

(12) **PARAIŠKOS APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2023 532**
(22) Paraiškos padavimo data: **2023-08-22**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2025-02-25**

(71) Pareiškėjas:
Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, A. Mickevičiaus g. 9, 44307 Kaunas, LT

(72) Išradėjas:
**Vaiva LESAUSKAITĖ, LT
Donatas STAKIŠAITIS, LT
Linas KAPOČIUS, LT
Dovydas GEČYS, LT
Angelija VALANČIŪTĖ, LT
Ingrida BALNYTĖ, LT
Rasa UGENSKIENĖ, LT
Arūnas VAITKEVIČIUS, LT
Vacis TATARŪNAS, LT
Tomas TAMOŠUITIS, LT
Daiva URBONIENĖ, LT
Auksė MICKIENĖ, LT
Eligija DAMANSKIENĖ, LT**

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Reda ŽABOLIENĖ, 7, METIDA, Verslo centras „VERTAS“, Gynėjų g. 16, LT-01109 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Natrio dichloroacetato ir valpro rūgšties druskų derinys, skirtas virusinėms ir bakterinėms infekcijoms, ir uždegiminėms ligoms gydyti

(57) Referatas:

Išradime pateikiami ikiklinikinių *in vivo* ir *in vitro* ir klinikinių tyrimų *in vitro* duomenys bei kuriamojo vaistinio preparato poveikio susijusių su uždegimu ir imuniniu atsaku genų raiška, taikant sekoskaitos duomenų diferencinę genų raiškos analizės duomenys. Tyrimų duomenimis grįstas naujo preparato poveikio vertinimas leidžia daryti išvadą, kad gydymas kuriu preparatu daro poveikį virusinės ir bakterinės infekcijos sukeltiems genų reguliacijos sutrikimams organizme ir tinkamas koreguoti ar slopinti patologinius procesus molekulinio lygmeniu. Vadovaujantis šios pažangios technologijos gautais rezultatais kuriamas naujas vaistinis preparatas, sudarytas iš dichloroacetato ir valpro rūgšties vaistinių preparatų derinio, skirtas virusinėms ir bakterinėms infekcijoms bei uždegiminėms ligoms gydyti, gali pagerinti gydomos ligos eigą, pagreitinoti pacientų sveikimą, išgyvenamumą, gyvenimo kokybę ir sumažinti sveikatos priežiūros išlaidas.

NATRIO DICHLOOROACETATO IR VALPRO RŪGŠTIES DRUSKŲ DERINYS,
SKIRTAS VIRUSINĖMS IR BAKTERINĖMS INFEKCIJOMS IR UŽDEGIMINĖMS
LIGOMS GYDYTI

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas susijęs su natrio dichloroacetato (DCA) ir valpro rūgšties (VPA) druskų derinio (VPA–DCA) panaudojimu papildomai virusinių ir bakterinių infekcijų bei uždegiminių ligų terapijai.

TECHNIKOS LYGIS

Preparatų derinys taikomas infekcinių ligų gydymui papildomai terapijai siekiant gauti terapinį poveikį. Racionalius derinius sudarantys preparatai turi skirtingus veikimo mechanizmus, kurie slopina infekciją atstatydami sutrikusį organizmo ir imuninių ląstelių metabolismą. Tokiu būdu galima išgauti greitesnį sveikimą, išvengti imuniteto sutrikimo, organų pažeidimo, t. y. sumažinti nepalankios ligos eigos, ligos progresavimo riziką. Deriniui naudojami žinomi skirtingų klasių vaistiniai preparatai, kurių saugumo profilis gerai žinomas. Derinio komponentas natrio dichloroacetatas (DCA) slopina glikolizę, metabolinės acidozės raidą. DCA slopindamas pieno rūgšties gamybą, taip pat slopina prouždegiminių citokinų išlaisvinimą. Valpro rūgštis (VPA) pasižymi imunomoduliaciniu poveikiu, kuris slopina virusų ar bakterijų sukeltas uždegimo reakcijas. VPA aktyvina DCA pernešimą į ląsteles per SLC5A8 nešiklį. Toks derinio sinergizmas grindžiamas farmakologinio poveikio mechanizmu – VPA demetilavimo mechanizmais aktyvina SLC5A8 geno raišką ląstelėse, o tai didina DCA pernešimą į ląstelės mitochondrijas. Naujų vaistinių preparatų paieška gydant sunkias infekcijas, slopinant metabolinių sutrikimų raidą yra svarbi infektologijos mokslo sritis. Vaistinių preparatų derinių, kaip naujų vaistinių preparatų kūrimas įvairių ligų gydymo tikslu, yra patvirtintas išradimais.

US9556113 skirtas dichloroacetato ir oksamato derinio bei dichloroacetato ir sintezuotų oksamato provaistų derinių vartojimui gydant įvairios lokalizacijos vėžį. Patente aprašomas dviejų vaistų derinio priešvėžinis veiksmingumas ir farmakologinio poveikio mechanizmai, kurie papildo vienas kitą, t. y. veikia sinergistiškai. Šie preparatai gali būti vartojami kaip pagrindinė arba papildoma terapija (atskirai arba jų derinys viename preparate) bei lygiagrečiai su sistetine chemoterapija.

US8609724 aprašo DCA ir jo cheminių ekvivalentų vartojimą vėžio gydymui siekiant indukuoti apoptozę ar sumažinant rezistentiškumą apoptozei. Leidžiama nuo 10 iki 100 mg/kg natrio DCA kartu su kitais pro-apoptoziniais preparatais ar chemoterapija gydant nesmulkialąstelinį plaučių, krūties vėžį ir glioblastomą.

EP1708692B1 aprašo DCA vartojimą, siekiant pagerinti širdies kontraktilinę funkciją, koronarų kraujotaką po išemijos-reperfuzijos. Derinimas su DCA leidžia sumažinti inotropinių preparatų (dopamino, epinefrino, efedrino, fenilefrino, dobutamino) dozes pagerėjus širdies indekso rodikliams. 50 mg/kg DCA skiriama infuzijomis į veną naujagimiams, vaikams, suaugusiems; vartojamas kartu su inotropiniais preparatais apsaugo miokardą nuo pažeidimo. DCA pagerina miokardo funkcijos atstatymą ir metabolizmą po išemijos epizodų (širdies operacijos, hemoraginio šoko, hipoksijos metu).

US20140066482 ir EP2026787 atskleidžia nuo insulino nepriklausomo diabeto gydymą, derinant registruotus preparatus repaglinidą ir metforminą. Repaglinidas skatina insulino išlaisvinimą iš kasos β -ląstelių, o metforminas mažina rezistentiškumą insulinui, slopina gliukozės gamybą kepenyse, didina raumeninio ir riebalinio audinio jautrumą insulinui. Derinio junginiai skiriasi chemine formule, farmakokinetika ir farmakologinio veikimo mechanizmais. Patentuotas derinio preparatas sukelia sinergistinį dviejų komponentų poveikį gydant nuo insulino nepriklausomą diabetą.

TRUMPAS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Išradimo tikslas yra pateikti naują farmacinio derinio, kuris apima (a) dichloroacetato (DCA) ir (b) valpro rūgšties (VPA) arba jos farmaciniu požiūriu priimtinos druskos veiksmingą kiekį, panaudojimą virusinei ir bakterinei infekcijoms bei uždegiminėms ligoms gydyti. Dichloroacetato farmaciniu požiūriu priimtina druska yra natrio dichloroacetatas. Valpro rūgšties farmaciniu požiūriu priimtina druska yra natrio valproatas arba magnio valproatas. Minėtas derinys papildomai turi farmaciniu požiūriu priimtinių pagalbinių medžiagų. Paruoštas preparatas yra bet kurios farmacinės formos, tokios kaip kapsulė, tabletė arba tirpalas.

Išradimas aprašo VPA-DCA derinį, skirtą panaudoti virusinių ir bakterinių infekcijų bei uždegiminių ligų gydymui. Šis derinys pasižymi nauju farmakologiniu DCA ir VPA veikimo mechanizmu: abu preparatai slopina uždegimines reakcijas, pasižymi imuno-moduliaciniu poveikiu, skatina prieš uždegiminių biologinių kelių raidą infekcinio

uždegimo metu, slopina su prouždegiminėmis reakcijomis susijusius biologinius kelius, slopina aerobinę glikolizę.

VPA-DCA derinio taikymas duoda priešuždegiminį tiriamojo preparato sudedamųjų dalių sinergistinį poveikį, kuris pasireiškia VPA aktyvuojant DCA pernešimą į ląsteles per SLC5A8 nešiklį.

Veikliųjų medžiagų derinys yra skirtas panaudoti gydyti virusinėms arba bakterinėms infekcijoms bei uždegiminėms ligoms, tokioms kaip vidurių šiltinė ir paratifai, kitos salmonelių sukeltos infekcijos, šigeliozė, kitos bakterijų sukeltos žarnyno infekcijos, patogeninių *Escherichia coli* sukeltos infekcijos, *Clostridium difficile* sukeltas enterokolitas, amebiazė, tuberkuliozė, ne žarnyno jersinijozė, kokliušas, meningokokinė infekcija, streptokokinis sepsis, kitas sepsis, legioneliozė, stafilokokų sukelta infekcija, Laimo liga, netipinės virusų sukeltos centrinės nervų sistemos infekcijos, moskitų platinamas virusinis encefalitas, erkių platinamas virusinis encefalitas, pūslelinės virusų (*herpes simplex*) sukeltos infekcijos, juostinė pūslelinė, tymai, ūminis hepatitas, ūminis hepatitas C, lėtinis virusinis hepatitas, žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) sukelta liga, citomegalo viruso sukelta liga, infekcinė mononukleozė, maliarija, leišmaniozė, afrikinė tripanosomozė, Čagaso liga, toksoplazmozė, gripas ir pneumonija, COVID liga, *Helicobacter pylori* infekcija, žmogaus papilomavirusinė infekcija, SARS, MERS infekcijos, gram-teigiamų bakterijų sukeltos infekcijos, gram-neigiamų bakterijų sukeltos infekcijos, uždegiminės žarnyno ligos.

Veikliųjų medžiagų derinys, apimantis (a) natrio dichloroacetatą (DCA) ir (b) valpro rūgštį (VPA) arba jos farmaciniu požiūriu priimtina druską, yra skiriamas kaip sudėtinis preparatas arba atskiros veikliosios medžiagos yra skiriamos kartu kaip atskiri vaistiniai preparatai. Minėtas derinys skiriamas kaip papildomas gydymas kartu su žinoma infekcijos ar jos sukulto uždegimo specifine terapija. Infekcinių ligų gydymas minėtu veikliųjų medžiagų deriniu yra taikomas vykdant ikiklinikinius ir klinikinius tyrimus.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

1 paveikslas. DCA-VPA poveikis Slc5a8 geno raiškai pelių timocituose.

2 paveikslas. DCA-VPA poveikis žiurkių timocitų CD⁴⁺_IL17⁺ timocitų populiacijos raiškai.

3 paveikslas. DCA-VPA poveikis žiurkių timocitų CD⁴⁺_CD27⁻_IFN γ ⁺ timocitų populiacijos raiškai.

4 paveikslas. DCA-VPA poveikis pelių timocitų su uždegimu ar imuniniu atsaku susijusių genų raiškai.

5 paveikslas. DCA-VPA poveikis pelių timocitų genams slopinant IL-17 signalo perdavimo kelią.

6 paveikslas. DCA-VPA poveikis Covid-19 patogenezėje dalyvaujančių citokinų genų raiškai pelių timocituose.

7 paveikslas. DCA-VPA gydymo poveikis sveikų pacientų T limfocitų uždegimo ir imuninio atsako patofiziologiniams mechanizms, susijusiems su uždegimo ir imuninio atsako genais.

8 paveikslas. DCA-VPA gydymo poveikis sveikų pacientų stimuliuotų T limfocitų uždegimo ir imuninio atsako patofiziologiniams mechanizms, susijusiems su genų raiškos pokyčiais.

9 paveikslas. DCA-VPA poveikis biologiniams keliams sergančių sunkia COVID-19 forma suaugusių pacientų T limfocituose.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Sunkios infekcijos sutrikdo sisteminę medžiagų apykaitą, kuri gali būti pagrindine organizmo žūties priežastimi. DCA ir VPA yra tiriamieji vaistiniai preparatai, pasižymintys virusų ir bakterijų sukeltų infekcijų priešuždegiminiu poveikiu, kuris pasireiškia uždegimo lemtų metabolinių sutrikimų atstatymu ir imuninį atsaką koreguojančiu farmakologiniu poveikiu. Ikiklinikiniai ir klinikiniai tyrimai parodė, kad DCA ir VPA preparatų derinys pasižymi priešuždegiminiu poveikiu, slopinant prouždegiminių mediatorių išlaisvinimą, slopina uždegimą skatinančių uždegimo ir imuninių reakcijų genų raišką T limfocituose, didino raišką genų, kurie slopina infekcijos sukeltas uždegimo reakcijas.

Dichloroacetato priešuždegiminis ir imunitetą reguliuojantis poveikis

Natrio dichloroacetatas (DCA) yra piruvato dehidrogenazės kinazės (PDK) inhibitorius. DCA slopindamas PDK aktyvumą, didina piruvato dehidrogenazės (PDH) ir jos komplekso (PDHC) aktyvumą, skatina gliukozės oksidaciją, slopina glikolizę. Įvairių įgytų metabolinių ir imuninės sistemos disfunkcijos ligoms būdinga padidėjusi pataloginė PDK raiška, dėl kurios slopinamas PDHC, kuris reguliuoja svarbiausius metabolizmo procesus, įskaitant pieno rūgšties gamybą, trikarboksirūgščių ciklą (TCA), lipidų apykaitą, uždegimo mediatorių išsiskyrimą. DCA yra mažos molekulės vaistas, dažniausiai vartojamas gydant

ligas, susijusias su mitochondrijų defektais, padidėjusia įgimta ar įgyta pieno rūgšties produkcija. DCA slopina pieno rūgšties kaupimąsi audiniuose, kraujyje ir uždegimo ląstelėse. DCA aktyvuodamas PDHC reikšmingai atstatė TCA metabolitų kiekį iki kontrolinio ir pagerino kepenų funkciją sergant sepsiu. DCA yra klinikinių tyrimų metu tiriamas vaistas, kuris normalizuoja oksidacinį stresą, didina atsparumą infekcijai. Sumažėjęs PDHC aktyvumas ląstelėje ir pieno rūgšties padidėjusi koncentracija kraujyje yra ligos sunkumo biožymenys, svarbūs uždegimo ar sepsio metabolinių procesų patogenezės terapijos taikiniai.

DCA aktyvina PDH alfa subvienetą (PDHA1), katalizuojantį oksidacinį piruvato dehidrogenavimą iki acetil-CoA, slopina pieno rūgšties gamybą. Sumažėjęs PDH aktyvumas būdingas periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse sunkaus infekcinio uždegimo, sepsio metu. PDHA1 inaktyvacija susijusi su metaboliniu perprogramavimu, pieno rūgšties perprodukcija. PDH inaktyvacija infekcijos metu nustatoma periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse, skeleto raumenų, kraujagyslių endotelio ląstelėse, makrofaguose. Uždegimas, sukeltas LPS stimuliavimu, pelių tiesiųjų raumenų ląstelėse PDK mRNA raišką padidino 24 kartus, o PDHC aktyvumą sumažino 65 %. PDHC aktyvumas sepsinių žiurkių skeleto raumenų ląstelėse sumažėjo ~70 %. PDHC aktyvumas sepsiu sergančių pacientų periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse buvo reikšmingai mažesnis nei sveikųjų ląstelėse. Glikolizės galutinis produktas – pieno rūgštis, jos padidėjusi koncentracija kraujyje yra nepriklausomas sepsio, COVID-19, maliarijos ir kitų infekcijų blogos prognozės rodiklis. Endogeninės pieno rūgšties koncentracijos padidėjimas iš dalies paaiškina kliniškai jo kiekio kraujyje ryšį su ūmaus inkstų nepakankamumo, kepenų pažeidimo dažnio rizika sepsio metu.

DCA graužikų ir žmonių organizme metabolizuojamas iki glicino. Glicino trūkumas yra sunkių infekcijų, sepsio metu pasireiškiantis sutrikimas, kai kepenų ląstelėse sumažėja atsakingo už glicino sintezę geno raiška. ŽIV užsikrėtusiems pacientams skiriant glicino ir cisteino, atkurama glutationo sintezė ir mitochondrijų oksidaciniai mechanizmai. Žiurkių sepsio modelyje, glicino vartojimas mažina kepenų pažeidimus ir sisteminės uždegimines reakcijas. Galimas DCA poveikis glicino kiekiui gali rodyti, kad DCA metabolitas glicinas gali turėti gydomąjį poveikį.

Tiriant pelių sepsio modelį, gydymas DCA panaikina kardiovaskulinį šoką, sumažina kepenų ląstelių pažeidimą, hiperlaktatemiją, hiperglikemiją, panaikina imuniteto ir medžiagų apykaitos paralyžių, pagerina išvalymą nuo bakterijų, reikšmingai padidina gyvūnų išgyvenamumą sepsio metu.

DCA reguliuoja anabolinį ir katabolinį imuninių ląstelių aprūpinimą energija. Ūminėje hiperuždegimo stadijoje, trūkstant acetil-CoA, vyksta anaerobinė glikolizė, pertvarkomas TCA ir lipidų apykaita, kaupiasi sukcinatas ir citratas, pieno rūgštis, kurie yra uždegimą skatinantys mediatoriai. Pieno rūgštis gali aktyvuoti į Toll panašų 4 receptorių (TLR4) ir skatinti branduolinio faktoriaus-kappa B (NF-κB) aktyvaciją bei tolesnį uždegimo mediatorių išsiskyrimą.

Tyrimai parodė DCA poveikį – pieno rūgšties kiekio sumažinimas ankstyvojoje sepsio stadijoje – sumažinantį organų disfunkcijos mastą, fibrozės progresavimą ir lėtinės inkstų ligos raidą. Klinikiniai tyrimai parodė, kad pieno rūgšties kiekio sumažinimas ankstyvojoje sepsio stadijoje pagerina ligos eigos prognozę. Gydant sepsį DCA galima kontroliuoti uždegimą. Pieno rūgštis aktyvina įgimtą imuninį atsaką per TLR tarpininkaujamą NF-κB transkripcijos aktyvumo ir prouždegiminių genų raiškos stiprinimą makrofaguose. DCA slopina monocitų, dendritinių ląstelių ir makrofagų aktyvaciją. Pieno rūgštis, kaip prouždegiminis metabolitas, veikia makrofagų poliarizaciją, didina prouždegiminių veiksmų gamybą, skatina kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus raišką, o pieno rūgšties gamybos slopinimas blokuoja TLR4 signalus ir susilpnina prouždegiminių veiksmų gamybą. PDK1 išjungimas slopino LPS sukeltą sepsinių pelių kaulų čiulpų makrofagų poliarizaciją iš M2 į M1 fenotipą, todėl sumažėjo uždegimo mediatorių interleukino IL-6, IL-12 ir IL-1β kiekis. Gydomo DCA poveikio pasėkoje M1 makrofagai gali būti poliarizuoti į M2 fenotipą ir taip sumažėja uždegimo mediatorių sekrecija. PDK1 reikalinga makrofagų M1 poliarizacijai, TNFα, IL-1β ir IL-6 produkcijai. PDK slopinimas suaktyvino AMPKα1 makrofaguose. AMPK yra medžiagų apykaitos signalinė molekulė, dalyvaujanti formuojant M2 makrofagų fenotipą, didina Akt ir CREB aktyvumą, slopina NF-κB aktyvumą. Vienas iš mechanizmų, lemiančių uždegimo padidėjimą, yra prouždegiminiai mediatoriai, tokie kaip interferonas gama (IFN-γ).

Palyginti su kontroliniais sepsiniais gyvūnais, infuzuojant DCA, pieno rūgšties koncentracija plazmoje ir glikolizės aktyvumas sumažėja. Intraveninis DCA buvo saugiai naudojamas kritinių būklių ligoniams.

Per uždegiminę anabolinę sepsio fazę nuolat didėja piruvato dehidrogenazės kinazės 1 (PDK1) ekspresija ir aktyvumas. Tai lemia sepsio metu stebimą mitochondrijų kvėpavimo ir ląstelių bioenergetikos disfunkciją. Todėl PDK yra potencialus terapijos taikiny.

Transkripcijos faktoriaus peroksisomų proliferatoriaus aktyvinimo alfa receptorius (PPARα) laikomas vienu iš pagrindinių riebiųjų rūgščių oksidacijos reguliatoriumi. Sepsio metu pakinta PPARα raiška. PPARα biologinis aktyvumas ląstelėse yra gerokai sumažėjęs

polimikrobinio sepsio modelyje. PPAR α aktyvinimas pagerino kepenų lipidų apykaitą ir išgyvenamumą sepsio metu, o tai rodo apsauginį šio kelio pobūdį sepsio metu.

PDK sukuria medžiagų apykaitos profilį aktyvuojantį Th17 ląsteles. DCA sumažina prouždegiminių citokinų gamybą žiurkių artrito, kolito ir encefalomyelito modeliuose daugiausia slopinant Th17 ląstelių proliferaciją ir skatinant reguliuojančiųjų T ląstelių diferenciaciją.

DCA yra perspektyvus vaistinis preparatas įvairių infekcijų gydymui. *Mycobacteroides massiliense* replikacija makrofaguose priklauso nuo šeimininko PDK aktyvumo. *M. massiliense* infekcija sukėlė makrofagų metabolinį pokytį – padidėjo glikolizė ir sumažėjo oksidacinis fosforilinimas, o gydymas DCA pakeitė šį *M. massiliense* užkrėstų makrofagų metabolinį perprogravinimą ir apribojo viduląstelinę bakterijų replikaciją, skatino autofagiją, slopino bakterijų dauginimąsi fagolizosomose. DCA farmakologinis poveikis – gali būti nauja gydymo strategija kontroliuojant virulentiškas *M. massiliense* infekcijas. DCA slopina enteroviruso A71 infekcijos progresavimą. Molekulinio dokimo rezultatai rodo, kad antiseptiniai-antobakteriniai tirpalai, kurių sudėtyje yra dichloroacetato anijonas, labiausiai slopino *Escherichia coli*; *Klebsiella aerogene/Enterobacter aerogenes*; *Klebsiella pneumoniae*; *Proteus vulgaris*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* ir *Streptococcus pneumoniae* bakterijas, sukeliančias odos ir minkštųjų audinių infekcijas. Diabetu sergančių pacientų iš inkstų biopsijų išskirtos ląstelės buvo SARS-CoV-2 infekuotos dažniau, palyginti su nesergančių diabetu ląstelėmis, o DCA SARS-CoV-2 infekciją sumažino diabetinių inkstų ląstelėse. DCA gali būti perspektyvus naujas junginys, skirtas *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infekcijai gydyti. Sezoninio A gripo virusas A/WSN/33 (H1N1) pelėms po 6 dienų lemia sunkų kvėpavimo distreso sindromą, o gydymas DCA slopino šios patologijos raidą. DCA reguliuoja *T. gondii* piruvato metabolizmo aktyvumą, todėl manoma, kad DCA galėtų būti taikomas toksoplazmozei gydyti. Sergant maliarija, pieno rūgšties acidozę galima saugiai gydyti DCA. Šis papildomas sunkios maliarijos hiperlaktemijos gydymas laikomas būdu pagerinti išgyvenamumą, "laimint laiko" kol pradės veikti antimaliariniai vaistai. Sunkios maliarijos požymis – pieno rūgšties acidozė yra nepriklausomas mirties prognozės rodiklis. Užsitęsusi hiperlaktatemija lemia aritmiją, inkstų pažeidimus, kvėpavimo nepakankamumą, centrinės nervų sistemos disfunkciją ir kitų organų pažeidimus.

Valpro rūgšties priešuždegiminis ir imuniteto reguliacinis poveikis

Naujausi bioinformaciniai metodai įgalina žinomus vaistus pritaikyti naujoms terapinėms indikacijoms, pvz., COVID-19. Viena iš tokių vaistų yra valpro rūgštis (2-n-propil-pentano rūgštis; VPA). VPA yra histonų deacetilazių (HDAC) inhibitorius. VPA yra antiepilepsinis vaistas, kuris taip pat tiriamas kaip imuniteto moduliatorius. VPA klinikinėje praktikoje vartojamas jau keletą dešimtmečių, jo terapinė koncentracija kraujo serume, saugumo profilis gerai žinomi, todėl yra patrauklus vaistas tirti neregistruotoms terapinėms indikacijoms. VPA yra tirtas gydant įvairias virusines infekcijas.

VPA metabolitas 4-en-VPA-CoA sudaro stabilią sąveiką su SARS-CoV2 RNR polimeraze nsP12 ir gali specifiskai slopinti taikinį. SARS-CoV-2 viruso baltymas – centrinė proteazė Mpro, (3CLpro) yra taikiny s antivirusiniams vaistams, sukurtiems kaip viruso 3CLpro inhibitorius. HDAC inhibitoriai glaudžiai prisijungia prie kristalografinės viruso Mpro struktūros aktyviosios dalies. HDAC2 aktyvumas gali būti moduluojamas VPA selektyviai prisijungiant prie katalitinio centro. VPA sumažino HDAC2 kiekį žiurkių patinų priekinės smegenų žievės audinyje. SARS-CoV-2 proteazė NSP5 gali paveikti mitochondrijas sąveikaudama su HDAC2. HDAC inhibitoriai gali būti priešuždegiminiai vaistai.

SARS-CoV-2 patekimui į ląstelę būtina ACE2 ir transmembraninės serino proteazės 2 (TMPRSS2) receptorių ekspresija. Žmogaus plaučių audinys, I ir II tipo alveolių epitelio ląstelės, arterijų ir venų endotelio ląstelės, kardiomiocitai, arterijų lygiųjų raumenų ląstelės, ekspresuoja ACE2, yra SARS-CoV-2 viruso taikiniai. VPA mažina ACE2 kiekį endotelio ląstelėse. TMPRSS2 yra gerai išreikštas plaučių audinio ląstelėse. TMPRSS2 yra perspektyvus COVID-19 terapijos taikiny s. VPA mažina TMPRSS2 raišką ląstelėse.

VPA – daugiafunkcinis įgimtosios ir adaptyviosios imuninės sistemos ląstelių reguliatorius, mažina makrofagų infiltraciją įvairiuose uždegimo modeliuose. VPA reikšmingai silpnino profibrozinių ir prouždegiminių genų reguliaciją, makrofagų infiltraciją inkstuose, reikšmingai sumažino cigarečių dūmų sukeltą neutrofilų antplūdį Balb/c pelių patelių plaučių uždegimo modelyje, veikdamas kaip endopeptidazės inhibitorius ir potencialiai galintis pasitarnauti kaip vaistas sergant uždegiminėmis plaučių ligomis, nes sukelia neutrofilų infiltracijos bronchoalveoliniame skystyje sumažėjimą.

VPA susilpnino M1 makrofagų proliferaciją, skatino M2 makrofagų kaupimąsi Wistar žiurkių patinų plaučių pažeidimo modelyje, sumažino uždegimą ir pagerino audinių atsistatymą. VPA gali susilpninti ūminį MAP kinazės aktyvavimą plaučiuose subletalame hemoraginio šoko modelyje, sumažina plaučių neutrofilų infiltraciją. BALB/c pelių patelių LPS aktyvuotose dendritinėse ląstelėse dėl VPA poveikio sumažėjo TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ ir TGF- α gamyba. Po VPA gydymo

nustatytas sumažėjęs imuninių ląstelių gebėjimas sukelti prouždegiminį atsaką, tai rodo naujų terapijos galimybių sepsiniam šokui valdyti. VPA susilpnino klinikinį Cocksackie B3 viruso (CVB3) sukulto miokardito progresavimą ir BALB/c pelių patinų mirtingumą nuo CVB3 sukulto miokardito, sumažino blužnies Th17 ląstelių procentą, padidino Treg ląstelių kiekį, sumažino IL-17A raišką, padidino IL-10 koncentraciją CVB3 infekuotų pelių kraujo serume ir širdies audiny, slopino Th17 ląstelių diferenciaciją, skatino Treg ląstelių diferenciaciją.

Pelių NIH3T3/BL6 pooperacinio junginės randų uždegimo modelyje VPA slopino CXCL1, IL-5, IL-6 ir audinių NF- κ B2 p100 baltymų susidarymą. VPA mažino makrofagų infiltraciją, apoptozinę ląstelių žūtį ir kaspazės 3 aktyvaciją, mažino audinio pažeidimo tūrį, gerino aktyvų atsigavimą po žiurkių patinų nugaros smegenų pažeidimo, slopindamas MMP-9 aktyvumą. Tiriant ūminio kolito modeliu, ligos pagerėjimas susijęs su VPA lemtu histologinių uždegimo požymių sumažėjimu, prouždegiminių citokinų IFN- γ ir IL-6 slopinimu. C57BL/6 pelių patelių modelyje VPA sumažino CD4⁺ T-limfocitų infiltratus, o tai buvo susiję su kaspazės 3 medijuota apoptoze.

VPA sumažino uždegiminių citokinų ir reaktyvių deguonies formų kiekį ir sušvelnino žiurkių organų pažeidimus, kuriuos sukėlė LPS sukeltas sepsinis šokas, sumažėjus TNF- α bei mieloperoksidazės kiekiui žiurkių patinų plaučių audinyje. Gydytas VPA pagerino ankstyvąjį išgyvenamumą, plaučių, kepenų ir smegenų funkciją politraumų ir žiurkių patinų hemoraginio šoko modeliuose. VPA 92 % slopino leukocitų migraciją į pilvaplėvės ertmę žiurkių patinų peritonito sukeltame modelyje, mažindamas TNF- α , IL-1 β , IL-6 kiekį ir reaktyvių deguonies formų (ROS) susidarymą, o poveikis buvo panašus į indometacino. Žiurkių išeminio inkstų/reperfuzijos pažeidimo modelio VPA gydytiems žiurkių patinams nustatytas reikšmingas IL-10 ir TGF- β mRNA kiekio kraujyje padidėjimas, tiesioginė koreliacija tarp IL-1 β ir TNF- α mRNA raiškos ir IL-10 su TGF- β kiekiu, rodanti priešuždegiminį VPA poveikį. Histopatologiniai tyrimai parodė sumažėjusius inkstų išeminius pokyčius ir sumažėjusį kreatinino kiekį VPA gydomų gyvūnų kraujo serume.

VPA reikšmingai slopino virusų su apvalkalu dauginimąsi, slopino RNR ir viruso baltymo sintezę, o tai rodo, kad VPA gali trikdyti viruso ciklą įvairiuose viruso infekcijos etapuose. VPA slopino vezikulinio stomatito viruso infekciją, mažino TNF- α , IL-6 gamybą BALB/c pelių patelių kaulų čiulpų makrofaguose. VPA poliarizuoja pelių makrofagų ląstelių linijas RAW264.7 ir pirminius pelių C57BL/6 ir BALB/c pelių patelių kaulų čiulpų makrofagus (BMM) iš prouždegiminio M1 į priešuždegiminį M2 fenotipą.

Tiriant LPS sukeltos makrofagų aktyvacijos modeliu, VPA slopino makrofagų T helperių 1 (Th1) efektorių, stiprino Th2 efektorinių ląstelių aktyvavimą, veikė makrofagų

funkciją slopinant IL-12 ir TNF- α gamybą, skatino IL-10 raišką. VPA poveikis LPS sukeltam uždegiminiam atsakui pelių RAW 264.7 makrofagų tipo ląstelėse rodo, kad VPA mažina LPS sukeltą NF- κ B priklausomą transkripcijos aktyvumą per susilpnėjusią PI3K/Akt/MDM2 aktyvaciją ir slopinant p53 raišką.

Gydytuose VPA fibroblastuose sumažėjo CCL2, VEGF-A, IL-15 kiekis, o esant TNF- α , VPA slopino CCL5 ir VEGF-A indukciją bei NF- κ B2 p100 kiekį. VPA Dengės virusu (DENV) užkrėstuose žmogaus monocitų makrofaguose sumažino IL-8, IL-1b, IL-6, TNF- α ir IL-10 sekreciją. Tyrimai rodo, kad VPA moduliuoja citokinų audrą, susijusią su DENV liga, ir užkerta kelią sunkiai ligos eigai. VPA gydytų sveikų kraujo donorų T CD8⁺ limfocitų ląstelių proliferacija sumažėjo.

Virusų dauginimasis ir išgyvenamumas priklauso nuo ląstelės mitochondrijų gaminamos energijos, todėl antivirusinė terapija gali apimti vaistus, kurie keičia mitochondrijų energijos mechanizmą. Mitochondrijos atlieka funkcijas aktyvuojant antivirusinius ir priešuždegiminius mechanizmus. VPA mažina oksidacinį stresą stiprindamas fermentinę antioksidacinę sistemą. VPA gali aktyvuoti SLC5A8 geną, per DNR metilinimo reguliavimą, padidinti jo raišką ląstelėse. SLC5A8 atlieka fiziologinę funkciją transportuodamas trumpos grandinės riebalines rūgštis į ląstelę ir reguliuoja mitochondrijų metabolizmą, SLC5A8 yra DCA pernešėjas į ląstelę. SLC5A8 aktyvumas pasižymi imunomoduliuojančiu poveikiu, nes blokuoja dendritinių ląstelių raidą, todėl SLC5A8 yra būtinas imuninei homeostazei, išlaisvinant citokinus. SLC5A8 sukelia ląstelių apoptozę slopindamas nuo piruvato priklausomas HDAC. SLC5A8 geno slopinimas yra susijęs su DNR metiliniu, o gydant DNR demetilinančiomis medžiagomis, kaip VPA, padidėja SLC5A8 geno raiška. VPA per mitochondrijas gali poliarizuoti prouždegiminį M1 makrofagų fenotipą į priešuždegiminį M2, kuris negali paskatinti naivių T CD4⁺ diferenciacijos į Th1 profilį, pirmenybę teikdamas Th2 fenotipui. SLC5A8, dalyvaudamas mitochondrijų β -oksidacijos kelyje, reguliuoja mitochondrijų metabolizmą.

Prouždegiminės-imuninės ląstelės didžiąją dalį energijos gauna iš aerobinės glikolizės. Greitam virusų aktyvuotų T ląstelių augimui ir dauginimuisi būtinas gliukozės pasisavinimas ir glikolizė. Padidėjęs gliukozės kiekis sudaro palankias sąlygas SARS-CoV-2 infekcijos progresavimui. VPA mažina gliukozės kiekį gyvūnų ir žmonių kraujyje.

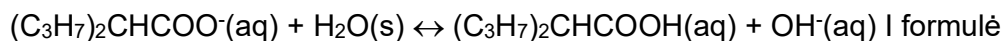
VPA turi antitrombocitinį ir antitrombozinį poveikį. Klinikinis VPA vartojimas gydant epilepsiją siejamas su mažesne trombozės, miokardo infarkto ir insulto rizika. Taigi VPA galėtų būti potenciali alternatyva trombozinių reiškinių prevencijai sunkių infekcijų metu,

pagrįsta pagerėjusia endogenine fibrinolize. VPA antitrombozinis poveikis gali būti reikšmingai susijęs su jo poveikiu imuninio atsako slopinimui.

DCA ir VPA druskų derinių sąveikos mišiniuose ar tirpaluose charakteristika

Natrio dichloroacetatas (NaDCA) yra elektrolitas ir vandeniniame tirpale visiškai jonizuojasi. Tai stipriosios rūgšties (Cl_2HCOOH) ir stipriosios bazės (NaOH) druska, todėl jonų hidrolizė vandeniniame tirpale nevyksta, terpė išlieka neutrali, nesusiformuoja nauji joniniai ryšiai. Teoriniai skaičiavimai, susiję su jonų aktyvumu tirpale, rodo, kad tarp druskų derinių sąveikos nėra, o tai neturi įtakos anijonų biologiniam efektyvumui. Pastarasis priklauso tik nuo anijonų koncentracijos terpėje.

Aukščiau minėta charakteristika taip pat taikoma natrio valproato tirpalui. Šį tirpalą sudaro silpna valproinės rūgšties druska $(\text{C}_3\text{H}_7)_2\text{CHOOH}$ ir stipri bazė (NaOH). Sisteminis VPA pavadinimas yra 2-propilpentano rūgštis, o anijono hidrolizė vyksta atitinkamai:



Hidrolizės sukeltas anijonų koncentracijos sumažėjimas yra nereikšmingas ir visiškai neįtakoja biologinio aktyvumo. Natrio dichloroacetato ir natrio valproato derinio gautas vandeninis tirpalas yra vienalytis jonų mišinys. Šiame mišinyje cheminė sąveika tarp jonų yra nedidelė, panašiai, kaip druskos yra atskiruose tirpaluose. Mišinyje esančių anijonų sąveikos biologiniam aktyvumui jokios įtakos neturi, t. y. biologinį aktyvumą lemia tik šių koncentracija. Kambario temperatūroje pastebėta, kad aukščiau paminėtuose kietųjų susmulkintų druskų deriniuose nėra kietosios fazės interjoninių virsmų. Šie mišiniai, kuriuos sudaro katjonai ir anijonai, pasižymi biologiniu aktyvumu, kurį įtakoja tik sumaišytų druskų santykis. Tai rodo, kad naudojant šiuos druskos derinius galima sukurti farmacinę formą. Tiek kietose mišiniuose, tiek vandeniniuose tirpaluose valpro rūgšties magnio druskų tirpumas yra mažesnis, lyginant atitinkamas valproinės rūgšties natrio druskas. Tačiau tik magnio druskų tirpaluose, kurie gaunami iš silpnų bazių ir silpnų rūgščių, druskų jonų hidrolizės procesai yra šiek tiek labiau pastebimi. Skaičiavimai rodo, kad ši hidrolizė turi minimalų poveikį pradinį jonų koncentracijai ir reikšmingai nekeičia esamų anijonų koncentracijų ar jų biologinio aktyvumo. Šiuo metu jau yra keletą registruotų natrio ir magnio valproato tirpalų ir druskų farmacinių formų.

Su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų sekoskaitos pelių timocituose ir suaugusių vyrų T limfocituose tyrimas

Sekoskaitos genų duomenų kokybę įvertinta naudojant MultiQC v1.13. Adapterių 3' nukleotidų sekos bei sekos, kurių ilgis mažesnis nei 15 nukleotidų, o kokybės balas mažesnis nei 25, pašalintos naudojant Cutadapt v1.9.1. Žmogaus genomą (GRCh38.p13) parsisiųstas iš Ensembl duomenų bazės. Likusios sekos sulygintos su žmogaus genomu STAR 2.1.3 įrankiu. Genų raiškos matrica gauta, naudojant FeatureCounts v3.15. Sekų raiška normalizuota viršutinio kvartilio metodu, pašalinti genai, kurių suminė raiška tarp mėginių mažesnė nei 50. Diferencialinė genų raiškos analizė atlikta su DESeq2 v3.15, *p*-reikšmės koreguotos naudojant Benjamin-Hochberg metodą. Raiškos biologinių kelių praturtinimo analizė atlikta naudojantis DAVID serverį.

Suaugusių sveikų pacientų T limfocitų, gydytų DCA–VPA, su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų praturtinamoji analizė

Aštuonių sveikų vyrų T limfocitai 24 valandas *in vitro* buvo veikiami 2 mM VPA ir 5 mM DCA deriniu. Duomenys palyginti su kontroliniais (negydytais T limfocitais). Genų raiškos duomenys iš gydytų ir kontrolės sąlygų buvo normalizuoti ir logaritmiškai transformuoti.

Genų rinkinių praturtinimo analizės (Gene Set Enrichment Analysis; GSEA) rezultatams analizuoti buvo naudojami Enrichplot v1.2 ir ClusterProfiler v4.8.2 R paketai. GSEA buvo atlikta taikant nustatytus algoritmus, pagal kuriuos apskaičiuoti kiekvieno dominančio kelio ar genų rinkinio praturtinimo balai ir *p* vertės. Genų rinkinių anotacijos buvo gautos iš Genų ontologijos (Gene Ontology; GO), KEGG ir Reactome duomenų bazių. DCA-VPA poveikio T limfocitų su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raiškai virusinių ir bakterinių infekcijų biologiniuose KEGG keliuose pavyzdžiai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Sekoskaitos tyrimo DCA-VPA poveikio vyrų T limfocitų su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų poveikio raiškai praturtinančioji analizės duomenys

Kelio pavadinimas: Kodas	Paveiktų genų skaičius (n)	p reikšmė	DCA-VPA preparato poveikis genų raiškai	Kelio praturtinimas kartais
Gynybinis atsakas į bakterijas: GO:0042742	21	4,62E-10	Padidina: <i>CCL20, CEBPB, IRF8, IRGM, MICA, PPBP</i> Sumažina: <i>CLEC4E, CXCL13, FCGR1A, IL10, ISG15, LYZ, MYD88, NOD1, NOD2, OAS1, OAS2, LC11A1, SYK, TLR4, TNFRSF1A</i>	5,93
Gynybinis atsakas į gram-teigiamas bakterijas: GO:0050830	16	1,00E-09	Padidina: <i>TNF</i> Sumažina: <i>C5AR1, HAVCR2, IL12A, IL17A, IL17F, IL7R, IL18, IL27RA, IL6R, LYZ, MYD88, NOD1, NOD2, TLR2, TNFRSF14</i>	8,23
Gynybinis atsakas į gram-neigiamas bakterijas: GO:0050829	12	1,66E-07	Padidina: <i>IL23A, IRGM</i> Sumažina: <i>CASP1, CD4, IL17A, IL17F, IL23R, IL6R, LYZ, SLC11A1, TLR4, TNFRSF14</i>	8,47
Viruso receptorių aktyvumas: GO:0001618	9	2,37E-05	Padidina: <i>CD81</i> Sumažina: <i>CCR5, CD209, CD4, CD80, CD86, ICAM1, TNFRSF4, TNFRSF14</i>	7,58
Viruso baltymo sąveika su citokinu ir citokino receptoriumi: hsa04061	49	1,13E-47	Padidina: <i>CCL20, CCR10, IL18R1, IL20, IL20RB, PPBP, TNF, TNFRSF10A</i> Sumažina: <i>ACKR3, CCL2, CCL5, CCL7, CCL13, CCL18, CCL19, CCL22, CCL23, CCL24, CCL28, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6, CCR8, CSF1, CSF1R, CX3CR1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCR2, CXCR3, IL2, IL2RA, IL2RB, IL6R, IL10, IL18, IL18RAP, TNFRSF1A, TNFSF10, TNFRSF14</i>	16,39

Kelio pavadinimas: Kodas	Paveiktų genų skaičius (n)	p reikšmė	DCA-VPA preparato poveikis genų raiškai	Kelio praturtinimas kartais
Uždegiminė žarnyno liga: hsa05321	30	1,0E-27	Padidina: <i>IFNG, IL18R1, IL23A, JUN, NFATC1, RELA, RORA, RORC, STAT3, STAT4, TGFB1, TNF</i> Sumažina: <i>HLA-DMA, HLA-DPA1, IFNGR2, IL10, IL12A, IL12RB1, IL13, IL17A, IL17F, IL18, IL18RAP, IL2, IL22, IL23R, IL4, NOD2, TLR2, TLR4</i>	15,44
Tymai: hsa05162	36	1,87E-23	Padidina: <i>CBLB, CD28, CDK2, CHUK, FADD, IFNB1, IKBKB, IRF3, JAK1, JUN, MAP3K7, MAPK8, RELA, STAT3, TRAF6, TYK2</i> Sumažina: <i>CD209, EIF2AK2, FAS, IFIH1, IL12A, IL2, IL2RA, IL2RB, IRF7, IRF9, JAK3, MX1, MX2, MYD88, OAS1, OAS2, TLR2, TLR4, TLR7, TP53</i>	8,67
Gripas A: hsa05164	38	2,86E-22	Padidina: <i>CHUK, FADD, IFNB1, IFNG, IKBKB, IRF3, JAK1, MAPK1, RELA, TNF, TNFRSF10A, TYK2</i> Sumažina: <i>CASP1, CCL2, CCL5, CIITA, CXCL10, EIF2AK2, FAS, HLA-DMA, HLA-DPA1, ICAM1, IFIH1, IFNGR2, IL12A, IL18, IRF7, IRF9, MX1, MX2, MYD88, NLRP3, OAS1, OAS2, TLR4, TLR7, TNFRSF1A, TNFSF10</i>	7,44
Epšteino-Barro viruso infekcija: hsa05169	40	1,55E-21	Padidina: <i>CDK2, CHUK, FADD, HLA-G, IFNB1, IKBKB, IRF3, JAK1, JUN, MAP2K3, MAP3K7, MAPK8, NFKB2, RELA, RUNX3, STAT3, TNF, TRAF6, TYK2</i> Sumažina: <i>BLNK, BTK, CXCL10, EIF2AK2, FAS, FCER2, HLA-DMA, HLA-DPA1, ICAM1,</i>	6,63

Kelio pavadinimas: Kodas	Paveiktų genų skaičius (n)	p reikšmė	DCA-VPA preparato poveikis genų raiškai	Kelio praturtinimas kartais
			<i>IRF7, IRF9, ISG15, JAK3, LYN, MYC, MYD88, OAS1, OAS2, SYK, TLR2, TP53</i>	
Koronaviruso liga – COVID-19: hsa05171	42	4,21E-21	Padidina: <i>C3, CHUK, CSF3, IFNB1, IKBKB, IRF3, JAK1, JUN, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, PRKCG, RELA, STAT3, TNF, TYK2</i> Sumažina: <i>C3AR1, C5AR1, CASP1, CCL2, CXCL10, EIF2AK2, IFIH1, IL12A, IL2, IL6R, IRF9, ISG15, MX1, MX2, MYD88, NLRP3, OAS1, OAS2, STING1, SYK, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, TNFRSF1A, TRAF6</i>	6,06
Tuberkuliozė: hsa05152	37	1,83E-20	Padidina: <i>C3, CEBPB, FADD, HSPD1, IFNB1, IFNG, IL23A, IRAK2, JAK1, MAPK1, MAPK8, RELA, TGFB1, TNF, TRAF6</i> Sumažina: <i>CD14, CD209, CD74, CIITA, CLEC4E, CLEC7A, FCGR1A, HLA-DMA, HLA-DPA1, IFNGR2, IL10, IL12A, IL18, ITGAM, ITGB2, MYD88, NOD2, SYK, TLR1, TLR2, TLR4, TNFRSF1A</i>	6,88
Hepatitis B: hsa05161	34	4,45E-19	Padidina: <i>CDK2, CHUK, EGR3, ELK1, FADD, IFNB1, IKBKB, IRF3, JAK1, JUN, MAP2K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, NFATC1, NFATC3, PRKCG, RELA, STAT3, STAT4, TGFB1, TNF, TRAF6, TYK2</i> Sumažina: <i>FAS, IFIH1, IRF7, JAK3, MMP9, MYC, MYD88, TLR2, TLR4, TP53</i>	7,02
Toksoplazmozė: hsa05145	28	9,28E-18	Padidina: <i>CHUK, IFNG, IKBKB, IRGM, JAK1, MAP2K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, RELA, STAT3, TGFB1, TNF, TYK2</i>	8,36

Kelio pavadinimas: Kodas	Paveiktų genų skaičius (n)	p reikšmė	DCA-VPA preparato poveikis genų raiškai	Kelio praturtinimas kartais
			Sumažina: CCR5, CD40LG, CIITA, HLA-DMA, HLA-DPA1, IFNGR2, IL10, IL12A, LY96, MYD88, TLR2, TLR4, TNFRSF1A, TRAF6	
Leišmaniozė: hsa05140	24	1,53E-17	Padidina: C3, ELK1, IFNG, JAK1, JUN, MAP3K7, MAPK1, PTGS2, RELA, TGFB1, TNF Sumažina: FCGR1A, HLA-DMA, HLA-DPA1, IFNGR2, IL10, IL12A, IL4, ITGAM, ITGB2, MYD88, TLR2, TLR4, TRAF6	10,43
Kokliušas: hsa05133	22	2,59E-15	Padidina: C3, IL23A, IRF3, IRF8, JUN, MAPK1, MAPK8, RELA, TNF Sumažina: CASP1, CD14, CXCL5, IL10, IL12A, ITGAM, ITGB2, LY96, MYD88, NLRP3, NOD1, TLR4, TRAF6	9,69
Hepatitis C: hsa05160	29	1,03E-14	Padidina: TNF, RELA, MAPK1, JAK1, IKBKB, CHUK, IRF3, CD81, FADD, IFNB1, STAT3, TYK2, IFNG, CDK2, PPARA Sumažina: MX1, EIF2AK2, MX2, TNFRSF1A, OAS2, TP53, OAS1, TRAF6, IFIT1, MYC, CXCL10, IRF7, FAS, IRF9	6,18
Čagaso liga: hsa05142	24	1,44E-14	Padidina: C3, CHUK, FADD, IFNB1, IFNG, IKBKB, JUN, MAPK1, MAPK8, RELA, TGFB1, TNF Sumažina: CCL2, CCL5, FAS, IFNGR2, IL10, IL12A, IL2, MYD88, TLR2, TLR4, TNFRSF1A, TRAF6	7,87
Malarija: hsa05144	18	2,66E-14	Padidina: CD81, CSF3, IFNG, MET, TGFB1, TNF	12,05

Kelio pavadinimas: Kodas	Paveiktų genų skaičius (n)	p reikšmė	DCA-VPA preparato poveikis genų raiškai	Kelio praturtinimas kartais
			Sumažina: CCL2, CD40LG, ICAM1, IL10, IL12A, IL18, ITGB2, MYD88, THBS1, TLR2, TLR4, VCAM1	
Žmogaus citomegaloviruso infekcija: hsa05163	31	3,13E-12	Padidina: CHUK, ELK1, FADD, HLA-G, IFNB1, IKBKB, IRF3, JAK1, MAPK1, NFATC1, NFATC3, PRKCG, PTGS2, RELA, STAT3, TNF, VEGFA Sumažina: CCL2, CCL5, CCR1, CCR3, CCR5, CXCL12, CXCR2, FAS, IL1R1, IL6R, MYC, STING1, TNFRSF1A, TP53	4,61
Legionellozė: hsa05134	17	4,53E-12	Padidina: C3, HSPD1, NFKB2, RELA, TNF Sumažina: CASP1, CD14, CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL12A, IL18, ITGAM, ITGB2, MYD88, TLR2, TLR4	9,98
Jersinia infekcija: hsa05135	24	1,05E-11	Padidina: CDC42, CHUK, IFNB1, IKBKB, IRF3, JUN, MAP2K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, NFATC1, NFATC3, RELA, TNF, TRAF6 Sumažina: CASP1, CCL2, CD4, IL10, IL18, IL2, MYD88, NLRP3, TLR4	5,86
Amoebiazė: hsa05146	20	1,10E-10	Padidina: IFNG, PRKCG, RELA, TGFB1, TNF Sumažina: CD14, CD1B, CD1C, CD1D, CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL10, IL12A, IL1R1, IL1R2, ITGAM, ITGB2, TLR2, TLR4	6,56
Žmogaus imunodeficit viruso infekcija: hsa05170	1 25	1,50E-08	Padidina: CHUK, FADD, HLA-G, IFNB1, IKBKB, IRF3, JUN, MAP2K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, NFATC1, NFATC3, PRKCG, RELA, TNF, TRAF6 Sumažina: CCR5, CD4, FAS, MYD88, STING1, TLR2, TLR4,	3,95

Kelio pavadinimas: Kodas	Paveiktų genų skaičius (n)	p reikšmė	DCA-VPA preparato poveikis genų raiškai	Kelio praturtinimas kartais
			<i>TNFRSF1A</i>	
Šigeliozė: hsa05131	26	7,03E-08	Padidina: <i>C3, CDC42, CHUK, IFNB1, IKBKB, IRF3, JUN, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, RELA, TNF, TRAF6, UBE2N</i> Sumažina: <i>CASP1, CCL5, CD14, IL18, IL1R1, MYD88, NLRP3, NOD1, STING1, TLR4, TNFRSF1A, TP53</i>	3,52
Afrikinė tripanozomiazė: hsa05143	11	7,79E-08	Padidina: <i>IFNG, PRKCG, TNF</i> Sumažina: <i>FAS, ICAM1, IDO1, IL10, IL12A, IL18, MYD88, VCAM1</i>	9,95
Salmonella infekcija: hsa05132	26	8,24E-08	Padidina: <i>CDC42, CHUK, FADD, IKBKB, JUN, MAP2K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, RELA, TNF, TNFRSF10A, TRAF6</i> Sumažina: <i>CASP1, CD14, IL18, LY96, MYC, MYD88, NLRP3, NOD1, PTPRC, TLR2, TLR4, TNFRSF1A, TNFSF10</i>	3,49
Helicobacter pylori infekcijos epitelio ląstelių signalizacija: hsa05120	14	1,10E-07	Padidina: <i>CDC42, CHUK, IKBKB, JUN, MAPK8, MET, RELA</i> Sumažina: <i>CCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR2, LYN, NOD1</i>	6,69
Pathogeninė Escherichia coli infekcija: hsa05130	21	1,46E-06	Padidina: <i>CDC42, CHUK, FADD, IKBKB, JUN, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, RELA, TNF, TNFRSF10A, TRAF6</i> Sumažina: <i>CASP1, FAS, IL18, IL1R1, MYD88, NLRP3, TLR4, TNFRSF1A, TNFSF10</i>	3,57

Kelio pavadinimas: Kodas	Paveiktų genų skaičius (n)	p reikšmė	DCA-VPA preparato poveikis genų raiškai	Kelio praturtinimas kartais
Herpes simplex viruso 1 infekcija: hsa05168	35	3,55E-06	Padidina: C3, CHUK, FADD, HLA-G, IFNB1, IFNG, IKBKB, IRF3, JAK1, MAP3K7, RELA, TNF, TYK2 Sumažina: CCL2, CCL5, CD74, EIF2AK2, FAS, HLA-DMA, HLA-DPA1, IFIH1, IFNGR2, IL12A, IRF7, IRF9, MYD88, OAS1, OAS2, STING1, SYK, TLR2, TNFRSF14, TNFRSF1A, TP53, TRAF6	2,37
Virusinis myokarditas: hsa05416	11	9,24E-06	Padidina: CAV1, CD28, HLA-G Sumažina: CD40LG, CD80, CD86, HLA-DMA, HLA-DPA1, ICAM1, ITGB2, PRF1	6,13
Žmogaus papilomaviruso infekcija: hsa05165	26	1,58E-05	Padidina: CDC42, CDK2, CHUK, FADD, HLA-G, IFNB1, IKBKB, IRF3, JAK1, MAPK1, PRKCZ, PTGS2, RELA, TNF, TYK2, VEGFA Sumažina: EIF2AK2, FAS, IRF9, ISG15, MX1, MX2, SPP1, THBS1, TNFRSF1A, TP53	2,63
Staphylococcus aureus infekcija: hsa05150	11	0,00058	Padidina: C3 Sumažina: IL10, HLA-DMA, HLA-DPA1, ICAM1, ITGAM, C5AR1, ITGB2, FPR1, C3AR1, FCGR1A	3,83

DCA-VPA poveikio praturtinimo analizė parodė, kad gydant DCA-VPA bakterinių ar virusinių infekcijų biologiniuose keliuose konkrečių genų, susijusių su uždegimu ar imuniniu atsaku, raiška padidėja arba slopinama (1 lentelė).

Gydymas DCA-VPA padidino C3, CAV1, CBLB, CCL20, CCR10, CD28, CD81, CDC42, CDK2, CEBPB, CHUK, CSF3, EGR3, ELK1, FADD, HLA-G, HSPD1, IFNB1, IFNG, IKBKB, IL18R1, IL20, IL20RB, IL23A, IRAK2, IRF3, IRF8, IRGM, JAK1, JUN, MAP2K3, MAP3K7, MAPK1, MAPK8, MET, MICA, NFATC1, NFATC3, NFKB2, PPARA, PPBP,

PRKCG, PRKCZ, PTGS2, RELA, RORA, RORC, RUNX3, STAT3, STAT4, TGFB1, TNF, TNFRSF10A, TRAF6, TYK2, UBE2N, VEGFA genų raišką.

Genai, kurių raišką DCA-VPA slopina, yra *ACKR3, BLNK, BTK, C3AR1, C5AR1, CASP1, CCL13, CCL18, CCL19, CCL2, CCL22, CCL23, CCL24, CCL28, CCL5, CCL7, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6, CCR8, CD14, CD1B, CD1C, CD1D, CD209, CD4, CD40LG, CD74, CD80, CD86, CIITA, CLEC4E, CLEC7A, CSF1, CSF1R, CX3CR1, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL9, CXCR2, CXCR3, EIF2AK2, FAS, FCER2, FCGR1A, FPR1, HAVCR2, HLA-DMA, HLA-DPA1, ICAM1, IDO1, IFIH1, IFNGR2, IFNGR2, IL10, IL12A, IL12RB1, IL13, IL17A, IL17F, IL18, IL18RAP, IL1R1, IL1R2, IL2, IL22, IL23R, IL27RA, IL2RA, IL2RB, IL4, IL6R, IL6R, IL7R, IRF7, IRF9, ISG15, ISG15, ITGAM, ITGB2, JAK3, LC11A1, LY96, LYN, LYZ, MYC, MYD88, MMP9, MX1, MX2, NLRP3, NOD1, NOD2, OAS1, OAS2, PRF1, PTPRC, SYK, SLC11A1, SPP1, STING1, THBS1, TLR1, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8, TNFRSF14, TNFRSF1A, TNFRSF4, TNFSF10, TP53, TRAF6, VCAM1*.

GSEA analizės rezultatai rodo reikšmingą gydymo DCA-VPA poveikį su uždegimu ir imunitetu susijusių genų raiškai ir kelių reguliavimui, preparato terapinį poveikį svarbiems, susijusiems su virusinės ar bakterinės infekcijos sukeltu uždegimu, ląstelių procesams. Nustatyti T limfocitų genų raiškos pokyčiai leidžia teigti, kad gydymas DCA-VPA gali moduluoti uždegimą ir imuninį atsaką, o terapinis poveikis gali pagerinti infekcijos eigą.

DCA-VPA derinys, išradime yra skirtas panaudoti virusinėms arba bakterinėms infekcijoms arba uždegiminėms ligoms, susidedančioms iš grupės, kurią sudaro vidurių šiltinė ir paratifai (tarptautinis ligų klasifikacijos kodas – A01), kitos salmonelių sukeltos infekcijos (A02), šigeliozė (A03), kitos bakterijų sukeltos žarnyno infekcijos (A04), patogeninių *Escherichia coli* sukeltos infekcijos (A04.0–A04.4), *Clostridium difficile* sukeltas enterokolitas (A04.7), amebiazė (A06), tuberkuliozė (A15–A19), ne žarnyno jersinijozė (A28.2), kokliušas (A37), meningokokinė infekcija (A39), streptokokinis sepsis (A40), kitas sepsis (A41), legioneliozė (A48.1), stafilokokų sukelta infekcija (A49.0), Laimo liga (A69.2), netipinės virusų sukeltos centrinės nervų sistemos infekcijos (A81), moskitų platinamas virusinis encefalitas (A83), erkių platinamas virusinis encefalitas (A84), pūslelinės virusų (*herpes simplex*) sukeltos infekcijos (B00), juostinė pūslelinė (B02), tymai (B05), ūminis hepatitas (B16), ūminis hepatitas C (B17.1), lėtinis virusinis hepatitas (B18), žmogaus imunodeficitu viruso (ŽIV) sukelta liga (B20–B24), citomegalo viruso sukelta liga (B25), infekcinė mononukleozė (B27), maliarija (B50–B54), leišmaniozė (B55), afrikinė tripanosomozė (B56), Čagaso liga (B57), toksoplazmozė (B58), gripas ir pneumonija (J09–

J18), COVID liga (U07.1), *Helicobacter pylori* infekcija (B96.81), žmogaus papilomavirusinė infekcija, SARS, MERS infekcijos, gram-teigiamų bakterijų sukeltos infekcijos, gram-neigiamų bakterijų sukeltos infekcijos, uždegiminės žarnyno ligos.

Sinergistinis DCA ir VPA poveikis pernešant dichloroacetato anijoną į ląstelę

1 paveiksle pavaizduotas DCA-VPA gydymo poveikis *Slc5a8* geno raiškai Mus Musculus pelių patinų timocituose *in vivo*. Tirta 11 pelių (6–7 savaičių amžiaus, 6-ios – kontrolė ir 5-ios –gydytos deriniu). Pelės girdytos DCA-VPA derinio vandeniniu tirpalu (DCA 100 mg/kg ir VPA 150 mg/kg/parai) dvi savaites. Palyginus su kontrole, gydymas deriniu statistiškai reikšmingai padidino *Slc5a8* raišką pelių timocituose. Statistinis reikšmingumas apskaičiuotas pagal Mann-Whitney U kriterijų. SLC5A8 yra nuo natrio ir chlorido jonų priklausomas monokarboksilatų nešiklis, pernešantis į ląsteles dichloroacetato anijoną. SLC5A8 geno slopinimas yra susijęs su DNR metiliniu, o VPA slopina HDAC aktyvumą, sukeldamas DNR demetilimą didina *Slc5a8* raišką ląstelėse. Šis poveikis yra sinergistinis, VPA gerinant DCA pernešimą į ląsteles ir taip stiprinant DCA farmakologinį poveikį.

DCA-VPA poveikis žiurkių timocitų CD4⁺_IL17 ir CD4⁺_CD27⁻_IFN γ ⁺ + populiacijų kiekiui

2 ir 3 paveiksluose yra pateikti žiurkių patinų timocitų tėkmės citometrijos tyrimų duomenys – DCA-VPA poveikis žiurkių patinų timocitams, CD4⁺_IL17⁺, ir CD4⁺_CD27⁻_IFN γ ⁺ populiacijų kiekiui. Tirti timocitai šių žiurkių grupių: kontrolės grupė (n = 7), gydytų DCA-VPA grupė (n = 7). Žiurkės girdytos DCA-VPA derinio vandeniniu tirpalu (DCA 100 mg/kg ir VPA 150 mg/kg/parai) dvi savaites.

Palyginus su atitinkama kontrole, žiurkių patinų, dvi savaites gydytų DCA-VPA, CD4⁺_IL17, timocitų kiekis buvo statistiškai reikšmingai sumažėjęs (2 paveikslas). Th17 limfocitai, NK, CD8⁺ ir γ DT ląstelės gali išskirti IL-17. IL-17 skatina neutrofilų prouždegimines reakcijas uždegiminių ligų metu, sukelia keletą prouždegiminių ligų, nes sutrinka IL-17 ir IL-22 reguliacija. Todėl Th17 medijuojamo prouždegiminio atsako slopinimas gali būti veiksminga citokinų audros gydymo strategija. Fedratinibas, taikomas slopinti Th17 ląsteles ir IL-17 raišką žiurkių modeliuose. Su Th17 susijusių prouždegiminių citokinų IL-17, IL-15, IL-6, TNF ir IFN koncentracija yra reikšmingai padidėjusi SARS-CoV-2 infekcijos metu, ir tai susiję su COVID-19 sunkumu. IL-17 kiekis SARS-CoV-2 ar Vidurio Rytų respiraciniu sindromu (MERS) infekcija sergančių pacientų, kai yra ūmus kvėpavimo takų distreso sindromas (ARDS), yra didesnis nei įprastai užsikrėtusiems pacientams.

Palyginus su atitinkama kontrole, dvi savaites gydytų DCA-VPA žiurkių CD4⁺_CD27⁻_IFN- γ ⁺ timocitų, išskiriančių IFN- γ , populiacijos kiekis buvo statistiškai reikšmingai mažesnis (3 paveikslas). IFN- γ yra vienintelis II tipo IFN, kurį gamina įvairios limfocitų ląstelės, įskaitant CD4⁺ ir CD8⁺ T ląsteles, B ląsteles ir NK ląsteles. IFN- γ gali sintetinti ir kitos imuninės ląstelės, pavyzdžiui, monocitai, makrofagai, DC ir neutrofilų granulocitai. Tačiau T ląstelės ir NK ląstelės yra pagrindiniai šio citokino šaltiniai. Dėl savo įvairialypės ir įvairialypės veiklos IFN- γ sunku priskirti pro- arba priešuždegiminiam citokinui. COVID-19 pacientai turi padidėjusį IFN- γ kiekį serume, kuris yra panašus į SARS-CoV ir MERS infekcijų lygį, bet nenustatyta reikšmingų IFN- γ kiekio skirtumų tarp sunkių ir lengvų COVID-19 pacientų. Nustatyta, kad sunkių simptomų turinčių asmenų CD4⁺ T ląstelės išskiria mažesnę IFN- γ kiekį, palyginti su lengvų simptomų turinčiais asmenimis, o tai rodo, kad SARS-CoV-2 infekcija gali turėti svarbią reikšmę IFN- γ sekrecijai ir T ląstelių funkcijai.

DCA-VPA poveikis pelių timocitų su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raiškai

4 pavaizduotas pateikta DCA-VPA gydymo poveikis su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raiškai *Mus Musculus* pelių patinų timocituose *in vivo*. Tirta 11 pelių (6–7 savaičių amžiaus, 6-ios – kontrolė ir 5-ios – gydytos deriniu). Pelėms buvo skiriamas DCA-VPA derinio vandeninis tirpalas (DCA 100 mg/kg ir VPA 150 mg/kg/parai) dvi savaites. DCA-VPA gydymo poveikis apskaičiuotas palyginant gydytų ir kontrolės pelių geno raišką. Žemiau pateikti nustatytų genų raiškos reikšmingi pokyčiai, kai $p < 0,05$.

Gydymas DCA-VPA reikšmingai padidino su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raišką: *Acad11, Akr4, Adad1, Art3, Bmp4, Bmp7, C3, Ccl19, Ccl25, Cebpa, Ciita, Cmk1r1, Crp, Cx3cl1, Cxcl11, Cxcl12, Cxcl13, Dexi, Egfr, Egr3, Glce, Ifitm3, Il2, Il21, Il23a, Il27, Il33, Il7, Irf6, Lep, Lyz1, Lrp1, Nos2, Pparg, Rnf128, Socs1*.

Gydymas DCA-VPA reikšmingai sumažino su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raišką: *Ccl2, Ccl3, Ccr5, Cdkn1a, Cebpb, Clec4e, Csf3, Ctla4, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl3, Gzmb, H2-Q7, Icos, Il17f, Il18r1, Il1r1, Il6, Nr4a3, Ptgs2, Rel, Rn18s, Rora, Spp1, Thbs1, Tnfsf11, Vegfa*. Pelių genų sekoskaitos tyrimų duomenys rodo, kad gydymas DCA-VPA pasižymi priešuždegiminiu poveikiu.

DCA-VPA preparato slopinantis poveikis IL-17 signalo perdavimo kelio pelių timocituose

Pelių su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genu sekoskaitos tyrimas parodė, kad gydymas DCA-VPA slopina IL-17 signalo perdavimo biologinį kelią, slopindamas IL-17F ir IL-17RC genų, chemokinių CXCL1, CXCL2, CCL2 genų ir citokinių IL-6, COX2 ir G-CSF genų raišką (5 paveikslas).

DCA-VPA slopina IL-17 signalo perdavimo kelyje IL-17RC ir IL-RC grandines (5 paveikslas). IL-17 receptorių (IL-17R) sudaro specifinė IL-17RC ir bendroji IL-17RA grandinės kaip homodimeras arba IL-17A/F kaip heterodimeras. IL-17F homodimerai jungiasi prie to paties receptoriaus. Žmogaus ląstelės turi IL-17RA/C ir reaguoja į IL-17A ar IL-F panašia uždegiminių genų indukcija.

Infekcijos metu gaminami prouždegiminiai citokinai ar chemokinai, pavyzdžiui, TNF, IL-6, 1 tipo IFN, chemokino ligandas CCL2, o tai iššaukia T limfocitų, monocitų ir makrofagų migraciją į infekcijos vietą. CCL2 taip pat išsiskiria virusinių infekcijų metu, kai gaminami IL-1 ir TNF- α . Tai sustiprina uždegimą ir pritraukia NK ir T ląsteles, kurios išskiria IFN- γ į uždegimo vietą. ACE2-Ang II ašis, kuri lemia makrofagų infiltraciją ir citokinių IL-6, CCL2 išsiskyrimą, yra susijusi su endotelio disfunkcija, trombino susidarymu ir prasta fibrinolize. SARS-CoV-2 reikšmingai didina CXCL1, CXCL2, CCL2, IL-1, TNF- α ir IL-2 raišką ląstelėse. DCA-VPA reikšmingai slopina citokino granulocitų kolonijas stimuliuojantį faktoriaus geno (G-CSF) raišką. Intensyviosios terapijos skyriuose gydomų COVID-19 pacientų G-CSF ir chemokino CCL2 kiekis buvo reikšmingai didesnis nei nehospitalizuotų.

DCA-VPA slopina ciklo-oksigenazės-2 (COX-2) geno raišką. Indukuojamasis COX-2 fermentas virusinių infekcijų metu reguliuoja daugelio serumo baltymų, įskaitant prouždegiminius citokinių raiškos lygį. COX-2 hiperekspresija aprašyta pacientams, mirusiems nuo H5N1 infekcijos ir jis yra susijęs su bloga virusinių infekcijų klinicine baigtimi. COX-2 metabolitų gamyba gali sukelti koagulopatiją ir hiperuždegimą sergantiems sunkia COVID-19 forma. SARS-CoV-2 įvairiose žmogaus ir pelių ląstelių kultūrų sistemose sukelia COX-2 pokyčius, kurie gali būti susiję su plaučių uždegimu ir ligos sunkumu. COX-2 susijusi su padidintu COVID-19 sergančių pacientų mirtingumu. Dėl didelio COX-2 kiekio sumažėja endogeninio antivirusinio junginio arachidono rūgšties, todėl ligoniai tampa jautresni COVID-19.

DCA-VPA poveikis COVID-19 biologiniam keliui, keičiant su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raišką pelių timocituose

DCA-VPA slopino IL-6 ir CCL2 (MCP-1) uždegimo citokinių genų raišką T limfocituose ir taip pat citokinių IL-6, G-CSF, MCP-1, kurie svarbūs citokinių audros patogenezei (6

paveikslas). IL-6 yra svarbus kontroliuojant uždegimo ūmios fazės baltymų atsaką, indukuoja IL-1 ir TNF- α ir IL-6 išskyrimą, reguliuoja STAT3 aktyvaciją, skatina T ląstelių augimą ir palaiko T ląstelių funkciją, kartu su TGF- β ir IL-21 skatina Th17 susidarymą ląstelėse. Padidėjęs IL-6 kiekis didina kraujagyslių pralaidumą, todėl uždegimas greitai plinta. IL-6 disreguliacija siejama su audinių ląstelių apoptoze ir nekroze. IL-6 reguliuoja limfocitų išsekimą, nekrozę ir neutrofilų chemotaksį, kurie yra labai svarbūs COVID-19 patofiziologijai. SARS-CoV-2 aktyvina makrofagus, skatinančius limfocitų nekrozę, gaminančius IL-6, o ne TNF- α ar IL-1. Sisteminių apžvalgų ir meta analizių duomenimis, daugiau kaip 50% COVID-19 sergančių pacientų buvo padidėjęs IL-6 kiekis. Palyginus su sveikųjų kontrole, IL-6 kiekis buvo didesnis pacientų, kuriems buvo citokinų audra ar ūmus kvėpavimo takų distreso sindromas. Sergant COVID-19 ir esant daugybinėms sisteminėms ir ekstrapulmoninėms ligoms IL-6 kiekis buvo keturgubai padidėjęs.

DCA-VPA reikšmingai slopina chemokino ligando 2 (CCL2), dar vadinamo MCP-1, raišką. CCL2 kontroliuoja monocitų chemotaksį, jų migraciją į kraujagyslių endotelį, infiltraciją ir diferenciaciją į makrofagus, yra daugelio uždegiminių sutrikimų veiksnys, kaip COVID-19, išeminė širdies liga, insultas. Jo kiekis yra padidėjęs SARS-CoV-2 infekcijos metu ir yra susijęs su kvėpavimo nepakankamumu, insultu, siejamas su padidėjusiu IL-1, IL-6, TNF- α ir tarpląstelinės adhezijos molekulės-1 kiekiu. Tarp sunkių COVID-19 pacientų, kuriems buvo padidėjusi CCL2 raiška, buvo didesnė inkstų nepakankamumo tikimybė ir blogesnė prognozė nei tų, kurių CCL2 kiekis buvo mažesnis.

DCA-VPA slopina matriksio metaloproteinazės-9 (MMP-9) geno raišką. COVID-19 pacientų plaučių audinio MMP-9 geno raiška buvo padidėjusi. Iš neutrofilų išsiskiriantis MMP-9 skatina uždegimą ir alveolinio-kapiliarinio barjero irimą, skatina uždegimo ląstelių migraciją į plaučių audinį ir jo destruktiją. MMP-9 koncentracija plazmoje yra tiesiogiai proporcinga kvėpavimo nepakankamumo rizikai, yra susijusi su COVID-19 pacientų mirtingumu. Sunki COVID-19 forma turi daug panašių į sepsį požymių, o MMP-9 laikoma sepsio pacientų biožymeniu.

DCA-VPA gydymo poveikis sveikų pacientų T limfocitų uždegimo ir imuninio atsako patofiziologiniams mechanizms

7 paveiksle yra parodyta DCA-VPA gydymo poveikis sveikų pacientų T limfocitų uždegimo ir imuninio atsako patofiziologiniams mechanizms, susijusiems su uždegimo ir imuninio atsako genais. DCA-VPA, sukeldamas su uždegimu ar imuniniu atsaku susijusių genų raiškos pokyčius, reikšmingai slopino ląstelinio atsako į chemokinus, bendrojo atsako

į chemokinus, chemokinių sukeltus signalo perdavimo kelius, monocitų chemotaksio, limfocitų chemotaksio biologinius mechanizmus, imuninės sistemos procesų ir imuninio atsako patofiziologinius mechanizmus. Tirtos 5-ųjų sveikų vyrų kontrolės ir 24 valandas gydytų 2 mM VPA ir 5 mM DCA deriniu T limfocitai. Gydomo poveikis vertintas palyginus kontrolės genų raišką su DCA-VPA gydytų T limfocitų genų raiška. Taikytas analizės metodas. Genų rinkinių/biologinių kelių praturtinimo diagrama nupiešta R enrichplot v1.2 programiniu paketu. Įvesties duomenis gauti nuo statistiškai reikšmingai išreikštų genų sąrašo, gauto atlikus diferencialinę genų raiškos analizę. Diagramoje (7 paveikslas) kiekvienas biologinis kelias pavaizduotas y ašyje, o x ašyje rodomas praturtinimo balas. Biologiniai keliai, kurių praturtinimo balas < 0 – slopinami, o kurių > 0 – aktyvinami.

DCA-VPA gydymo poveikis sveikų pacientų stimuliuotų T limfocitų uždegimo ir imuninio atsako patofiziologiniams mechanizms, susijusiems su genų raiškos pokyčiais

Buvo palyginta stimuliuotų sveikų vyrų T limfocitų grupės: 1) kontrolės ir 2) stimuliuotų ir 24 valandas gydytų DCA-VPA deriniu. T limfocitai 24 valandas buvo stimuliuoti kalcio jonoforu (kalcio jonoforo A23187 hemikalcio druska, (C9275); dozė – 500 ng/ml; gamintojas Sigma-Aldrich) ir PMA (forbolio 12-miristato 13-acetatu (P8139); dozė – 50 ng/ml; gamintojas Sigma-Aldrich). Stimuliuotų gydytų T limfocitų grupės ląstelės buvo gydytos 2 mM VPA ir 5 mM DCA deriniu. Kontrolės ($n = 6$) ir gydytų sveikų vyrų ($n = 6$) T limfocitai buvo tirti sekoskaitos metodu nustatant su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų raišką bei analizuojant DCA-VPA poveikį biologiniams uždegimo mechanizms ir keliams.

PMA tiesiogiai aktyvuoja baltymų kinazę C, stipriai indukuoja ekstraląstelinį ir intraląstelinį ROS ir sukelia citokinų ir chemokinių išlaisvinimą. A23187 didina viduląstelinę Ca^{2+} koncentraciją, tiesiogiai palengvindamas Ca^{2+} pernešimą per plazminę membraną. Žmogaus imuninių ląstelių stimuliavimas A23187 ir PMA gali sukelti citokinų ir chemokinių kiekio prouždegiminius pokyčius, ir toks ląstelių stimuliavimas naudojamas uždegimo modeliu, o stimuliuotų ląstelių slopinimas vaistiniais preparatais gali apsaugoti nuo uždegiminių pažeidimų.

Sekoskaitos duomenų analizė parodė, kad gydymas DCA-VPA slopino sąveiką su citokinų receptoriais, citokinų aktyvumą, ląstelinį atsaką į chemokinus, atsaką į chemokinus, chemokinių sukeltą signalo perdavimo kelią (8 paveikslas).

DCA-VPA poveikis COVID-19 sergančių suaugusių pacientų patogenezės biologiniams mechanizms

Genų rinkinių/biologinių kelių praturtinimo taškinėje diagramoje (9 paveikslas) parodyta R Enrichplot v1.2 programiniu paketu atlikta DCA-VPA poveikio analizė sunkia COVID-19 forma sergančių vyrų ($n = 3$) T limfocitams. Įvesties duomenys gauti nuo statistiškai reikšmingai išreikštų genų sąrašo, gauto atlikus diferencialinę genų raiškos analizę. Šioje diagramoje kiekvienas biologinis kelias pavaizduotas y ašyje, o x ašyje vaizduojamas skirtingai išreikštų genų skaičiaus genų rinkinyje ir bendro genų skaičiaus tame genų rinkinyje santykis. Legendoje pažymėtos statistinio reikšmingumo vertės, atitinkamai pagal taškų monochrominės spalvos intensyvumą. Analizuoti COVID-19 pacientų T limfocitų tyrimų duomenys grupėse: 1) COVID-19 ligonių T limfocitų kontrolė ($n = 3$), 2) tų pačių kaip kontrolės COVID-19 ligonių T limfocitai, gydyti DCA-VPA ($n = 3$). Gydytų ląstelių duomenys palyginti su negydytų ląstelių. Ląstelės gydytos 24 valandas 2 mM VPA ir 5 mM DCA mišiniu. Nustatytas reikšmingas su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų rinkinių praturtėjimas šių biologinių patofiziologinių kelių: granulocitų chemotaksis, imuninis atsakas, imuninės sistemos procesai, granulocitų migracija, makrofagų chemotaksis, mieloidinių ląstelių migracija. Su uždegimu ir imuniniu atsaku susijusių genų rinkinių praturtinimo pasiskirstymas svyravo nuo -10 iki -0,1, o tai rodo, kad gydytų ląstelių grupėje proždegiminių veiksmų buvo reikšmingai mažiau, jie buvo slopinti ar gydymas padidino priešuždegiminių genų poveikį, padidėjus uždegimą slopinančių genų raiškai. Tyrimas parodė reikšmingą DCA-VPA poveikį slopinant uždegimą ir su juo susijusio imuninio atsako mechanizmus.

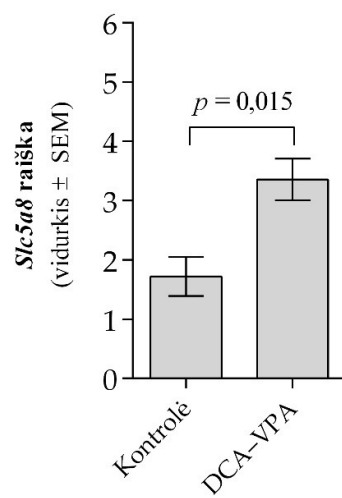
7, 8 ir 9 paveiksluose nurodyti keliai gauti genų rinkinių/biologinių kelių praturtinimo analizės metodu (Gene Set Enrichment Analysis; GSEA), naudojant Enrichplot v1.2 ir ClusterProfiler v4.8.2 R programinius paketus.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

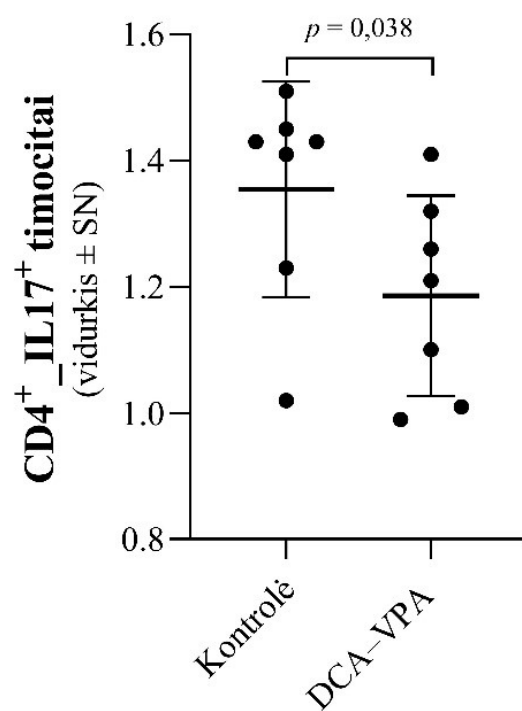
1. Farmacinis derinys, apimantis (a) natrio dichloroacetato (DCA) ir (b) valpro rūgšties (VPA) arba jos farmaciniu požiūriu priimtinos druskos veiksmingą kiekį, skirtas panaudoti virusinėms arba bakterinėms infekcijoms arba uždegiminėms ligoms gydyti.
2. Farmacinis derinys, skirtas panaudoti pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (a) dichloroacetato farmaciniu požiūriu priimtina druska yra natrio dichloroacetatas.
3. Farmacinis derinys, skirtas panaudoti pagal 1 punktą, besiskiriantis tuo, kad (b) valpro rūgšties farmaciniu požiūriu priimtina druska yra natrio valproatas arba magnio valproatas.
4. Farmacinis derinys, skirtas panaudoti pagal bet kurį iš 1–3 punktų, besiskiriantis tuo, kad minėtas derinys turi farmaciniu požiūriu priimtinių pagalbinių medžiagų.
5. Farmacinis derinys, skirtas panaudoti pagal bet kurį iš 1–4 punktų, besiskiriantis tuo, kad paruoštas preparatas yra bet kurios farmacinės formos, tokios kaip kapsulė, tabletė arba tirpalas.
6. Farmacinis derinys, skirtas panaudoti pagal bet kurį iš 1–4 punktų, besiskiriantis tuo, kad dichloroacetatas (DCA) ir (b) valpro rūgštis (VPA) arba jos farmaciniu požiūriu priimtina druska yra skiriami kaip sudėtinis preparatas arba skiriami vienu metu kaip atskiri vaistiniai preparatai.
7. Farmacinis derinys, skirtas panaudoti pagal bet kurį iš 1–6 punktų, besiskiriantis tuo, kad minėtos virusinės arba bakterinės infekcijos arba uždegiminė liga yra parinkti iš grupės, kurią sudaro: vidurių šiltinė ir paratifai, kitos salmonelių sukeltos infekcijos, šigeliozė, kitos bakterijų sukeltos žarnyno infekcijos, patogeninių *Escherichia coli* sukeltos infekcijos, *Clostridium difficile* sukeltas enterokolitas, amebiazė, tuberkuliozė, ne žarnyno jersinijozė, kokliušas,

meningokokinė infekcija, streptokokinis sepsis, kitas sepsis, legioneliozė, stafilokokų sukelta infekcija, Laimo liga, netipinės virusų sukeltos centrinės nervų sistemos infekcijos, moskitų platinamas virusinis encefalitas, erkių platinamas virusinis encefalitas, pūslelinės virusų (herpes simplex) sukeltos infekcijos, juostinė pūslelinė, tymai, ūminis hepatitas, ūminis hepatitas C, lėtinis virusinis hepatitas, žmogaus imunodeficito viruso (ŽIV) sukelta liga, citomegalo viruso sukelta liga, infekcinė mononukleozė, maliarija, leišmaniozė, afrikinė tripanosomozė, Čagaso liga, toksoplazmozė, gripas ir pneumonija, COVID liga, *Helicobacter pylori* infekcija, žmogaus papilomavirusinė infekcija, SARS, MERS infekcijos, gram-teigiamų bakterijų sukeltos infekcijos, gram-neigiamų bakterijų sukeltos infekcijos, uždegiminės žarnyno ligos.

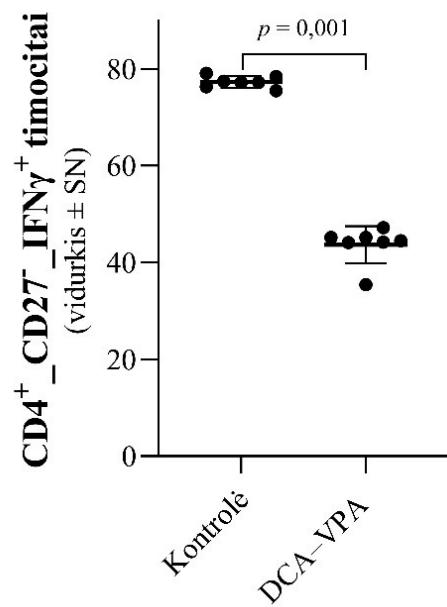
8. Farmacinis derinys, skirtas panaudoti pagal bet kurį iš 1–7 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas derinys skiriamas kaip papildomas gydymas kartu su žinoma infekcijos ar jos sukulto uždegimo specifine terapija.

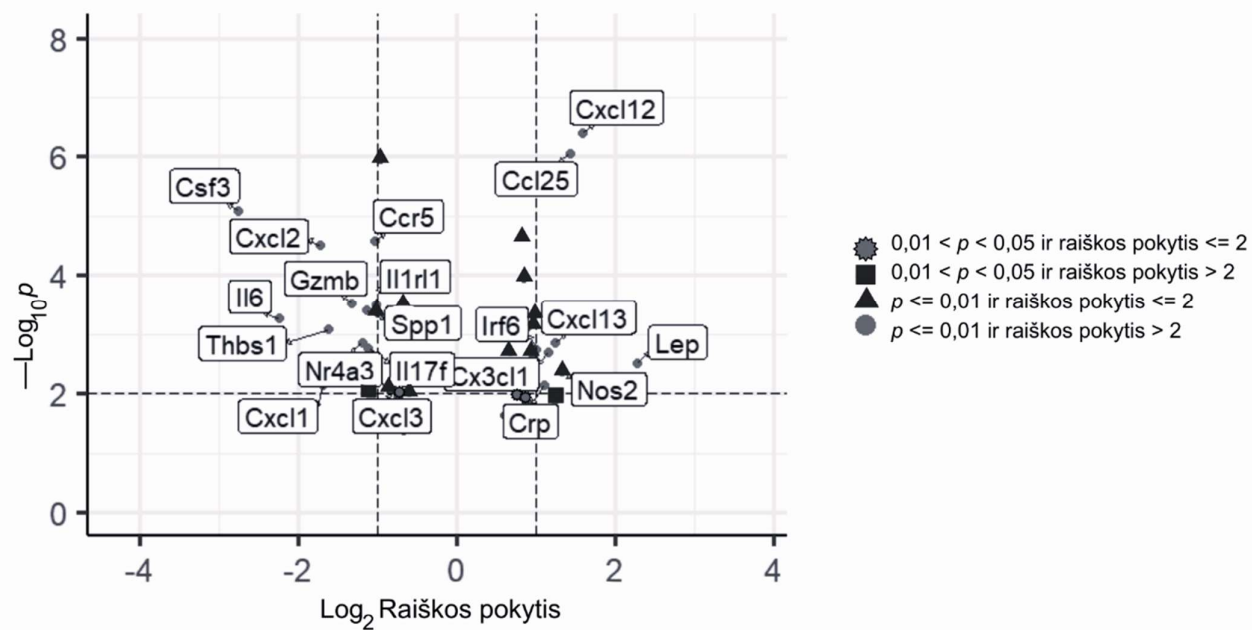


1 pav.



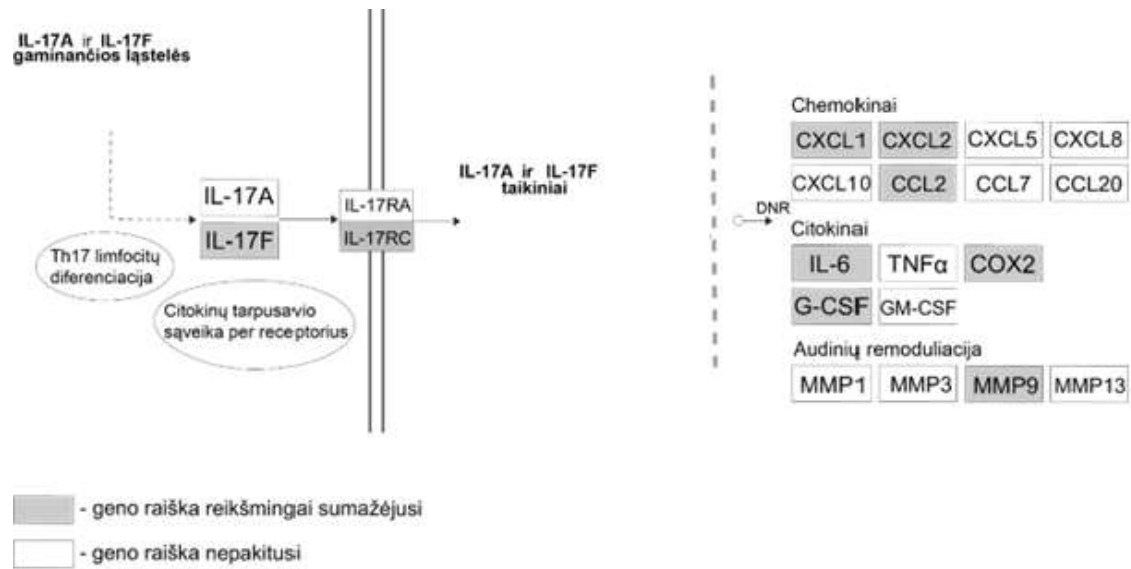
2 pav.

**3 pav.**

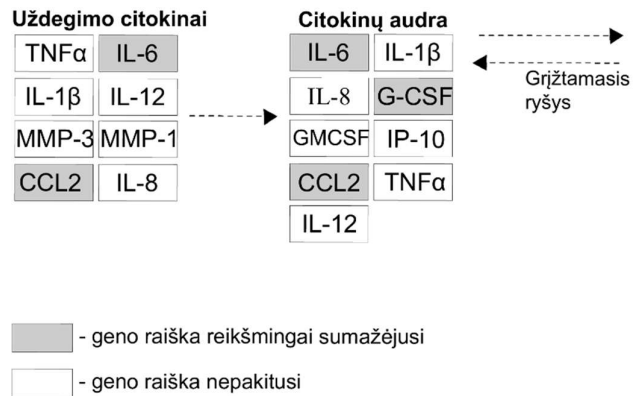


Viso = 63 kintamieji

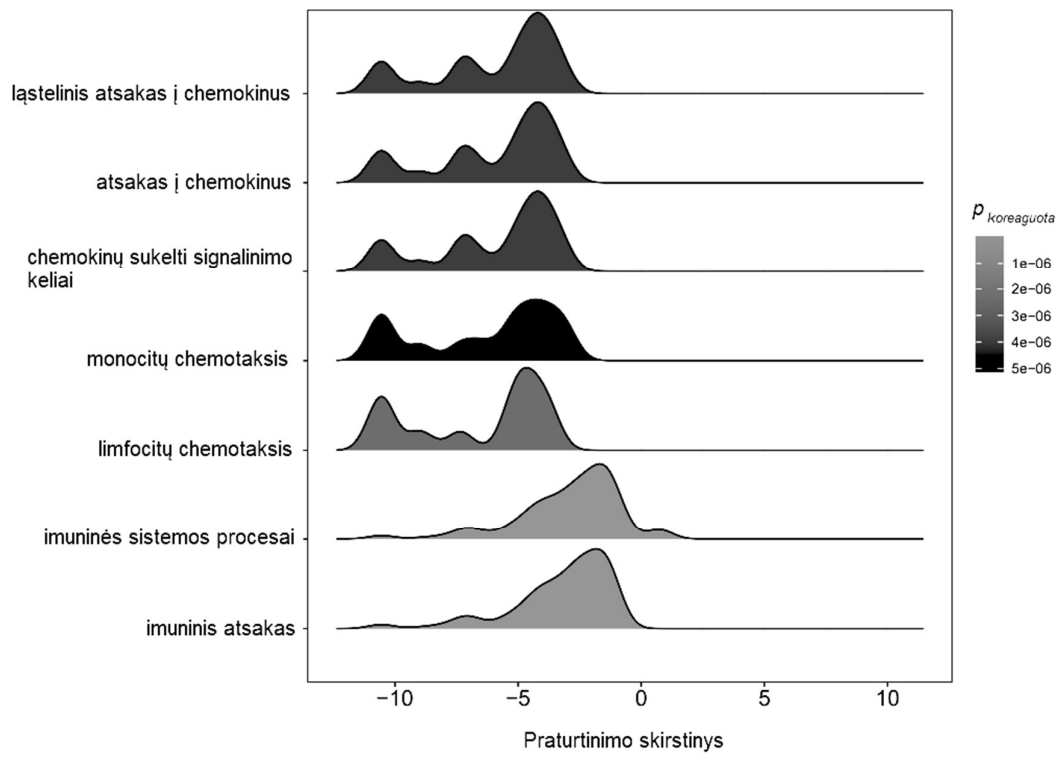
4 pav.



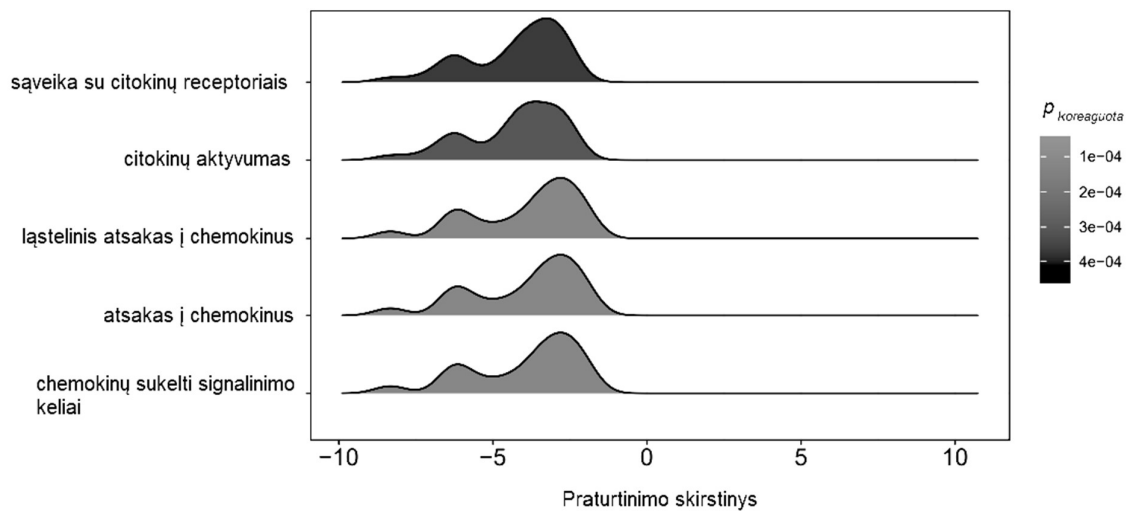
5 pav.



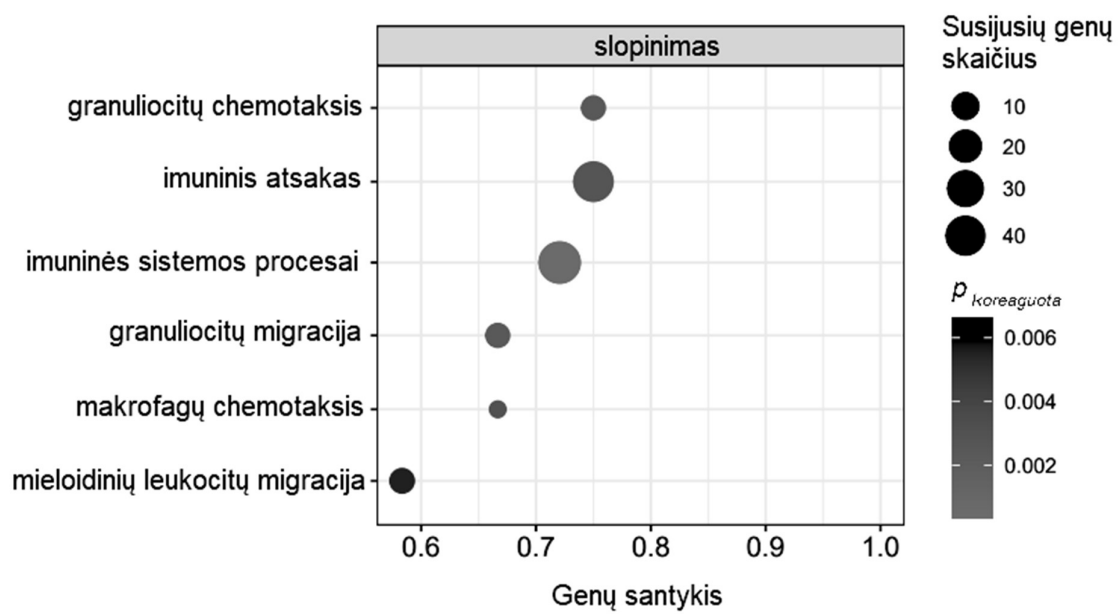
6 pav.



7 pav.



8 pav.



9 pav.