



RĪGAS
STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

JĀNIS KŪKA

**KARNITĪNA SISTĒMAS REGULĀCIJAS LOMA
KARDIOPROTEKCIJĀ**

KOPSAVILKUMS

PROMOCIJAS DARBS
farmācijas doktora grāda iegūšanai
Specialitāte – Farmācijas ķīmija

Rīga, 2011

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. pharm. **Maija Dambrova**

Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas
laboratorijas vadītāja

Dr. chem. **Renāte Medne**

Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas ķīmijas katedras vadītāja

Promocijas darbs veikts ar ESF projekta „Atbalsts doktorantiem studiju
programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa
universitātē” atbalstu.



Doktorantūras programmas eksperimentālā daļa veikta Latvijas
Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā.



Saturs

Pētījuma aktualitāte.....	4
Darba mērķis.....	5
Darba uzdevumi.....	5
Darba zinātniskā novitāte.....	5
1. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes.....	6
2. Materiāli un metodes.....	7
2.1. <i>In vitro</i> metodes.....	8
2.2. <i>Ex vivo</i> un <i>in vivo</i> metodes.....	9
3. Rezultāti.....	10
3.1. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā un koncentrāciju audos.....	10
3.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz enzīmu aktivitāti un audu un asins plazmas bioķīmiskajiem parametriem.....	13
3.3. Mildronāta ietekme uz KrAT.....	16
3.4. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu.....	18
3.5. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hemodinamikas rādītājiem <i>Wistar</i> žurkās.....	20
3.6. Mildronāta un mildronāta orotāta ietekme uz aritmiju attīstību.....	20
3.7. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz hipertensijas attīstību <i>Dahl</i> sāls-jutīgajās žurkās.....	22
4. Diskusija.....	26
4.1. Karnitīna koncentrācijas samazināšanas ietekme uz sirds funkcionālajiem rādītājiem un asins plazmas un audu bioķīmiskajiem parametriem.....	26
4.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu.....	30
4.3. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hipertensijas attīstību.....	31
5. Secinājumi.....	34
6. Literatūras saraksts.....	35
Pateicības.....	38

Pētījuma aktualitāte

Sirds-asinsvadu sistēmas saslimšanas ir izplatītākais nāves cēlonis ne tikai Latvijā, bet arī Eiropas Savienībā. Eiropā kopumā vērojama tendence, ka mirstība no sirds-asinsvadu sistēmas slimībām ir lielāka Austrum- un Viduseiropas valstīs, bet mazāka Rietum- un Ziemeļeiropas valstīs (Müller-Nordhorn et al., 2008). Tādēļ joprojām aktuāli ir pētījumi, kā uzlabot dzīvildzi un dzīves kvalitāti, profilaktiski novēršot un ārstējot šīs saslimšanas.

Muskuļu šūnas enerģijas iegūšanai izmanto gan taukskābes, gan ogļhidrātus. Pēc to uzņemšanas šūnās notiek specifiski katabolisma procesi, kuros veidojas šūnu enerģijas avots – adenoziņa trifosfāts. Normālos apstākļos šūna enerģiju iegūst galvenokārt taukskābju oksidācijas rezultātā. Tomēr skābekļa trūkuma gadījumā šūnai izdevīgāka izrādās glikozes oksidēšana nekā taukskābju izmantošana, jo šim procesam nepieciešams mazāks skābekļa daudzums (Beadle & Frenneaux, 2010). Karnitīns ir viens no faktoriem, kas nosaka garo virkņu taukskābju izmantošanas intensitāti, kā arī piedalās līdzsvara regulēšanā starp glikozes un taukskābju ieguldījumu šūnu enerģētiskajā metabolismā.

Kā zināms, ar karnitīna palīdzību šūnās caur mitohondriju membrānām notiek taukskābju transports ar sekojošu β -oksidāciju un enerģijas iegūšanu (Strijbis et al., 2010). Lai arī karnitīna fizioloģisko lomu muskuļu metabolismā procesos atklāja jau pirms 50 gadiem un pēdējā laikā to plaši lieto kā uztura bagātinātāju, tomēr karnitīna farmakoloģiskie efekti, tajā skaitā kardioprotektīvie, ir salīdzinoši maz izpētīti. Eksperimenti liecina, ka karnitīna koncentrācijas izmaiņām audos varētu būt divējāds efekts. Nedaudz samazinot karnitīna koncentrāciju sirdī, tās šūnas vieglāk adaptējas išēmijas apstākļiem un pārejošam skābekļa badam (Dambrova et al., 2002), kamēr ievērojama karnitīna koncentrācijas samazināšanās varētu izsaukt muskuļu distrofiju (Georges et al., 2000). Tāpēc ļoti nozīmīgi būtu noskaidrot karnitīna regulācijas farmakoloģiskās un fizioloģiskās sekas, lai labāk varētu izprast tā izmantošanas iespējas klīnikā sirds-asinsvadu saslimšanu ārstēšanas jomā.

Pamatojoties uz atziņām zinātniskajā literatūrā, ir formulēta promocijas darba **hipotēze**: mildronāta kardioprotektīvā efekta molekulārās darbības mehānisms pamatojas uz karnitīna koncentrācijas samazināšanu un taukskābju metabolismā kavēšanu.

Darba mērķis

Pētīt ar karnitīnu saistītās sirds šūnu enerģijas metabolisma signālsistēmas regulācijas iespējas kardioprotektīvā efekta sasniegšanai.

Darba uzdevumi

- Pētīt ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz sirds un aknu funkcionalitāti un lipīdu profila izmaiņām audos un plazmā.
- Pētīt karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekmi uz taukskābju metabolismā iesaistīto enzīmu karnitīna palmitoiltransferāzes I (KPT I) un karnitīna acetiltransferāzes (KrAT) aktivitāti un glikozes metabolismā iesaistītā piruvātdehidrogenāzes kompleksa aktivitāti sirds mitohondrijos.
- Raksturot mildronāta mijiedarbību ar karnitīna acetiltransferāzi *in vitro* un ietekmi uz enzīma aktivitāti *in vivo*.
- Pētīt mildronāta kardioprotektīvā efekta saistību ar karnitīna koncentrācijas samazinājumu žurku izolētās sirds infarkta modelī un angioprotektīvās darbības saistību ar karnitīna un gamma-butirobetaīna koncentrāciju izmaiņām *Dahl* sāls-jūtīgo žurku hipertensijas modelī.

Darba zinātniskā novitāte

Darba ietvaros pētīta karnitīna un tā prekursora gamma-butirobetaīna koncentrāciju izmaiņu nozīme mildronāta kardioprotektīvā un angioprotektīvā efekta sasniegšanai:

- Pierādīts, ka mildronāta ilgstošas 3 mēnešu lietošanas ietekmē samazinātā karnitīna koncentrācija neizraisa sirds darbības un aknu funkciju traucējumus, kā arī neizmaina lipīdu profilu; iegūtie rezultāti apliecina mildronāta ilgstošas lietošanas nekaitīgumu.
- Parādīts, ka ilgstošs karnitīna koncentrācijas samazinājums izsauc kompensatoru, no izsauktā samazinājuma atkarīgu karnitīna palmitoiltransferāzes I aktivitātes palielināšanos.
- Pirmo reizi raksturota mildronāta saistīšanās karnitīna acetiltransferāzes aktīvajā centrā; salīdzināta mildronāta un karnitīna saistīšanās ar enzīmu.
- Parādīta mildronāta kardioprotektīvā efekta atkarība no karnitīna koncentrācijas samazinājuma sirds audos un angioprotektīvās darbības saistība ar karnitīna un gamma-butirobetaīna koncentrāciju izmaiņām *Dahl* sāls-jūtīgo žurku hipertensijas modelī.

1. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes

Promocijas darbs ietver sekojošas publikācijas recenzējamās starptautiskajos izdevumos:

1. Jaudzems K., **Kuka J.**, Gutsaits A., Zinovjevs K., Kalvinsh I., Liepinsh E., Liepinš E., Dambrova M. Inhibition of carnitine acetyltransferase by mildronate, a regulator of energy metabolism. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2009; 24(6):1269-75.
2. Liepinsh E., **Kuka J.**, Svalbe B., Vilskersts R., Skapare E., Cirule H., Pugovics O., Kalvinsh I., Dambrova M. Effects of long-term mildronate treatment on cardiac and liver functions in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009; 105(6):387-94.
3. Vilskersts R., Liepinsh E., **Kuka J.**, Cirule H., Veveris M., Kalvinsh I., Dambrova M. Myocardial infarct size-limiting and anti-arrhythmic effects of mildronate orotate in the rat heart. *Cardiovasc Drug Ther*, 2009; 23(4):281-8.
4. Vilskersts R., **Kuka J.**, Svalbe B., Cirule H., Liepinsh E., Grinberga S., Kalvinsh I., Dambrova M. Administration of L-carnitine and mildronate improves endothelial function and decreases mortality in hypertensive Dahl rats. Pieņemts publicēšanai (*Pharmacological Reports*, 2011; 63(3)).
5. **Kuka J.**, Vilskersts R., Cirule H., Makrečka M., Pugovics O., Kalvinsh I., Dambrova M., Liepinš E. Treatment with L-carnitine diminishes the cardioprotective effect of mildronate in an isolated rat heart infarction model. Iesniegts manuskripts žurnālā *International Journal of Cardiology*.

Publikācijas vietējos izdevumos:

1. **Kuka J.**, Škapare E., Makrečka M., Medne R., Dambrova M. Polinepiesātinātās taukskābes organisma funkcionēšanā. *Latvijas ārsts*, 2010; 358(3), 54.-58. lpp.
2. Dambrova M., Liepinš E., **Kuka J.**, Medne R. Karnitīna 100 gadi. No atklāšanas līdz klīniskajiem pielietojumiem. *Doctus*, 2007; 10, 4.-8. lpp.

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās starptautiskās konferencēs:

1. **Kuka J.**, Vilskersts R., Vavers E., Liepinsh E., Dambrova M. Effects of regulation of L-carnitine concentration in experimental heart infarction model, *Frontiers in CardioVascular Biology*, Berlin, Germany, July 16-19, 2010. Abstracts, S134.
2. Vilskersts R., **Kuka J.**, Svalbe B., Liepinsh E., Dambrova M. Protective effects of L-carnitine and mildronate in salt-induced hypertension, *Frontiers in CardioVascular Biology*, Berlin, Germany, July 16-19, 2010. Abstracts, S54.
3. **Kuka J.**, Skapare E., Liepinsh E., Dambrova M. Effects of L-carnitine availability on carnitine palmitoyltransferase I activity in vivo,

- MiPsummer School on Mitochondrial Physiology 2010*, Druskininkai, Lithuania, June 10-16, **2010**. Abstracts P2-05, P.9.
4. **Kuka J.**, Zinovjevs K., Skapare E., Liepinsh E. Characterization of mildronate as an inhibitor of carnitine acetyltransferase. *FEBS 2009 Congress: Life's Molecular Interactions*, Prague, Czech Republic, July 4-9, **2009**. Abstracts, P.322.
 5. Vilskersts R., **Kuka J.**, Svalbe B., Liepinsh E., Dambrova M. Mildronate orotate: its cardioprotective and antiarrhythmic effects and mechanism of action. *FEBS 2009 Congress: Life's Molecular Interactions*, Prague, Czech Republic, July 4-9, **2009**. Abstracts, P.351.
 6. Vilskersts R., **Kuka J.**, Liepinsh E., Dambrova M. Effects of mildronate on arrhythmias induced by coronary artery ligation, calcium chloride and aconitine. *Baltic Summer School 2008: Basic and clinical aspects of cardiac arrhythmias*, Copenhagen, Denmark, August 17 – September 6, **2008**.
 7. **Kuka J.**, Skapare E., Liepinsh E., Dambrova M. Interactions of cardioprotective drug mildronate with mitochondrial carnitine acyltransferases, *New Frontiers in Cardiovascular Research, 8th Meeting of France - New EU Members/16th Symposium of Jagiellonian Medical Research Centre*, Krakow, Poland, June 5-7. Abstracts, **2008**, P.88.

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās Latvijas mēroga konferencēs:

1. Vāvers E., **Kūka J.**, Karnitīna-palmitoiltransferāzes I aktivitātes regulācija, *RSU 59. Medicīnas nozares studentu zinātniskā konference*. Bāzes priekšmetu sekcija, Rīga, Latvija, 17. marts, **2010**. Tēzes, 12.-13.lpp.
2. **Kūka J.**, Škapare E., Liepiņš E., Medne R., Dambrova M. Mildronāta ietekme uz karnitīna aciltransferāzēm. *RSU 2008. gada zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 13.-14. marts, **2008**. Tēzes, lpp. 30.

2. Materiāli un metodes

Eksperimentiem izmantoja pieaugušus *Wistar* līnijas (RSU Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Latvija) un *Dahl* sāls-jutīgās (DS) līnijas (*Charles River*, Vācija) žurku tēviņus. Visas eksperimentālās procedūras veica saskaņā ar Eiropas Komisijas direktīvas 86/609/EEC vadlīnijām un saskaņoja ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi. Lai izvērtētu ilgstoši samazinātas karnitīna koncentrācijas efektus, mildronātu 100, 200 un 400 mg/kg vadīja perorāli *Wistar* žurkām. Kardioprotektīvā efekta izvērtēšanai karnitīnu 100 mg/kg, mildronātu 100 mg/kg un abu vielu

kombināciju 100 un 100 mg/kg vadīja perorāli *Wistar* žurkām. Antiaritmiskā efekta izvērtēšanai mildronātu 100 mg/kg, orotskābi 100 mg/kg un mildronāta orotātu 200 mg/kg *Wistar* žurkas saņēma kopā ar dzeramo ūdeni. *Dahl* sāls-jutīgās žurkas karnitīnu 100 mg/kg, mildronātu 100 mg/kg un abu vielu kombināciju 100 un 100 mg/kg saņēma kopā ar dzeramo ūdeni.

2.1. *In vitro* metodes

2.1.1. Karnitīna, GBB un mildronāta noteikšana audos un plazmā

Mildronāta, GBB un karnitīna koncentrācijas noteikšanai asins plazmā un sirds un aknu audos izmantoja UPLC/MS/MS analīzi (Dambrova et al., 2008).

2.1.2. Bioķīmisko parametru mērījumi

Brīvo taukskābju, triglicerīdu, glikozes, ketonvielu, LDL-C, HDL-C, laktāta koncentrācijas, ALAT, ASAT, ALP aktivitātes un kopējā bilirubīna daudzuma mērījumiem izmantoja *Wako* un *Instrumentation Laboratory* (IL) reaģentu komplektus atbilstoši ražotāja instrukcijām.

KrAT aktivitāti noteica gan izolētos *Wistar* žurku sirds mitohondrijos, gan izmantojot attīrītu baložu krūšu muskuļu enzīmu (*Sigma*, ASV). Mitohondrijus izolēja pēc literatūrā aprakstītas metodes (Wilcke et al., 1995). Reakcijas norises apstākļi: DTNB (0,675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2,5 mM), acetil-koenzīms A (0,1 mM), karnitīns (0,0625 līdz 0,5 mM). Mildronātu (10 μM līdz 1 mM) izmantoja, tikai pārbaudot tā mijiedarbību ar attīrīto KrAT. KPT I aktivitāti noteica gan aknu un sirds audu homogenātā, gan arī izolētos mitohondrijos. Reakcijas norises apstākļi: DTNB (0,675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2,5 mM), palmitoil-koenzīms A (0,05 mM) un atbilstošās karnitīna koncentrācijas. Elpošanas mērījumus veica saskaņā ar literatūrā aprakstītu metodi (Baliutyte et al., 2010). Elpošanas buferšķīdums saturēja 40 μM palmitoil-koenzīma A vai 36 μM palmitoil-karnitīna vai 5 mM piruvāta un 5 mM malāta.

2.1.3. Molekulārās dinamikas skaitļošana mildronāta un KrAT mijiedarbības raksturošanai

Molekulārās dinamikas skaitļošanai par mildronāta saistīšanos KrAT aktīvajā centrā izmantoja MOE2007.09 programmnodrošinājumu (*Chemical Computing Group, Inc.*, Kanāda).

2.2. *Ex vivo* un *in vivo* metodes

2.2.1. Hemodinamikas parametri *in vivo*

Sistolisko asinsspiedienu un sirds ritmu DS žurkām mērīja eksperimenta sākumā, kā arī pēc 4 un 8 nedēļām kopš terapijas uzsākšanas, izmantojot žurku neinvazīvā asinsspiediena mērītāju MLT125, kas savienots ar PowerLab 8/30 datu reģistrācijas sistēmu no *ADInstruments*.

2.2.2. Langendorffa izolētās žurku sirds infarkta modelis

Infarktu eksperimentu veikšanai izmantoja literatūrā aprakstīto metodi (Liepinsh et al., 2006). No iegūtajiem rezultātiem aprēķināja nekrozes lielumu pret kopējo riska zonas lielumu. Kontroles vērtības pieņēma 100 % un pārējos rezultātus attiecīgi pārrēķināja.

2.2.3. Eksperimentālie žurku aritmiju modeļi

Lai novērtētu mildronāta ietekmi uz išēmijas-reperfūzijas izraisītajām sirds aritmijām, izmantoja *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg i/p). Pēc traheotomijas dzīvniekus ventilēja (15 ml/kg, 55 reizes minūtē) ar mazo grauzēju elpināmo aparātu (7025, *Ugo Basile*). Žurkām atvēra krūškurvi un ar 5/0 Surgipro II diegu cauršuja zem sirds kreisās lejupejošās koronārās artērijas. Izmantojot Chart 5.5 programmu, reģistrēja EKG no otrā standartnovadījuma. Pēc 20 minūšu adaptācijas kreiso lejupejošo koronāro artēriju uz 10 minūtēm okludēja, kam sekoja 30 minūšu reperfūzija. Lai novērtētu mildronāta ietekmi uz kalcija hlorīda izraisītajām aritmijām, izmantoja *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg i/p). Lai ievadītu 10 % kalcija hlorīda šķīdumu, kanulēja kreiso femorālo vēnu. Kalcija hlorīda šķīdumu ievadīja aritmogēnā devā (180 mg/kg) ar ātrumu 0,01 ml/s, un, izmantojot Chart 5.5 programmu, reģistrēja EKG no otrā standartnovadījuma gan ievadīšanas laikā, gan 10 minūtes pēc tam. Tika novērtēta mirstība, aritmiju sākšanās laiks un laiks līdz atgriežas normāls sirds ritms, kreisā kambara tahikardiju un fibrilāciju skaita biežums un ilgums.

2.2.4. Sāls inducētās hipertensijas modelis *Dahl* žurkās

DS žurku endoteliālo funkciju noteica izolētās aortās, izmantojot izolēto orgānu vanniņu (Bartuš et al., 2008). DS žurku sirds anatomijas un funkcijas novērtēšanai izmantoja iE33 ultrasonogrāfu (*Philips Ultrasound, Inc.*). Žurkas anestezēja ar ketamīna ksilazīna maisījumu (50 un 10 mg/kg i/p) un sirds kreisā kambara mērījumus veica M-režīmā.

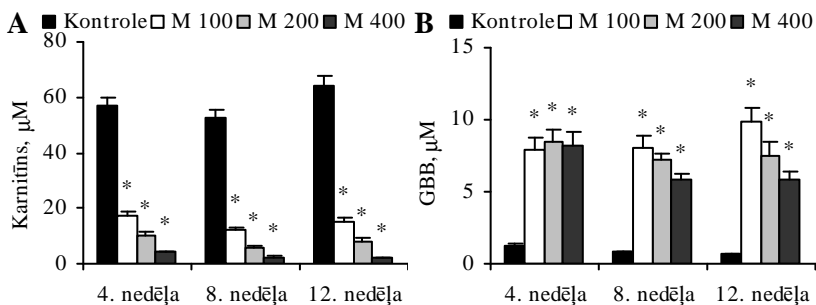
2.2.5. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datu apkopošanu un sistematizāciju veica ar vispārpieņemtām statistikas metodēm, izmantojot programmas *Microsoft Excel 2003* un *GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc.)*. Rezultātus uzskatīja par ticamiem, ja $p < 0,05$. Grupu salīdzināšanai lietoja Manna-Vitnija vai Stjūdenta t-testu, vai atbilstošo dispersijas analīzes metodi ar sekojošu pēctestu (Bonferoni, Tukija tests). Dzīvildzes līknes DS žurkām ieguva ar Kaplana-Meiera metodi. Aritmiju biežuma starpību starp grupām analizēja, izmantojot hī kvadrāta (χ^2) testu.

3. Rezultāti

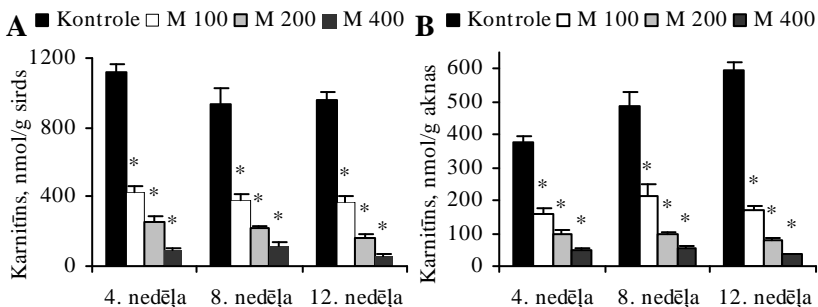
3.1. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā un audos

Mildronāta 4, 8 un 12 nedēļu perorāla lietošana, ja devas ir 100 (M 100), 200 (M 200) un 400 mg/kg (M 400), atbilstoši samazināja karnitīna koncentrāciju *Wistar* žurku asins plazmā. Pēc 4 nedēļu mildronāta lietošanas karnitīna koncentrācija samazinājās attiecīgi 3, 5 un 13 reizes. Tikai mildronāta 400 mg/kg devas ievadīšana samazināja karnitīna koncentrāciju atkarībā no lietošanas ilguma (1.A attēls); tā pēc 12 nedēļām karnitīna koncentrācija samazinājās 35 reizes. Mildronāts GBB koncentrāciju palielināja pat par 14 reizēm, tomēr šīs izmaiņas neietekmēja ne terapijas ilgums, ne deva (1.B attēls).



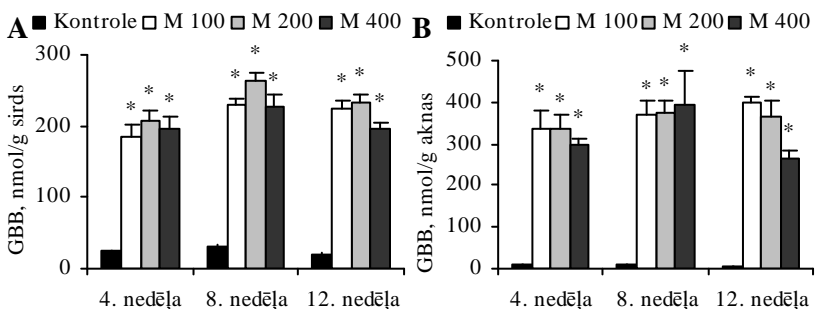
1. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz karnitīna (A) un GBB (B) koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku asins plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8 – 10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Wistar žurku sirds un aknu audos ilgstoša mildronāta lietošana karnitīna koncentrāciju samazināja atkarībā no devas lieluma, bet lietošanas ilguma ietekmi uz karnitīna koncentrācijas samazināšanos novēroja, ja mildronāta deva bija 200 mg/kg (2. attēls).



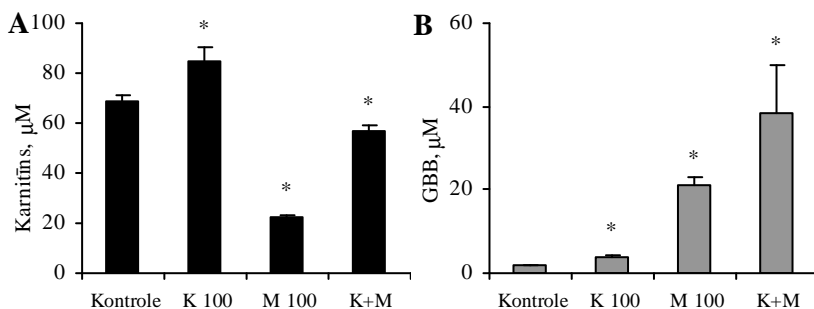
2. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz karnitīna koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds (A) un aknu (B) audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8 – 10 dzīvniekos ± SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Sirds audos GBB koncentrācija palielinājās līdz 10 reizēm (3.A attēls), bet aknu audos pat līdz 66 reizēm (3.B attēls), tomēr līdzīgi kā asins plazmā arī šis izmaiņas neietekmēja ne terapijas ilgums, ne deva.



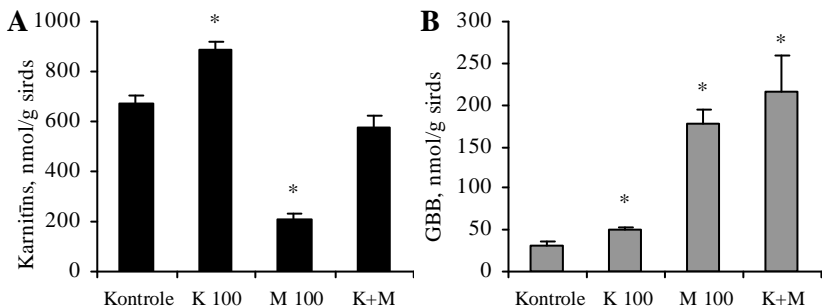
3. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz GBB koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds (A) un aknu (B) audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8-10 dzīvniekos ± SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Mildronāta (100 mg/kg, M 100), karnitīna (100 mg/kg, K 100) un to kombinācijas (100+100 mg/kg, K+M) 14 dienu perorālas lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB plazmas koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurkām parādīta 4. attēlā. Karnitīna lietošana palielināja tā koncentrāciju asins plazmā par 24 %, salīdzinot ar kontroli, bet mildronāta lietošana samazināja karnitīna koncentrāciju 3 reizes. Karnitīna vienlaicīga lietošana kopā ar mildronātu samazināja karnitīna koncentrāciju asins plazmā par 18 % (4.A attēls). Karnitīna lietošana GBB koncentrāciju asins plazmā palielināja tikai 2 reizes, bet mildronāts un abu vielu kombinācija attiecīgi 10 un 20 reizes (4.B attēls).



4. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz karnitīna (A) un GBB (B) koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku asins plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdena t-tests, $p < 0,05$).

Sirds audos, līdzīgi kā asins plazmā, karnitīna lietošana tā koncentrāciju palielināja par 31 %. Mildronāta lietošana karnitīna koncentrāciju sirdī pazemināja tieši tāpat kā plazmā, 3 reizes, savukārt karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana karnitīna koncentrāciju neietekmēja (5.A attēls). Karnitīna lietošana GBB koncentrāciju sirds audos palielināja 2 reizes, bet mildronāts un abu vielu kombinācija palielināja attiecīgi 6 un 7 reizes (5.B attēls).

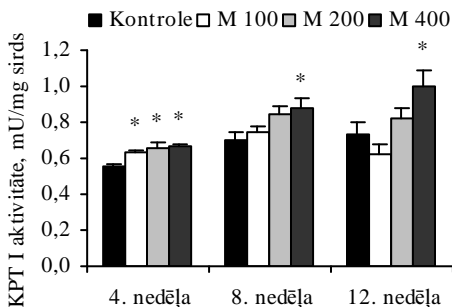


5. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz karnitīna (A) un GBB (B) koncentrācijas izmaiņām Wistar žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).

3.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz enzīmu aktivitāti un asu plazmas bioķīmiskajiem parametriem

3.2.1. Ietekme uz KPT I aktivitāti

6. attēlā parādīta ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz KPT I aktivitāti Wistar žurku sirds audos.



6. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz KPT I aktivitātes izmaiņām Wistar žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Enzīma aktivitāti noteica audu homogenātos pēc mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas 4, 8 un 12 nedēļu perorālas

lietošanas. Sirds audos bazālā KPT I aktivitāte pēc 4 nedēļu mildronāta lietošanas palielinājās pat par 21 %, salīdzinot ar kontroles grupu. Pēc 8 un 12 nedēļu mildronāta lietošanas, KPT I aktivitāte ticami palielinājās tikai, ja ievadīta mildronāta lielākā deva, attiecīgi par 25 % un 35 %. Aknu audu homogenātos statistiski ticamas KPT I aktivitātes izmaiņas pēc ilgstošas mildronāta lietošanas nenovēroja.

3.2.2. Ietekme uz mitohondriju elpošanas aktivitāti

Elpošanas aktivitāti *Wistar* žurku izolētos sirds mitohondrijos noteica pēc mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 14 dienu perorālas lietošanas, kā substrātus izmantojot palmitoil-koenzīmu A, palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu. Mitohondriju elpošanas mērījumu rezultāti parādīti 1. tabulā. Mildronāta lietošana samazināja mitohondriju elpošanu ar palmitoil-koenzīmu A, bet praktiski neietekmēja elpošanu ar palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu. Mildronāta un karnitīna kombinācijas lietošana stimulēja mitohondriju elpošanu ar palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu.

1. tabula

Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz *Wistar* žurku izolētu sirds mitohondriju skābekļa patēriņu, tiem oksidējot dažādus enerģijas substrātus

Substrāts	Kontrole	K 100	M 100	K+M
	O ₂ patēriņš, nmol/min/mg proteīna			
40 μM palmitoil-koenzīms	36.9±3.8	41.0±4.9	26.8±0.8*	36.8±1.4
36 μM palmitoil-karnitīns	16.4±1.2	21.4±2.8	19.2±0.9	21.3±1.2*
5 mM piruvāts/5 mM malāts	41.3±2.7	44.7±6.0	42.6±4.1	52.4±2.4*

*Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos ± SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t-tests, p<0,05).*

3.2.3. Ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem

Ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem *Wistar* žurku asins plazmā pēc mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas 4, 8 un 12 nedēļu perorālas lietošanas parādīta 2. tabulā.

2. tabula

Karnitīna koncentrācijas samazināšanās ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem *Wistar* žurku asins plazmā

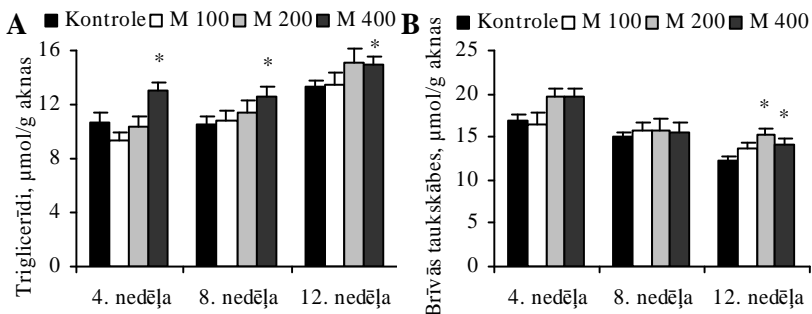
	Kontrole	M 100	M 200	M 400
4. nedēļa				
ASAT, U/l	49.0±3.8	46.5±6.2	48.2±5.8	43.1±4.4
ALAT, U/l	20.6±1.6	19.5±0.6	19.4±1.7	19.9±1.0
ALP, U/l	33.5±3.2	29.8±3.2	34.0±2.9	35.7±3.1
Kop. bilirubīns, mg/dl	0.39±0.17	0.27±0.09	0.17±0.02	0.29±0.05
8. nedēļa				
ASAT, U/l	39.7±3.2	38.2±3.9	41.7±5.1	37.3±3.3
ALAT, U/l	17.2±2.1	17.1±1.8	18.3±1.5	17.2±1.1
ALP, U/l	16.7±1.5	21.3±1.0*	18.9±1.1	17.5±2.1
Kop. bilirubīns, mg/dl	0.31±0.04	0.33±0.05	0.30±0.04	0.30±0.03
12. nedēļa				
ASAT, U/l	39.9±1.0	42.5±1.8	36.6±2.1	44.4±1.1*
ALAT, U/l	15.8±1.1	17.8±1.4	15.8±0.9	19.0±1.8
ALP, U/l	18.8±0.5	20.2±1.2	21.6±1.6	23.0±1.9*
Kop. bilirubīns, mg/dl	0.23±0.04	0.20±0.03	0.24±0.02	0.19±0.02

*Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8-10 dzīvniekos ± SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).*

Mildronāta lietošana neietekmēja kopējā bilirubīna daudzumu un ALAT aktivitāti. ASAT un sārmainās fosfatāzes (ALP) aktivitāte minimāli palielinājās tikai pēc 12 nedēļām, lietojot mildronāta devu 400 mg/kg. ALP aktivitāte minimāli palielinājās arī pēc 8 nedēļām, lietojot mildronāta devu 100 mg/kg.

3.2.4. Ietekme uz lipīdu profilu aknu audos

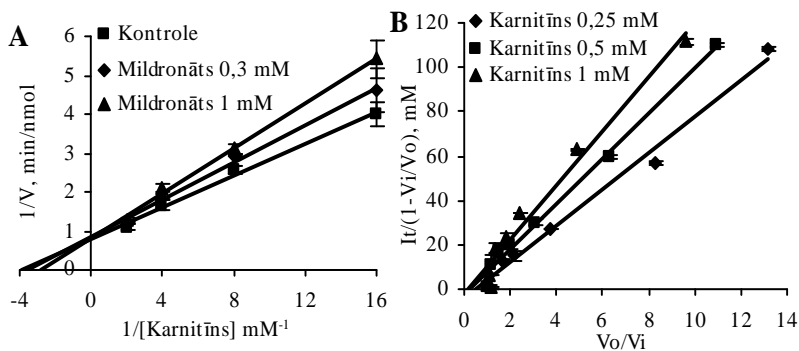
Ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz triglicerīdu un brīvo taukskābju koncentrāciju *Wistar* žurku aknu audos parādīta 7. attēlā. Triglicerīdu koncentrācija aknu audos ticami palielinājās attiecīgi par 21 %, 20 % un 12 % pēc 4, 8 un 12 nedēļām tikai tām žurkām, kas saņēma lielāko mildronāta devu 400 mg/kg (7.A attēls). Savukārt taukskābju koncentrācija aknu audos ticami palielinājās pēc 12 nedēļām tikai tām žurkām, kas saņēma mildronāta devas 200 un 400 mg/kg (7.B attēls).



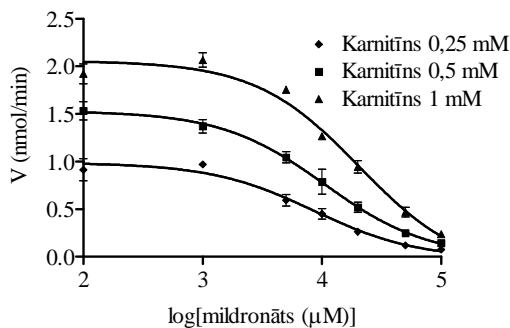
7. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz triglicerīdu (A) un brīvo taukskābju (B) koncentrāciju Wistar žurku aknu audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8-10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

3.3. Mildronāta ietekme uz KrAT

Mildronāta mijiedarbību ar KrAT *in vitro* noteica, izmantojot attīrītu enzīmu (*Columba sp.*). Lai gan mildronāts konkurējoši samazina enzīma aktivitāti (8. attēls), tomēr ir vājš inhibitors (9. attēls), jo tā K_i vērtība saistībai ar KrAT karnīfīna klātbūtnē ir $5,2 \pm 0,6$ mM.

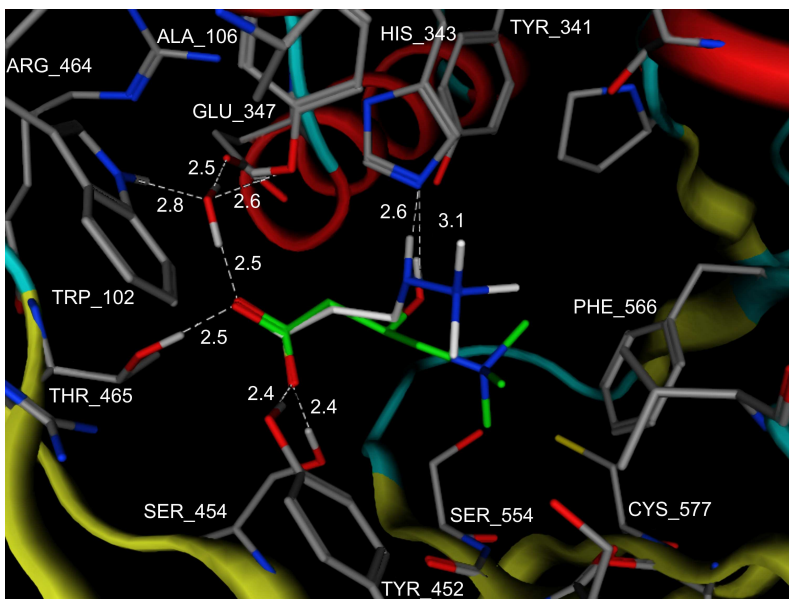


8. attēls. Linevēvera-Burka (A) un Hendersona (B) kinētikas shēmas mildronāta mijiedarbības ar KrAT raksturošanai. Katrs punkts ir vidējais no 3 mērījumiem \pm SEM. I_i -inhibitora koncentrācija; V_o -reakcijas ātrums bez inhibitora; V_i -reakcijas ātrums inhibitora klātienē.



9. attēls. *KrAT aktivitāte atkarībā no mildronāta koncentrācijas, izmantojot 3 dažādas karnitīna koncentrācijas. Katrs punkts ir vidējais no 3 mērījumiem ± SEM.*

Lai raksturotu mildronāta saistību ar KrAT molekulu, veica molekulārās dinamikas skaitļošanu. Molekulārās dinamikas skaitļošanas rezultāti parādīti 10. attēlā. Gandrīz identisks ir karnitīna un mildronāta karboksilgrupas un α -CH₂ grupas novietojums; savukārt KrAT katalītiskais His-343 veido ūdeņražsaites ar karnitīna hidroksilgrupu, bet mildronāta gadījumā ar NH grupu. Šīs atšķirīgās saistības ar His-343 rezultātā, būtiski atšķiras trimetilamonija grupas novietojums; ja karnitīna gadījumā trimetilamonija grupa ir iegremdēta KrAT aktīvā centra hidrofobajā kabatā, tad mildronāta gadījumā tā ir vērsta prom no proteīna virsmas.

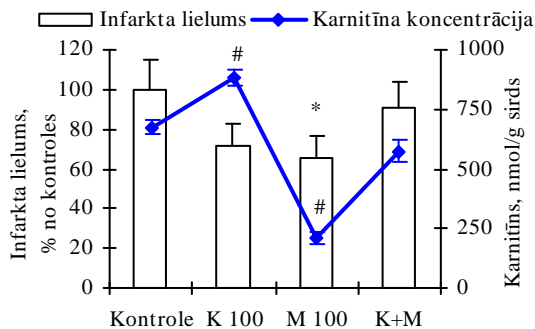


10. attēls. Modelis karnitīna un mildronāta saistībai ar KrAT. Karnitīna C atomi attēloti zaļā, bet mildronāta C atomi gaiši pelēkā krāsā. Attēloti tikai tie H atomi, kas piedalās ūdeņraža saišu veidošanā. Ūdeņraža saites attēlotas ar rausītu balto līniju. Attēls iegūts ar MOE2007.09.

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 14 dienu perorālas lietošanas izraisītās karnitīna koncentrācijas izmaiņas sirds audos, kā arī mildronāta klātbūtne neietekmēja KrAT aktivitāti *in vivo*.

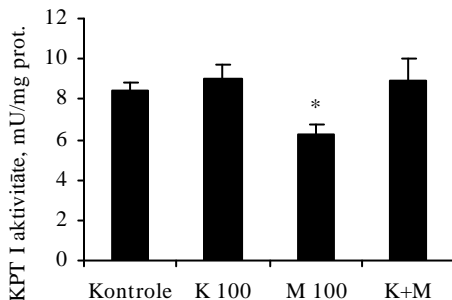
3.4. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 14 dienu perorālas lietošanas ietekme uz infarkta lielumu un atbilstošā karnitīna koncentrācija *Wistar* žurku sirds audos parādīta 11. attēlā. Lai gan karnitīna lietošana infarkta lielumu samazināja par 28 %, tomēr šis efekts nebija statistiski ticams. Mildronāta lietošana ievērojami samazināja karnitīna koncentrāciju sirds audos, kā arī statistiski ticami par 34 % samazināja infarkta lielumu, salīdzinot ar kontroles grupu. Mildronāta un karnitīna kombinācijas lietošana praktiski neietekmēja karnitīna koncentrāciju sirds audos, kā arī būtiski neietekmēja infarkta lielumu.



11. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz infarkta lielumu Wistar žurku sirdī. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. *, # statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta *t*-tests, $p < 0,05$).

12. attēlā parādīta karnitīna koncentrācijas izmaiņu (5.A attēls) ietekme uz KPT I aktivitāti sirds mitohondrijos pēc mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu perorālas lietošanas. Pēc mildronāta lietošanas KPT I aktivitāte samazinājās par 26 %.



12. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz KPT I aktivitāti Wistar žurku sirds mitohondrijos. Aktivitātes noteikšanai lietotās karnitīna koncentrācijas: 700 μ M kontroles grupā, 900 μ M K 100 grupā, 200 μ M M 100 grupā un 600 μ M K+M grupā (5.A attēls). Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 5 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta *t*-tests, $p < 0,05$).

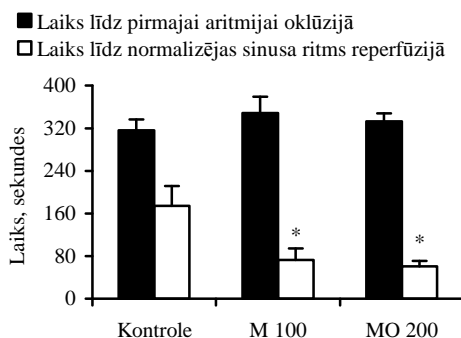
3.5. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hemodinamikas rādītājiem Wistar žurkās

Mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) 4, 8 un 12 nedēļu perorālas lietošanas rezultātā samazinātā karnitīna koncentrācija sirds audos neietekmēja hemodinamikas rādītājus (sirds ritmu, koronāro plūsmu, LVDP, sirds kontraktilitāti un relaksācijas spēju, kā arī sirds darbu) izolētās sirdīs.

3.6. Mildronāta un mildronāta orotāta ietekme uz aritmiju attīstību

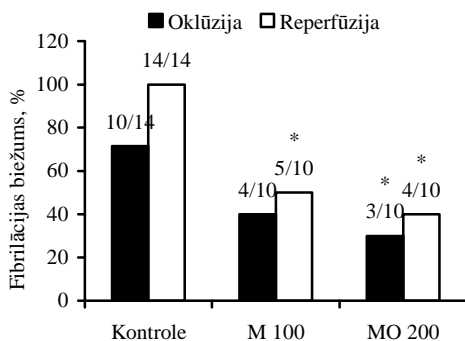
3.6.1. Ietekme uz išēmijas-reperfūzijas izraisītajām aritmijām

13. attēlā parādīta mildronāta (100 mg/kg) un mildronāta orotāta (200 mg/kg) ietekme uz laiku, kad sākas aritmijas oklūzijā un reperfūzijā. Visās grupās pirmās aritmijas parādījās apmēram 320 sekundes pēc artērijas oklūzijas, savukārt reperfūzijā mildronāta un mildronāta orotāta lietošana būtiski saīsināja laiku, attiecīgi 73 ± 21 s un 60 ± 8 s, salīdzinot ar 175 ± 36 s kontroles grupā, līdz atjaunojās normāls sinusa ritms.



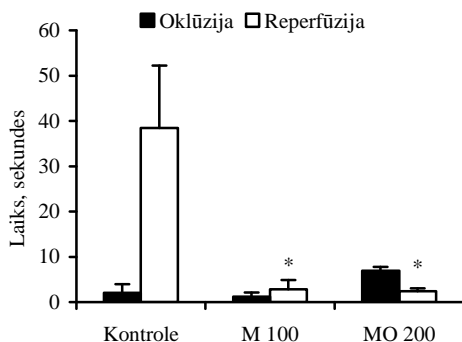
13. attēls. Mildronāta un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz laiku, līdz attīstās aritmijas oklūzijā, un laiku, līdz atjaunojās normāls sinusa ritms reperfūzijā Wistar žurkām. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 6 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Lai gan mildronāts un mildronāta orotāts neietekmēja tahikardijas biežumu oklūzijas un reperfūzijas laikā, tomēr mildronāts ticami samazināja sirds kambaru fibrilācijas biežumu reperfūzijas laikā, bet mildronāta orotāts gan oklūzijas, gan reperfūzijas laikā (14. attēls).



14. attēls. Mildronāta un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz sirds kambaru fibrilācijas biežumu oklūzijā un reperfūzijā Wistar žurkās. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (hī kvadrāta tests, $p < 0,05$).

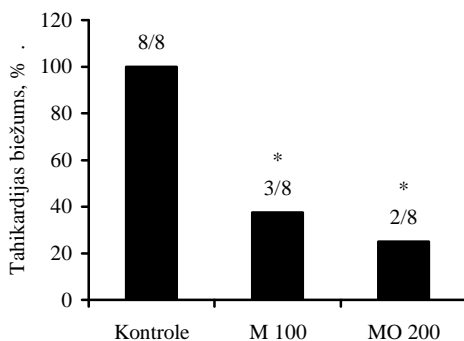
Mildronāts un mildronāta orotāts ievērojami samazināja kopējo sirds kambaru fibrilācijas laiku reperfūzijā (attiecīgi 3 ± 2 s un 2 ± 2 s, salīdzinot ar 38 ± 14 s kontroles grupā), bet neietekmēja to oklūzijas laikā (15. attēls).



15. attēls. Mildronāta un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz kopējo sirds kambaru fibrilācijas laiku oklūzijā un reperfūzijā Wistar žurkās. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 6 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

3.6.2. Ietekme uz kalcija hlorīda izraisītajām aritmijām

Mildronāts (100 mg/kg) un mildronāta orotāts (200 mg/kg) neietekmēja laiku, kad sākās aritmijas pēc kalcija hlorīda ievadīšanas (attiecīgi pēc 26 ± 4 s un 25 ± 4 s, salīdzinot ar 30 ± 4 s kontroles grupā), un laiku, līdz atjaunojās normāls sinusa ritms (attiecīgi 119 ± 20 s un 97 ± 12 s, salīdzinot ar 159 ± 39 s kontroles grupā). Mildronāts un mildronāta orotāts ticami samazināja kalcija hlorīda izraisīto sirds kambaru tahikardijas biežumu *Wistar* žurkās (16. attēls).



16. attēls. Mildronāta un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz sirds kambaru tahikardijas biežumu *Wistar* žurkās. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (*hī kvadrāta tests*, $p < 0,05$).

3.7. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz hipertensijas attīstību *Dahl* sāls-jūtīgajās žurkās

3.7.1. Ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 8 nedēļu perorālas lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB plazmas koncentrācijas izmaiņām *Dahl* žurkās parādīta 3. tabulā. Lietojot barību ar palielinātu sāls saturu (PS, 8 % NaCl), karnitīna koncentrācija *Dahl* PS kontroles žurku asins plazmā samazinājās apmēram 2 reizes, salīdzinot ar žurkām, kas lietoja barību ar nepalielinātu sāls (NS, 0,3 % NaCl) saturu. Karnitīna (PS/K 100) un karnitīna un mildronāta kombinācijas (PS/K+M) lietošana statistiski ticami palielināja karnitīna koncentrāciju žurku asins plazmā, salīdzinot ar PS kontroles grupas dzīvniekiem. Mildronāta lietošana statistiski ticami samazināja karnitīna koncentrāciju, salīdzinot gan ar NS, gan PS

kontroles grupas žurkām. Sāls saturs barībā neietekmēja GBB koncentrāciju NS un PS kontroles grupās, bet mildronāta, karnitīna un abu vielu kombinācijas lietošanas ietekmē GBB koncentrācija palielinājās attiecīgi 6, 1,5 un 12 reizes, salīdzinot ar PS kontroli.

3. tabula

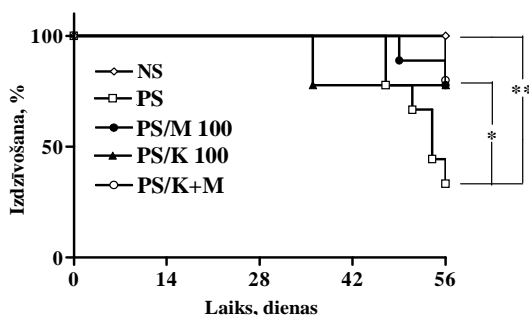
Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju *Dahl* žurku asins plazmā

	Nepalielināta sāls saturs diēta (NS)	Palielināta sāls saturs diēta (PS)			
		Kontrole	M 100	K 100	K+M
Karnitīns, μM	55±6 ^{*,#}	23±3 [#]	5±1 [*]	56±4 ^{*,#}	36±2 ^{*,#}
GBB, μM	1.5±0.1 [#]	1.5±0.1 [#]	8.6±1.0 [*]	2.2±0.4 ^{*,#}	18.1±3.4 ^{*,#}

*Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3 – 10 dzīvniekos ± SEM. * statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas; # statistiski ticami atšķiras no PS/M 100 grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$).*

3.7.2. Ietekme uz izdzīvošanu

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) ilgstošas lietošanas ietekme uz *Dahl* žurku izdzīvošanu parādīta 17. attēlā.



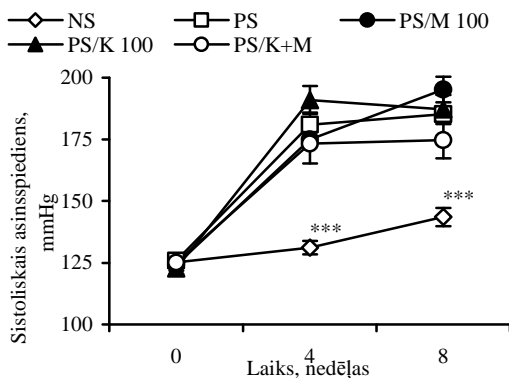
17. attēls. Kaplaņa-Meiera *Dahl* žurku izdzīvošanas analīzes shēma mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekmes izvērtēšanai. *, ** statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Datu analīze ar Kaplaņa-Meiera metodi parādīja, ka PS kontroles žurkām ir ievērojami lielāka mirstība nekā NS grupas žurkām. Pēc 8 nedēļām PS kontroles grupā izdzīvoja 30 % (3 no 10) dzīvnieku, bet NS grupā nāves gadījumu nebija. Karnitīna un mildronāta kombinācijas

(PS/K+M) lietošana statistiski ticami uzlaboja izdzīvošanu (80 %, 8 no 10 dzīvniekiem); savukārt, lai arī karnitīna (PS/K 100) un mildronāta (PS/M 100) grupās izdzīvoja 80 % (8 no 10) dzīvnieku, tomēr šie efekti nebija statistiski ticami, salīdzinot ar kontroli.

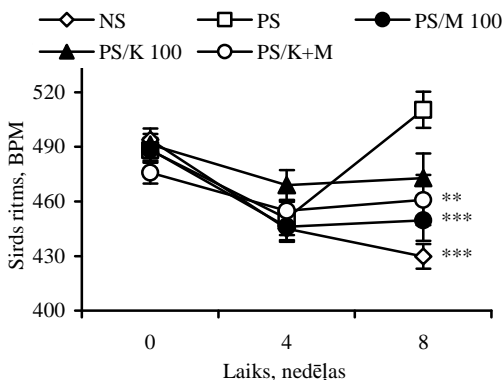
3.7.3. Ietekme uz sistolisko asinsspiedienu un sirds ritmu

Eksperimenta sākumā *Dahl* žurku sistoliskais asinsspiediens visās grupās bija vidēji 125 mmHg. Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 8 nedēļu ilgstoša lietošana neietekmēja hipertensijas attīstību. Sistoliskais asinsspiediens visās grupās bija augstāks par 170 mmHg, sasniedzot pat 195 mmHg (18. attēls).



18. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz sistolisko asinsspiedienu *Dahl* žurkās. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3-10 dzīvniekos \pm SEM. *** statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,001$).

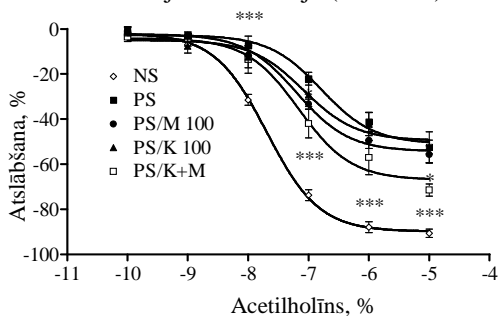
Sirds ritms neatšķīrās starp grupām gan eksperimenta sākumā, gan arī pēc 4 nedēļām. Toties pēc 8 nedēļām PS kontroles grupā sirds ritms palielinājās, sasniedzot 510 ± 10 sitienu minūtē, bet NS, kā arī mildronāta (PS/M 100) un kombinācijas (PS/K+M) grupās sirds ritms bija statistiski ticami zemāks attiecīgi par 16, 12 un 10 % (19. attēls).



19. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz Dahl žurku sirds ritmu. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3 – 10 dzīvniekos \pm SEM. **, *** statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.7.4. Ietekme uz endoteliālo funkciju

Lietojot barību ar palielinātu sāls saturu, pasliktinājās Dahl žurku aortas gredzenu atslābšana acetilholīna ietekmē, salīdzinot ar NS grupas žurkām. Mildronāta un karnitīna kombinācijas lietošana uzlaboja aortas gredzenu atslābšanu acetilholīna ietekmē, bet karnitīns un mildronāts atsevišķi endoteliālo funkciju neietekmēja (20. attēls).



20. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz endoteliālo funkciju Dahl žurkās. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3 – 10 dzīvniekos \pm SEM. *, *** statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

4. Diskusija

Promocijas darbs veltīts pētījumiem par karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekmi uz sirds-asinsvadu sistēmas funkcionalitāti normoksijas un išēmijas apstākļos. Karnitīna koncentrācijas izmaiņas panāktas, lietojot gan karnitīnu, gan mildronātu. Pētījumā raksturota karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz sirds aizsardzību išēmijas laikā, hipertensijas attīstību un karnitīna-atkarīgo enzīmu aktivitātes izmaiņām.

4.1. Karnitīna koncentrācijas samazināšanas ietekme uz sirds funkcionālajiem rādītājiem un asins plazmas un audu bioķīmiskajiem parametriem

Karnitīns piedalās glikozes un taukskābju enerģijas metabolisma regulēšanā sirds un skeleta muskuļos un organismā tā homeostāze tiek nodrošināta, aktīvi darbojoties kompleksai transporta sistēmai. Tajā pašā laikā trūkst pētījumu par samazinātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz sirds un aknu funkcijām.

Mildronāts ir labi zināms karnitīna koncentrāciju samazinošs aģents, kas kavē gan karnitīna biosintēzi (Simkhovich et al., 1988), gan samazina tā reabsorbciju nierēs (Spaniol et al., 2001). Kavējot biosintēzi, mildronāts izraisa karnitīna prekursora GBB koncentrācijas palielināšanos gan asinīs, gan audos (Liepinsh et al., 2006). Mūsu pētījumu rezultāti apliecina, ka, lietojot 4 – 12 nedēļas mildronātu 100, 200 un 400 mg/kg, karnitīna koncentrācija samazinās, bet GBB koncentrācija palielinās asins plazmā (1. attēls) un sirds (2.A un 3.A attēls) un aknu (2.B un 3.B attēls) audos. GBB koncentrācijas izmaiņas atšķirībā no karnitīna koncentrācijas izmaiņām nebija atkarīgas no mildronāta devas. Tas varētu liecināt, ka lietotās mildronāta devas vienādi kavē GBBH darbību, bet karnitīna koncentrācijas samazināšanos, pieaugot mildronāta devai, varētu skaidrot ar pieaugošo karnitīna reabsorbcijas kavēšanu nierēs, inhibējot OCTN2.

Literatūrā ir pretrunīga informācija par mildronāta izraisītā karnitīna samazinājuma ietekmi uz aknu funkcionalitāti. Ir zināmi pētījumi, kur samazināta karnitīna koncentrācija pēc 6 nedēļu mildronāta lietošanas devā 200 mg/kg izraisa aknu steatozi (Spaniol et al., 2003). Tajā pašā laikā ir parādīts, ka lipīdu akumulēšanās aknās, ja izteikti ir samazināta karnitīna koncentrācija, vērojama tikai badinātām žurkām un pēc barības uzņemšanas dažu stundu laikā lipīdu līmenis normalizējas (Degrace et al., 2007). Lai pārbaudītu mildronāta (100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas lietošanas (4, 8 un 12 nedēļas) rezultātā samazinātās

karnitīna koncentrācijas ietekmi uz aknu funkcionalitāti, veicām aknu audu griezumam histohimisko analīzi, noteicām triglicerīdu un taukskābju koncentrācijas aknu audos, kā arī lipīdu profilu un aknu funkcionalitātes marķierus asins plazmā. Aknu audu griezumam histohimiskā analīze neuzrādīja lipīdu infiltrācijas pazīmes, bet triglicerīdu koncentrācija statistiski ticami palielinājās par 10-20 % tikai mildronāta 400 mg/kg devas gadījumā (7.A attēls). Taukskābju koncentrācija aknās ticami palielinājās tikai pēc 12 nedēļām, nepārsniedzot 15 %, salīdzinājumā ar kontroles grupu (7.B attēls).

Karnitīna koncentrācijas samazinājums būtiski neietekmēja arī asins plazmas lipīdu profilu, jo vienīgās izmaiņas, kas varētu liecināt par ievērojami kavētu taukskābju β -oksidāciju, novēroja mildronāta 400 mg/kg devas gadījumā, un izteiktāki šie efekti bija žurkām badinātā stāvoklī. Tā, piemēram, β -hidroksibutirāta koncentrācijas samazināšanos, kas liecina par kavētu taukskābju metabolismu un pastiprinātu glikozes izmantošanu (van Knegsel et al., 2005), mūsu pētījumā novērojām tikai pēc 12 nedēļām, ja mildronāta deva bija 400 mg/kg.

Atšķirīgie rezultāti par mildronāta samazinātās karnitīna koncentrācijas ietekmi uz aknu funkcionalitāti, iespējams, ir saistīti ar pētījumos izmantotā 3-(2,2,2-trimetil-hidrazīnija)-propionāta izcelsmi. *Spaniol M. ar kolēģiem* (Spaniol et al., 2003) izmantoja pašu sintezētu vielu, kas, balstoties uz metodes aprakstu un pētījumiem par 3-(2,2,2-trimetil-hidrazīnija)-propionāta attīrīšanu no sintēzes blakusproduktiem (Hmelnickis et al., 2008), varētu saturēt tādas toksiskus piemaisījumus kā 1,1,1-trimetilhidrazīnija sāļi un citi hidrazīnija atvasinājumi. Mūsu un Degrace P. ar kolēģiem (Degrace et al., 2007) pētījumos izmantots AS „Grindeks” ražotais 3-(2,2,2-trimetil-hidrazīnija)-propionāts jeb mildronāts un toksiski efekti nav novēroti.

Karnitīns enzīma KPT I ietekmē veido acilkarnitīnus, kuri tiek transportēti mitohondrijos. Līdz ar to bija svarīgi noskaidrot, kas notiek ar KPT I aktivitāti samazinātās karnitīna koncentrācijas apstākļos. Virkne pētījumu parādījuši, ka mildronāta lietošanas izraisītais karnitīna samazinājums izsauc KPT I mRNS ekspresijas un arī proteīna daudzuma palielināšanos ne tikai sirdī, bet arī aknu audos (Degrace et al., 2004; Degrace et al., 2007; Liepinsh et al., 2008). Iepriekšējos pētījumos parādīts, ka pēc mildronāta lietošanas KPT I aktivitāte ir palielināta sirds un aknu audos, mērījumus veicot izolētos mitohondrijos eksogēni pievienota karnitīna klātbūtnē; ir zināms, ka samazināta karnitīna

koncentrācija audos neiespaido KPT I jutību pret malonil-koenzīma A inhibējošo ietekmi (Tsoko et al., 1995; Degrace et al., 2004; Degrace et al., 2007).

Mūsu pētījuma ietvaros KPT I aktivitāti noteicām, izmantojot reālās karnitīna koncentrācijas audos, bez karnitīna koncentrāciju izlīdzināšanas, kā to darīja iepriekš minētajos pētījumos. KPT I aktivitāte sirds audos palielinājās pēc ilgstošas (4 – 12 nedēļas) mildronāta lietošanas (6. attēls), bet nemainījās aknu audos. Toties pēc 2 nedēļu ilgas mildronāta (100 mg/kg) lietošanas, KPT I aktivitāte sirdī samazinājās par 26 %, salīdzinot ar kontroles grupu (12. attēls), bet no KPT I atkarīgā taukskābju β -oksidācija samazinājās par 27 % (1. tabula). Vienlaikus nenovēroja KPT IA un IB mRNS ekspresijas izmaiņas. Tas atšķiras no iepriekšējos pētījumos novērotās mRNS ekspresijas stimulācijas, lietojot mildronātu devās 200 mg/kg pelēs (21 diena) un 800 mg/kg žurkās (10 dienas) (Degrace et al., 2004; Liepinsh et al., 2008).

Iegūtie rezultāti liecina, ka KPT I aktivitātes, proteīna un mRNS daudzuma izmaiņas pēc mildronāta lietošanas ir atkarīgas no tā, cik izteikts vai ilgstošs ir bijis karnitīna samazinājums. Šo efektu iespējams skaidrot ar dažādo KPT I izoenzīmu K_m vērtībām karnitīnam, kas ir no 35 μ M KPT IA aknās, līdz 500-700 μ M KPT IB muskuļu audos, bet sirdī, kur sastopamas abas izoformas, K_m vērtība ir ~ 200 μ M (Brown et al., 1995). Līdz ar to karnitīna koncentrācija normālos apstākļos sirds audos (0,6 – 3 mM atkarībā no sugas) un aknu audos (0,4 – 3 mM atkarībā no sugas) ir vairāk nekā pietiekama, lai nodrošinātu taukskābju transportu mitohondrijos. Tāpēc var secināt, ka karnitīna koncentrācijas samazinājumam jābūt ļoti izteiktam vai ilgstošam, lai notiktu kompensatora KPT I mRNS un proteīna daudzuma, kā arī aktivitātes palielināšanās sirds un it īpaši aknu audos.

Vairākos pētījumos parādīts, ka izteikts karnitīna samazinājums izraisa hipoglikēmiju vai stimulē glikozes oksidāciju žurkās (Broderick, 2006), savukārt mērens karnitīna samazinājums pēc mildronāta lietošanas (200 mg/kg) veicina glikozes uzņemšanu sirdī un glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu un transportproteīnu gēnu ekspresijas palielināšanos pelēs (Liepinsh et al., 2008). Karnitīna samazinājums pat pēc mildronāta lietošanas devā 400 mg/kg praktiski neietekmēja glikozes koncentrāciju asinīs ne ēdušām, ne badinātām *Wistar* žurkām. Šie dati liecina, ka karnitīna samazinājuma ietekme uz glikozes metabolismu ir atkarīga no enerģijas substrātu pieejamības, jo glikozes metabolisma

veicināšana kalpo kā kompensators mehānisms kavētas taukskābju β -oksidācijas apstākļos. Papildus jāatzīmē, ka kardioprotektīvā efekta sasniegšanai nozīmīgāk būtu veicināt glikozes metabolismu tieši išēmijas-reperfūzijas, nevis normoksijas laikā.

Agrākie pētījumi parādījuši, ka mildronāts kavē KrAT, un izteikta hipotēze, ka, palielinot acetil-koenzīma A daudzumu, tiek veicināta dažādu mitohondrijos notiekošo metabolisma procesu norise. Tomēr pēdējā laika pētījumi par mildronāta lietošanas stimulēto glikozes metabolismu (Liepinsh et al., 2008) ir pretrunā iepriekš novērotajam, jo acetil-koenzīma A uzkrāšanās kavētu PDH kompleksa reakciju norisi. Lai pilnīgāk raksturotu mildronāta mijiedarbību ar KrAT, mēs veicām pētījumus gan ar attīrītu enzīmu *in vitro*, gan *ex vivo* izolētos mitohondrijos pēc mildronāta 2 nedēļu lietošanas. Bioķīmiskie enzīma aktivitātes mērījumi apliecināja, ka mildronāta saistība ar KrAT karnitīna klātienē ir salīdzinoši vāja, jo noteiktā K_i vērtība reālo karnitīna koncentrāciju gadījumā bija $5,2 \pm 0,6$ mM (8. un 9. attēls). Ar molekulārās dinamikas skaitļošanas palīdzību noskaidrojām, ka mildronāts konkurē ar karnitīnu par saistīšanos KrAT aktīvajā centrā. Vienīgā būtiskā atšķirība ir abu molekulu trimetilamonija grupas izvietojumā: karnitīna gadījumā trimetilamonija grupa ir iegremdēta KrAT aktīvā centra hidrofobajā kabatā, bet mildronāta gadījumā – vērsta prom no proteīna virsmas (10. attēls). Tieši tas var izskaidrot, kāpēc tik ļoti pasliktinās mildronāta saistība ar KrAT karnitīna klātbūtnē. Lai gan tiek uzskatīts, ka visām aciltranferāzēm aktīvie centri pēc to uzbūves ir līdzīgi (Jogl et al., 2004), ir zināms, ka mildronāts neietekmē KPT I aktivitāti (Tsoko et al., 1995), kas netieši liecina par atšķirīgo mildronāta un, iespējams, arī karnitīna saistīšanos šo enzīmu katalītiskajos centros.

Lai pilnvērtīgi raksturotu mildronāta mijiedarbību ar KrAT, enzīma aktivitāti noteicām sirds mitohondrijos (bez karnitīna koncentrācijas izlīdzināšanas), kas izolēti no *Wistar* žurkām, kurām vadīts mildronāts 100 mg/kg. Lai gan karnitīna koncentrācija citosolā samazinās, ir zināms, ka sirds mitohondrijos pēc mildronāta lietošanas karnitīna koncentrācija pat nedaudz palielinās (Degrace et al., 2004). KrAT aktivitātes mērījumi *ex vivo* apliecināja *in vitro* iegūtos datus, jo enzīma aktivitāte, salīdzinot ar kontroles grupu, nemainījās. Iegūtie rezultāti liecina, ka ne mildronāts, ne tā lietošanas ietekmē izmainītā

karnitīna koncentrācija citosolā un mitohondrijos tieši neietekmē KrAT aktivitāti normoksijas apstākļos *in vivo*. Tajā pašā laikā nevar izslēgt karnitīna koncentrācijas izmaiņu nozīmi KrAT aktivitātes regulācijā išēmijas un it īpaši reperfūzijas laikā, kad palielinātā karnitīna un samazinātā garo virkņu acilkoenzīmu A koncentrācija mitohondrijos KPT I kavēšanas dēļ, varētu stimulēt enzīma aktivitāti un attiecīgi glikozes metabolisma norises.

Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka mildronāta izraisītais karnitīna samazinājums izsauc tādas izmaiņas enerģijas metabolismā iesaistīto enzīmu aktivitātē, kas varētu veicināt sirds šūnu aizsardzību pret išēmijas-reperfūzijas iespējamo bojājumu attīstību.

4.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu

Gan karnitīna koncentrācijas palielināšanās, gan arī samazināšanās var reducēt išēmijas izraisīto sirds šūnu bojājumu. Karnitīna lietošana samazināja infarkta lielumu pēc paliekošas sirds kreisās koronārās artērijas oklūzijas (Mouhieddine & de Leiris, 1993), bet neietekmēja išēmijas-reperfūzijas izsuktā nekrotiskā bojājuma lielumu (Briet et al., 2008). Mildronāta lietošanas ietekmē samazinātā karnitīna koncentrācija ir kardioprotektīva (Dambrova et al., 2002; Liepinsh et al., 2006). Iepriekšējos pētījumos arī parādīts, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts korelē ar karnitīna biosintēzes prekursora GBB koncentrācijas palielināšanos (Liepinsh et al., 2006).

Mūsu pētījuma laikā salīdzinājām karnitīna (100 mg/kg), mildronāta (100 mg/kg) un abu vielu kombinācijas (100 un 100 mg/kg) 14 dienu ilgstošas lietošanas ietekmi uz sirds aizsardzību pret išēmijas-reperfūzijas bojājumu. Tā kā gan karnitīna, gan mildronāta lietošana izraisa GBB koncentrācijas palielināšanos, tad īpaši izvērtējam kardioprotektīvā efekta saistību ar GBB koncentrācijas izmaiņām asins plazmā un sirds audos.

Mildronāta 14 dienu lietošana samazināja karnitīna koncentrāciju sirds audos par 69 %, kā arī infarkta lielumu par 34 %. Lietojot mildronāta un karnitīna kombināciju, karnitīna koncentrācija sirds audos un infarkta lielums praktiski nemainījās. Karnitīna lietošana palielināja tā koncentrāciju sirds audos par 28 %, tomēr ticami samazināt infarkta lielumu nespēja (11. attēls). Sirdsdarbības parametri neatšķīrās starp grupām ne normoksijas, ne išēmijas un reperfūzijas laikā, liecinot, ka mildronāta un karnitīna ietekme uz infarkta lielumu nav saistāma ar izmaiņām sirds veiktajā darbā.

Gan pēc karnitīna, gan mildronāta lietošanas GBB koncentrācija bija palielināta asins plazmā (4.B attēls) un sirds audos (5.B attēls). Visizteiktāk GBB koncentrāciju sirds audos palielināja karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana, tomēr šajā grupā nebija vērojams infarkta samazinājums (11. attēls).

Iegūtie rezultāti apliecināja, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts saistīts ar izmaiņām sirds enerģijas metabolismā, ko izsauc karnitīna koncentrācijas samazināšanās un nevis GBB koncentrācijas palielināšanās. Karnitīna koncentrācijas samazināšanās ne tikai inhibē KPT I (12. attēls), kas kavē taukskābju metabolismu (1. tabula), bet, balstoties uz iepriekšējo pētījumu rezultātiem, stimulē arī glikozes izmantošanu, jo kompensatori palielinās tās metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresija un aktivitāte (Broderick, 2006; Liepinsh et al., 2008).

4.3. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hipertensijas attīstību

Hipertensija ir miokarda infarkta riska faktors, kā arī veicina endoteliālās disfunkcijas (Hirooka et al., 2008) un aterosklerozes attīstību (Biswas et al., 2003). Savukārt karnitīna lietošana spēj aizkavēt ar hipertensiju saistīto komplikāciju attīstību (de Sotomayor et al., 2007). Līdzīga antiaterosklerotiska un angioprotektīva iedarbība ir mildronātam (Vilskersts et al., 2009). Mūsu pētījumā salīdzinājām karnitīna, mildronāta un abu vielu kombinācijas 8 nedēļu ilgstošas lietošanas ietekmi uz hipertensijas izraisīto komplikāciju attīstību *Dahl* sāls-jutīgo (DS) žurku modelī.

DS žurkām, kas saņēma barību ar palielinātu sāls saturu (PS, 8 % NaCl), izteikta hipertensija attīstījās jau pēc 4 nedēļām (18. attēls). Pēc 8 nedēļām attīstījās arī sirds hipertrofija, tomēr sirds mazspēju nenovēroja nevienā no grupām, dodot iespēju pārbaudīt karnitīna un mildronāta terapijas ietekmi uz hipertensijas izraisītajām komplikācijām.

PS kontroles žurkām, salīdzinot ar NS žurkām, aptuveni 2 reizes samazinājās karnitīna koncentrācija asins plazmā (3. tabula). Tas varētu būt saistīts ar pastiprinātu karnitīna ekskrēciju ar urīnu nieru bojājumu dēļ (Zhu et al., 2009). Karnitīna lietošana pilnībā novērsa tā koncentrācijas samazināšanos žurkām, kuras saņēma barību ar palielinātu sāls saturu. Arī karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana daļēji novērsa karnitīna koncentrācijas samazināšanos (3. tabula). Mildronāta lietošana ievērojami samazināja karnitīna koncentrāciju, ļaujot novērtēt

gan neizmainītas, gan ievērojami pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz hipertensijas izraisīto komplikāciju attīstību. Līdzīgi, kā novērojām *Wistar* žurkās, arī DS žurkās lietotās vielas palielināja GBB koncentrāciju asins plazmā (3. tabula), pie tam visizteiktāk karnitīna un mildronāta kombinācijas grupā.

PS kontroles DS žurkām bija ievērojami augstāka mirstība nekā NS grupas DS žurkām. Karnitīna un mildronāta kombinācija samazināja mirstību par 80 % (17. attēls). Tā kā sirds funkcionālie parametri un plaušu/ķermeņa masas indekss starp grupām neatšķīrās, tad iespējams nāves cēlonis varētu būt saistīts ar sirds kreisā kambara hipertrofijas attīstību, kas ir miokarda infarkta un sirds kambaru letālu aritmiju riska faktors (Messerli, 1999).

Mūsu pētījuma rezultāti *Wistar* žurku modelī liecina, ka mildronātam piemīt antiaritmiska iedarbība, samazinot kopējo dažādas izcelsmes aritmiju attīstības biežumu (14. un 16. attēls), kā arī samazinot laiku, līdz atjaunojas normāls sinusa ritms (13. attēls), un kopējo aritmiju ilgumu (15. attēls). Tā kā tiek uzskatīts, ka acilkarnitīnu uzkrāšanās ir saistīta ar aritmiju attīstību (Bonnet et al., 1999), tad visticamāk mildronāta antiaritmogēnā iedarbība saistīta ar samazināto KPT I aktivitāti (12. attēls), ko izraisa samazinātā karnitīna koncentrācija sirds audos (5.A attēls). Rezultātā samazinās acilkarnitīnu koncentrācija sirds audos un tiek novērsta to aritmogēnā ietekme. Tā kā arī karnitīnam piemīt antiaritmiskas īpašības (Najafi et al., 2008), tad iespējams tieši šo efektu dēļ karnitīna un mildronāta kombinācija ticami samazināja DS žurku mirstību (17. attēls).

Arī sirds ritma paaugstināšanās ir saistīta ar mirstības pieaugumu gan normotensijas, gan hipertensijas apstākļos, turklāt mirstības risks šādā gadījumā ir vienāds vai pat lielāks nekā paaugstināta holesterīna līmeņa, asinsspiediena vai smēķēšanas ietekmē (Palatini, 2008). Līdzīgus novērojumus izdarījām arī savos pētījumos, jo PS kontroles žurkām pēc 8 nedēļām ticami paaugstinājās sirds ritms (19. attēls), kā arī bija vislielākā mirstība, salīdzinot ar NS grupas žurkām (17. attēls). Karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana novērsa sirds ritma paaugstināšanos, kā arī ticami samazināja mirstību (17. attēls). Mildronāta lietošana arī novērsa sirds ritma paaugstināšanos, tomēr mirstību ticami samazināt nespēja ($p < 0,06$, salīdzinot ar PS kontroles grupu). Iegūtie rezultāti liecina, ka samazināto mirstību kombinācijas grupā (17. attēls) var saistīt ar abu savienojumu iepriekš aprakstīto kardiovaskulāro sistēmu aizsargājošo iedarbību.

Hipertensijas izraisīto endotēlija disfunkciju saista gan ar kardiovaskulāro notikumu biežumu, gan orgānu bojājumu attīstību (Xu et al., 2009). Mūsu pētījuma ietvaros izvērtējām mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekmi uz endotēlija disfunkcijas attīstību DS žurku izolēto aortas gredzenu modelī. Lai gan agrākos pētījumos ir novēroti atsevišķi mildronāta un karnitīna angioprotektīvie efekti (Vilskersts et al., 2009), mēs endotēlija funkcijas uzlabošanas novērojām tikai karnitīna un mildronāta kombinācijas grupā (20. attēls). Pastāv hipotēze, ka endotēlija disfunkcijas attīstības kavēšana ir saistīta ar tiešu aizsargājošo ietekmi uz endotēliju, nevis ar asinsspiedienu samazinošu iedarbību (Tzemos et al., 2001). Mūsu iegūtie rezultāti saskan ar šo hipotēzi, jo, lai gan karnitīna un mildronāta kombinācija nesamazināja asinsspiedienu (18. attēls), tā kavēja endotēlija disfunkcijas attīstību (20. attēls).

Lai gan GBB koncentrācijas izmaiņas sirds audos korelē ar kardioprotekciju išēmijas-reperfūzijas eksperimentālā žurku modelī pēc mildronāta lietošanas (Liepinsh et al., 2006), mūsu rezultāti liecina, ka šis efekts tomēr ir atkarīgs no karnitīna koncentrācijas samazinājuma (11. attēls). Toties viens no ticamākajiem karnitīna un mildronāta kombinācijas angioprotektīvā efekta skaidrojumiem ir saistīts ar GBB koncentrācijas palielināšanos, jo gan karnitīns, gan mildronāts un it īpaši abu kombinācija palielināja GBB koncentrāciju asins plazmā. Tā kā tieši kombinācijas grupā novērojām visizteiktāko GBB koncentrācijas palielināšanos un vienlaicīgi izteiktāko aizsardzību pret hipertensijas komplikācijām, tad varētu domāt, ka GBB ir būtiska loma šo efektu sasniegšanā. Vienlaicīgi šie dati vedina domāt, ka GBB angioprotektīvā darbība varētu uzlabot ar karnitīna samazinājumu saistītos kardioprotektīvos efektus, tomēr eksperimentāls pierādījums šādai hipotēzei vēl jāmeklē.

5. Secinājumi

- Iegūtie rezultāti apliecina mildronāta ilgstošas lietošanas nekaitīgumu. Noteikts, ka līdz trīs mēnešu ilga mildronāta lietošana devās, kas sirds audos 8 līdz 16 reizes samazina karnitīna koncentrāciju un 8 līdz 10 reizes palielina γ -butirobetaīna (GBB) koncentrāciju, bet aknu audos 8 līdz 17 reizes samazina karnitīna koncentrāciju un 30 līdz 66 reizes palielina GBB koncentrāciju, neizraisa sirds darbības un aknu funkcionalitātes traucējumus, kā arī praktiski neietekmē lipīdu profila izmaiņas audos un asins plazmā.
- Mildronāta ilgstošas lietošanas rezultātā tiek kavēta no KPT I atkarīgā taukskābju β -oksidācija. Pēc 14 dienu ilgas mildronāta lietošanas izraisītā karnitīna koncentrācijas pazemināšanās izsauc KPT I aktivitātes samazināšanos, tāpēc par 27 % samazinās sirds mitochondriju elpošana, kā substrātu izmantojot palmitoilkoenzīmu A. Kompensatori enzīma aktivitāte sirds audos pieaug tikai pēc vismaz mēnesi ilga karnitīna koncentrācijas pazeminājuma.
- Normoksijas apstākļos mildronāts neietekmē piruvāta metabolismu, jo nemainās KrAT un piruvāt-dehidrogenāzes kompleksa aktivitāte sirds mitochondrijos. Lai gan mildronāts ir vājš KrAT inhibitors *in vitro* un konkurē ar karnitīnu par saistīšanos enzīma aktīvajā centrā, *in vivo* mildronāts neietekmē enzīma aktivitāti.
- Mildronāta izraisītais karnitīna koncentrācijas samazinājums sirds audos ir pamatā mehānismiem, kas nodrošina mildronāta kardioprotektīvo efektu išēmijas apstākļos. Novēršot mildronāta izraisīto karnitīna koncentrācijas samazināšanos, kardioprotektīvais efekts netiek novērots.
- Angioprotektīvā efekta attīstību sāls-inducētās hipertensijas apstākļos *Dahl* žurkām nosaka mildronāta un tā kombinācijas ar karnitīnu izraisītā GBB koncentrācijas palielināšanās asins plazmā.
- **Mildronāta molekulārās darbības mehānisma pamatā ir KPT I aktivitātes kavēšana, samazinot karnitīna koncentrāciju sirds audos, kā rezultātā tiek kavēts taukskābju metabolisms un sasniegts kardioprotektīvais efekts.**
- **Karnitīna sistēmas regulācija ir jauns mehānisms farmaceitiskajai industrijai zaļu izstrādei kardiovaskulāro saslimšanu terapijai.**

6. Literatūras saraksts

Baliutyte G, Baniene R, Trumbeckaite S, Borutaite V, Toleikis A. Effects of Ginkgo biloba extract on heart and liver mitochondrial functions: mechanism(s) of action. *J Bioenerg Biomembr*, 2010; 42(2):165-172.

Bartuś M, Łomnicka M, Kostogryś RB, Kaźmierczak P, Watała C, Słomska EM, Smoleński RT, Pisulewski PM, Adamus J, Gebicki J, Chłopicki S. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol Rep*, 2008; 60(1):127-138.

Beadle RM, Frenneaux M. Modification of myocardial substrate utilisation: a new therapeutic paradigm in cardiovascular disease. *Heart*, 2010; 96(11):824-830.

Biswas S, Dastidar DG, Roy KS, Pal SK, Biswas TK, Ganguly SB. Complications of hypertension as encountered by primary care physician. *J Indian Med Assoc*, 2003; 101(4):257-259.

Bonnet D, Martin D, Pascale De Lonlay, Villain E, Jouvét P, Rabier D, Brivet M, Saudubray JM. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation*, 1999; 100(22):2248-53.

Briet F, Keith M, Leong-Poi H, Kadakia A, Aba-Alkhalil K, Giliberto JP, Stewart D, Errett L, Mazer CD. Triple nutrient supplementation improves survival, infarct size and cardiac function following myocardial infarction in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008; 18(10):691-699.

Broderick TL. Hypocarnitinaemia induced by sodium pivalate in the rat is associated with left ventricular dysfunction and impaired energy metabolism. *Drugs R D*, 2006; 7(3):153-161.

Brown NF, Weis BC, Husti JE, Foster DW, McGarry JD. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem*, 1995; 270(15):8952-8957.

Dambrova M, Cirule H, Svalbe B, Zvejniece L, Pugovichts O, Zorenko T, Kalvinsh I, Liepinsh E, Belozertseva I. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance. *Physiol Behav*, 2008; 95(3):341-347.

Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 2002; 12(6):275-279.

de Sotomayor MA, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Marhuenda E, Herrera MD. L-carnitine and its propionate: improvement of endothelial function in SHR through superoxide dismutase-dependent mechanisms. *Free Radic Res*, 2007; 41(8):884-891.

Degrace P, Demizieux L, Du ZY, Gresti J, Caverot L, Djaouti L, Jourdan T, Moindrot B, Guillard JC, Hocquette JF, Clouet P. Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem*, 2007; 282(29):20816-20826.

Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Tsoko M, André A, Demaison L, Clouet P. Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. *Mol Cell Biochem*, 2004; 258(1-2):171-182.

Georges B, Le Borgne F, Galland S, Isoir M, Ecosse D, Grand-Jean F, Demarquoy J. Carnitine transport into muscular cells. Inhibition of transport and cell growth by mildronate. *Biochem Pharmacol*, 2000; 59(11):1357-1363.

Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Ito K, Sunagawa K. Effects of valsartan or amlodipine on endothelial function and oxidative stress after one year follow-up in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 2008; 30(3):267-276.

Hmelnickis J, Pugovics O, Kazoka H, Viksna A, Susinskis I, Kokums K. Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *J Pharm Biomed Anal*, 2008; 48(3):649-656.

Jogl G, Hsiao YS, Tong L. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:17-29.

Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D, Kirjanova O, Pugovichs O, Kalvinsh I, Dambrova M. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006; 48(6):314-319.

Liepinsh E, Vilskersts R, Skapare E, Svalbe B, Kuka J, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M. Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*, 2008; 83(17-18):613-619.

Messerli FH. Hypertension and sudden cardiac death. *Am J Hypertens*, 1999; 12(12 Pt 3):181S-188S.

Mouhieddine S, de Leiris J. Cardioprotective effect of L-carnitine in rats submitted to permanent left coronary artery ligation. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1993; 101(6):411-416.

Müller-Nordhorn J, Binting S, Roll S, Willich SN. An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J*, 2008; 29(10):1316-1326.

Najafi M, Garjani A, Maleki N, Eteraf Oskouei T. Antiarrhythmic and arrhythmogenic effects of L-carnitine in ischemia and reperfusion. *Bull Exp Biol Med*, 2008; 146(2):210-213.

Palatini P. Heart rate as predictor of outcome. *Blood Press Monit*, 2008; 13(3):167-168.

Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuke RJ, Molodchina TN, Kalviņš IJ, Lukevics E. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium) propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 1988; 37(2):195-202.

Spaniol M, Brooks H, Auer L, Zimmermann A, Solioz M, Stieger B, Krähenbühl S. Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. *Eur J Biochem*, 2001; 268(6):1876-1887.

Spaniol M, Kaufmann P, Beier K, Wüthrich J, Török M, Scharnagl H, März W, Krähenbühl S. Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res*, 2003; 44(1):144-153.

Strijbis K, Vaz FM, Distel B. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life*, 2010; 62(5):357-362.

Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J, Niot I, Demarquoy J, Boichot J, Bezard J, Rochette L, Clouet P. 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*, 1995; 49(10):1403-1410.

Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM: Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation*, 2001; 104(5):511-514.

van Kneysel AT, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod Nutr Dev*, 2005; 45(6):665-688.

Vilskersts R, Liepinsh E, Mateuszuk L, Grinberga S, Kalvinsh I, Chlopicki S, Dambrova M. Mildronate, a regulator of energy metabolism, reduces atherosclerosis in apoE/LDLR^{-/-} mice. *Pharmacology*, 2009; 83(5):287-293.

Wilcke M, Hultenby K, Alexson SE. Novel peroxisomal populations in subcellular fractions from rat liver. Implications for peroxisome structure and biogenesis. *J Biol Chem*, 1995; 270(12):6949-6958.

Xu JZ, Zhang Y, Wu SN, Niu WQ, Zhu DL, Gao PJ. Impaired endothelial function in hypertensive patients with target organ damage. *J Hum Hypertens*, 2009; 23(11):751-757.

Zhu A, Yoneda T, Demura M, Karashima S, Usukura M, Yamagishi M, Takeda Y. Effect of mineralocorticoid receptor blockade on the renal renin-angiotensin system in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *J Hypertens*, 2009; 27(4):800-805.

Pateicības

Vēlos no sirds pateikties mana zinātniskā darba vadītājām Maijai Dambrovai un Renātei Mednei par pētnieciskā darba koordinēšanu, lietderīgiem zinātniskajiem padomiem un vispusīgu atbalstu darba tapšanā.

Darba tapšana nebūtu iespējama, ja nepiedalītos teorētiski un praktiski Edgars Liepiņš un Reinis Vilšķērsts, smadzeņu guru Līga Zvejniece, dzīvnieku draugi Helēna Cīrule un Līgita Kariņa, bioķīmijas meistares Elīna Škapare un Baiba Švalbe, asistenti Rūdolfs Mežapuķe un Olga Žarkova, lietu kārtotāja Raita Brikmane un talantīgie studenti – elpinātāji un pilinātāji – Marina Makrecka un Edijs Vāvers.

Pateicos Latvijas Organiskās sintēzes institūta vadībai, personīgi direktoram Ivaram Kalviņam par atsaucību un atbalstu.

Pateicos par palīdzību rezultātu iegūšanā analītikas meistariem Solveigai Grīnbergai un Osvaldam Pugovičam, molekulārās skaitļošanas speciālistiem Edvardam Liepiņam, Aleksandram Gutsaitam, Kristapam Jaudzemam un Kirilam Zinovjevam.

Īpašu paldies vēlos izteikt vecākiem un tantēm par nerimstošo atbalstu un Marīnai par sapratni.

Paldies par finansiālo atbalstu pētījumu veikšanai AS „Grindeks”, kā arī AS „Grindeks” fondam „Zinātnes un izglītības atbalstam”. Materiālu iegāde veikta Valsts pētījumu programmas No. 2010.10-4/VPP-4 „Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai” apakšprojekta „Diabēta komplikāciju izpēte un kardiovaskulāro preparātu bioloģiskā aktivitāte” ietvaros.

Darbs tapis ar Eiropas Sociālā fonda projekta “Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu.

