic effects of different 1,4-dihydropyridine derivatives in cerebellar granule cells. *Proc Latvian Acad Sci part B*, 59, 5: 20-30.
 61. Klusa V. 1995. Cerebrocrast. *Drugs Future*, 20: 135-138.
 62. Klusa V, Duburs G, Germane S, Muceniece R, Cebers G, Misane I, Bisenieks E, Liepa I, Dambrova M. 1992. Structure and activity peculiarities of cerebrocrast (IOS-1.1212), a novel type of CNS-modulating 1,4-dihydropyridine. *Proc Latvian Acad Sci*, 9: 51-55.
 63. Klusa V, Germane S, Duburs G. 1997. Taurine and tauropyrone: anti-neurodeficit activity in alcoholized rats. *Pharmacol Toxicol*, 80(suppl.1): 29.
 64. Klusa V, Germane S. 1996. Alcoholised maternal rat offspring: model for testing of physical and psycho emotional neurodeficit. *Scand J Lab Animal Sci*, 23: 403-409.
 65. Kluša V, Semenova TD, Medvinskaya NI, Fast AE. 1995. Cerebrocrast (IOS-1212) normalizes disturbances of learning, attention, emotional behaviour and brain biogenic amine levels in prenatally hypoxized rats. *Proc Latvian Acad Sci, Part B*, 11/12: 156-161.
 66. Komarov AM, Hall JM, Weglicki WB. 2004. Azidothymidine promotes free radical generation by activated macrophages and hydrogen peroxide-iron-

- mediated oxidation in a cell-free system. *Biochim Biophys Acta*, 1688: 257-264.
67. Kontorinis N, Dieterich D. 2003. Hepatotoxicity of antiretroviral therapy. *AIDS Rev*, 5: 36-43.
 68. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. 1998. The mitochondrial death/life regulators in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*, 60: 619-642.
 69. Kumar D, Lou H, Singal PK. 2002. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz*, 27: 662-668.
 70. Kuribayashi K, Mayes PA, El-Deiry WS. 2006. What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer Biol Ther*, 5: 763-765.
 71. Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA Jr, Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311: 847-851.
 72. Lambert AJ, Brand MD. 2004. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J*, 382: 511-517.
 73. Lamperth L, Dalakas MC, Dagani F, Anderson J, Ferrari R. 1991. Abnormal skeletal and cardiac muscle mitochondria induced by zidovudine (AZT) in human muscle *in vitro* and in an animal model. *Lab Invest*, 65: 742-751.
 74. Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydłowska W. 2001. Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res*, 51: 21-29.
 75. Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M. 2008. Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793: 78-88.
 76. Lee H, Hanes J, Johnson KA. 2003. Toxicity of nucleoside analogues used to treat AIDS and the selectivity of the mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry*, 42: 14711-14719.
 77. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. 2001. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 33: 1065-1089.
 78. Lewis W, Simpson JF, Meyer RR. 1994. Cardiac mitochondrial DNA polymerase-gamma is inhibited competitively and noncompetitively by phosphorylated zidovudine. *Circ Res*, 74: 344-348.
 79. Lewis W. 2003. Mitochondrial dysfunction and nucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy: experimental clarifications and persistent clinical questions. *Antiviral Res*, 58: 189-197.
 80. Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D, Kirjanova O, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M. 2006. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 48: 314-319.
 81. Liepinsh E, Vilskersts R, Skapare E, Svalbe B, Kuka J, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M. 2008. Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*, 83: 613-619.
 82. Lombardini JB. 1991. Taurine: retinal function. *Brain Res Rev*, 16: 151-169.
 83. Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett*, 42: 68-72.

84. Loschen G, Flohe L, Chance B. 1971. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett*, 18: 261-264.
85. Lourenco R, Camilo ME. 2002. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutr Hosp*, 17: 262-270.
86. Lozano FS, Lopez-Novoa JM, Rodriguez JM, Barros MB, Garcia-Criado FJ, Nicolas JL, Parreno A, Revilla J, Gomez-Alonso A. 2005. Exogenous nitric oxide modulates the systemic inflammatory response and improves kidney function after risk-situation abdominal aortic surgery. *J Vasc Surg*, 42: 129-139.
87. Lund KC, Wallace KB. 2004. Direct effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on rat cardiac mitochondrial bioenergetics. *Mitochondrion*, 4: 193-202.
88. Maisonneuve C, Igoudjil A, Begriche K, Letteron P, Guimont MC, Bastin J, Laigneau JP, Pessayre D, Fromenty B. 2004. Effects of zidovudine, stavudine and beta-aminoisobutyric acid on lipid homeostasis in mice: possible role in human fat waisting. *Antivir Ther*, 9: 801-810.
89. Marchetti B, Abbracchio MP. 2005. To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci*, 26: 517-525.
90. May L.T., Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. 2007. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 47: 1-51.
91. McCurdy DT, Kennedy JM. 1998. AZT decreases rat myocardial cytochrome oxidase activity and increases beta-myosin heavy chain content. *J Mol Cell Cardiol*, 18: 1979-1989.
92. Miecz D, Januszewicz E, Czeredys M, Hinton BT, Berezowski V, Cecchelli R, Nalecz KA. 2008. Localization of organic cation/carnitine transporter (OCTN2) in cells forming the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 104: 113-123.
93. Milligan ED, Watkins LR. 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, 10: 23-36.
94. Modica-Napolitano JS. 1993. AZT causes tissue-specific inhibition of mitochondrial bioenergetic function. *Biochem Biophys Res Commun*, 194: 170-177.
95. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmac Rev*, 43: 109-142.
96. Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417: 1-13.
97. Murphy MP. 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1411: 401-414.
98. Nose K. 2000. Role of reactive oxygen species in the regulation of physiological functions. *Biol Pharm Bull*, 23: 897-903.
99. Note R, Maisonneuve C, Letteron P, Peytavin G, Djouadi F, Igoudjil A, Guimont MC, Biour M, Pessayre D, Fromenty B. 2003. Mitochondrial and metabolic effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) in mice receiving one of five single and three dual-NRTI treatments. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 3384-3392.
100. Oja SS, Saransaari P. 2007. Pharmacology of taurine. *Proc West Pharmacol Soc*, 50: 8-15.

101. O'Neil MJ. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals; 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001; 1809.
102. Oriyanhan W, Yamazaki K, Miwa S, Takaba K, Ikeda T, Komeda M. 2005. Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. *Heart Vessels*, 20: 278-285.
103. Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18: 6853-6866.
104. Palmi M, Youmbi GT, Fusi F, Sgaragli GP, Dixon HB, Frosini M, Tipton KF. 1999. Potentiation of mitochondrial Ca²⁺ sequestration by taurine. *Biochem Pharmacol*, 58: 1123-1131.
105. Pereira LF, Oliveira MBM, Carnieri EGS. 1998. Mitochondrial sensitivity to AZT. *Cell Biochem Funct*, 16: 173-181.
106. Peristeris P, Clark BD, Gatti S, Faggioni R, Mantovani A, Mengozzi M, Orencole SF, Sironi M, Ghezzi P. 1992. N-acetylcysteine and glutathione as inhibitors of tumor necrosis factor production. *Cell Immunol*, 140: 390-399.
107. Petit F, Fromenty B, Owen A, Estaquier J. 2005. Mitochondria are sensors for HIV drugs. *Trends Pharmacol Sci*, 26: 258-264.
108. Petros A, Bennett D, Vallance P. 1991. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet*, 338: 1557-1558.
109. Rahman I, MacNee W. 1998. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*, 53: 601-612.
110. Rahman I, MacNee W. 2000. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J*, 16: 534-554.
111. Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR. 2003a. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol*, 160: 65-75.
112. Ricci JE, Waterhouse N, Green DR. 2003b. Mitochondrial functions during cell death, a complex (I-V) dilemma. *Cell Death Differ*, 10: 488-492.
113. Sazanov LA. 2007. Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry*, 46: 2275-2288.
114. Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M. 2004. NF-κB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chem Bio Chem*, 5: 1348-1358.
115. Sinnwell TM, Sivakumar K, Soueidan S, Jay C, Frank JA, McLaughlin AC, Dalakas MC. 1995. Metabolic abnormalities in skeletal muscle of patients receiving zidovudine therapy observed by ³¹P in vivo magnetic resonance spectroscopy. *J Clin Invest*, 96: 126-131.
116. Sjakste N, Gutcaits A, Kalvinsh I. 2005. Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications. *CNS Drug Rev*, 11: 151-168.
117. Spaniol M, Brooks H, Auer L, Zimmermann A, Soloiz M, Stieger B, Krahenbuhl S. 2001. Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. *Eur J Biochem*, 268: 1876-1887.
118. Streck EL, Scaini G, Rezin GT, Moreira J, Fochesato CM, Romão PR. 2008. Effects of the HIV treatment drugs nevirapine and efavirenz on brain creatine kinase activity. *Metab Brain Dis*, 23: 485-492.

119. Suzuki T, Wada T, Saigo K, Watanabe K. 2002. Taurine as a constituent of mitochondrial tRNAs: new insights into the functions of taurine and human mitochondrial diseases. *EMBO J*, 21: 6581-6589.
120. Tolomeo M, Mancuso S, Todaro M, Stassi G, Catalano M, Arista S, Cannizzo G, Barbusca E, Abbadessa V. 2003. Mitochondrial disruption and apoptosis in lymphocytes of an HIV infected patient affected by lactic acidosis after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Pathol*, 56: 147-151.
121. Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J, Niot I, Demarquoy J, Boichot J, Bezard J, Rochette L, Clouet P. 1995. Enhancement of activities relative to fatty acid oxidation in the liver of rats depleted of L-carnitine by D-carnitine and a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 49: 1403-1410.
122. Tullberg M, Rosengren L, Blomsterwall E, Karlsson JE, Wikkelso C. 1998. CSF neurofilament and glial fibrillary acidic protein in normal pressure hydrocephalus. *Neurology*, 50: 1122-1127.
123. Utno LJ, Lipsberga ZE, Silova AA, Girgensone MJ, Bisenieks EA, Duburs GJ. 1989. Cardioprotective properties of 1,4-dihydropyridine derivate glutapyrone in deep hypothermia. *Bull Exp Biol Med*, 108: 558-561.
124. Vallance P, Leiper J. 2002. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov*, 1: 939-950.
125. Valen G, Yan Z, Hansson GK. 2001. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol*, 38: 307-314.
126. Van de Poll MCG, Dejong CHC, Soeters PB. 2006. Adequate range for sulfur-containing amino acids and biomarkers for their excess: lessons from enteral and parenteral nutrition. *J Nutr*, 136: 1694S-1700S.
127. Velen A, Skujins A, Svirskis S, Bisenieks E, Uldrikis J, Poikans J, Duburs G, Klusa V. 1997. Modification of swelling-contraction-aggregation processes in rat muscle mitochondria by the 1,4-dihydropyridines, cerebrocrast and glutapyrone, themselves and in the presence of azidothymidine. *Cell Biochem Funct*, 15: 211-220.
128. Viengchareun S, Caron M, Auclair M, Kim MJ, Frachon P, Capeau J, Lombès M, Lombès A. 2007. Mitochondrial toxicity of indinavir, stavudine and zidovudine involves multiple cellular targets in white and brown adipocytes. *Antivir Ther*, 12: 919-929.
129. Vilskersts R, Liepinsh E, Mateuszuk L, Grinberga S, Kalvinsh I, Chlopicki S, Dambrova M. 2009. Mildronate, a Regulator of Energy Metabolism, Reduces Atherosclerosis in apoE/LDLR Mice. *Pharmacology*, 83: 287-293.
130. Walker UA, Setzer B, Venhoff N. 2002. Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS*, 16: 2165-2173.
131. Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rodgers TB. 2002. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- κ B activation and tumor necrosis factor- α expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282: H872-H879.
132. Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS. 2008. The potential health benefits of taurine in cardiovascular disease. *Exp Clin Cardiol*, 13: 57-65.

133. Yancey PH. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol*, 208: 2819-2830.
134. Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. 1999. *Fundamental neuroscience*. Academic Press, New York.
135. Шутенко ЖВ, Мейрена ДВ, Каган ТИ, Сьяксте НИ, Калвиньш ИЯ. 1995. Милдронат: механизмы действия, перспектива коррекции патологических состояний. *Химико-фармацевтический Журнал*, Т29, 5: 13-17.