

Latvijas Universitātes

Medicīnas Fakultāte



**Mildronāta protektīvās aktivitātes izpēte ar
diabētu saistīto kardiovaskulāro slimību modeļos**

**Investigation of protective activity of
mildronate in diabetes related models of
cardiovascular diseases**

Reiņa Vilšķērsta

Promocijas darbs

RĪGA

2009



Promocijas darbs tapis ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu un izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā.

Promocijas darba vadītājas:

Dr. pharm.

Maija Dambrova

Latvijas Organiskās sintēzes institūta

Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītāja

Asoc. prof., Dr. hab. biol.

Ruta Muceniece

LU Medicīnas fakultātes

Farmācijas programmas direktore,

Pateicības

Paldies visiem, kas palīdzējuši šī darba tapšanā gan intelektuāli, gan morāli, gan finansiāli.

Visdziļākā pateicība darba vadītājām Maijai Dambrovai un Rutai Muceniecei, kuras uzņēmās promocija darba vadīšanu un koordinēšanu, kuras nekad neatteica palīdzību darba tapšanā, neskopojās ar uzslavām, bet neļāva arī ieslīdēt pašapmierinātības slinkumā.

Pateicos Edgaram Liepiņam, ar kuru kopā veikti liela daļa eksperimentu un no kura mācījos pirmās eksperimentālās farmakoloģijas metodes.

Īpašu paldies vēlos izteikt Elīnai Kalnačai, kura bijusi blakus gan priekos, gan bēdās, uzmundrinājusi kādā grūtākā brīdī un allaž bijusi interesants sarunu biedrs. Paldies vēlētos pateikt arī visiem draugiem un paziņām, kas nereti palīdzēja „izvēdināt galvu” brīvdienās.

Vislielāko pateicību vēlos izteikt arī saviem vecākiem, abiem brāļiem un vecvecākiem.

Pateicība arī visiem Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas darbiniekiem: Helēnai Cīrulei Ligitai Kariņai un Baibai Švalbei par „Reiņu” sadalīšanu, svēršanu, savādīšanu, no-/saspricēšanu un samērīšanu kā darba dienās, tā arī brīvdienās un svētku dienās; Elīnai Škaparei par gelu dzīšanu un proteīnu kvantificēšanu; Raitai Brikmanei par laba garastāvokļa uzturēšanu, izstāstot kādu stāstu par savu „Vecīti” vai par kādu sadzīves ainu no kāda kabineta koridora otrā pusē; Rūdfam Mežapuķem un Olgai Žarkovai par produktīvo sadarbību, raustot zviedru bronhus; Velgai Sīlei par statistikas rēķināšanu; Līgai Zvejniecei un Jānim Kūkam, ar kuriem kopā veikti daudz eksperimentu un apmeklētas vairākas konferences; Mārim Vēverim par konsultācijām.

Nevaru neizmantot izdevību un neapliecināt cieņu Latvijas Organiskās sintēzes institūta vadībai un analītikas speciālistiem.

Gribu pateikties arī Jagellonijas universitātes profesoram S. Chlopicki par iespēju strādāt savā laboratorijā un, tagad jau doktorantam, L. Mateuszuk par vairāku metožu apmācību.

Pateicība arī Eiropas Sociālajam Fondam par finansiālo atbalstu.

Anotācija

Otrā tipa cukura diabēts ir slimība, kam raksturīgi glikozes un lipīdu metabolisma traucējumi. Pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu ir paaugstināts daudzu slimību attīstības risks, tai skaitā kardiovaskulāro. Klīniskajos pētījumos pierādīts, ka diabēta komplikāciju un citu patoloģiju attīstība ir saistīta ar hiperglikēmijas līmeni asinīs un glikozes koncentrācijas samazināšana veicina kardiovaskulāro notikumu incidences samazināšanos.

Mildronāts ir karnitīna biosintēzes inhibitors, kas, samazinot taukskābju oksidāciju, aizsargā miokardu išēmijas-reperfūzijas laikā. Kaut gan ir zināmi mildronāta efekti uz taukskābju metabolismu, tomēr nav pētīta mildronāta lietošanas ietekme uz glikozes metabolismu. Mēs noskaidrojām mildronāta ietekmi uz glikozes metabolismu veselos dzīvniekos, kā arī mildronāta ietekmi uz diabēta attīstību eksperimentālajā 2. tipa diabēta modelī – Goto-Kakizaki (G-K) žurkās. Tā kā 2. tipa diabēta pacientiem ir paaugstināts aterosklerozes un miokarda infarkta attīstības risks, mēs arī pētījām mildronāta ietekmi uz aterosklerozes attīstību un mildronāta kardioprotektīvā efekta attīstības dinamiku.

Pētot mildronāta lietošanas ietekmi uz glikozes metabolismu veselos dzīvniekos, secinājām, ka trīs nedēļu mildronāta kurss samazina glikozes koncentrāciju asinīs tukšā dūšā un stimulēja insulīna stimulēto glikozes uzņemšanu izolētā peles sirds modelī *in vitro*. Paaugstinātā glikozes uzņemšana varētu būt skaidrojama ar paaugstināto GLUT-4, insulīna receptora un piruvāta dehidrogenāzes kompleksa enzīmu ekspresiju. G-K līnijas žurkās mildronāta terapija samazināja glikozes koncentrāciju asinīs tukšā dūšā un pēc ēšanas, samazināja aortas kontraktilitāti pret fenilefīnu, bet eksperimentālajā sirds infarkta modelī *in vitro* samazināja nekrozes zonu. Mildronāta terapija arī samazināja neiropātisko komplikāciju smagumu G-K līnijas žurkās. Apolipoproteīna E un zema blīvuma lipoproteīnu receptora dubultnokaut (*apoE/LDLR^{-/-}*) peļu aterosklerozes modelī, mildronāta lietošana samazināja aterosklerotisko pangu veidošanos aortā. Mildronāta antiaterosklerotiskā darbība varētu būt skaidrojama ar samazināta superoksīda anjona rašanos aortās un uzlabotu endoteliālo NO sintēzi. Mildronāta ievadīšana 28 dienu kursa veidā izraisīja karnitīna koncentrācijas samazināšanos un GBB koncentrācijas palielināšanos gan asins plazmā, gan sirds audos. Maksimālās karnitīna un GBB koncentrāciju izmaiņas tika sasniegtas 14. dienā pēc mildronāta ievadīšanas sākuma. Eksperimentālajā sirds infarkta modelī *in vitro*, tika atklāts, ka mildronāts statistiski ticami samazina nekrozes zonu tikai pēc 14 dienu lietošanas un pastāv korelācija starp nekrozes zonu un GBB, kā arī mildronāta koncentrāciju asins plazmā.

Iegūtie zinātniskā darba rezultāti pirmo reizi parāda, ka mildronāts regulē glikozes metabolismu un ar to saistīto gēnu ekspresiju, kā arī samazina aterosklerotisko bojājumu attīstību. Bez tam, rezultāti ļauj secināt, ka nepieciešama 14 dienu mildronāta terapija, lai attīstītos statistiski ticams mildronāta kardioprotektīvais efekts, kas nezūd uz 2. tipa diabēta fona. Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, varam secināt, ka mildronāta lietošana 2. tipa cukura diabēta pacientiem ar citām kardiovaskulārajām slimībām varētu mazināt ar 2. tipa diabēta saistīto kardiovaskulāro slimību attīstību.

Atslēgvārdi: mildronāts, karnitīns, GBB, 2. tipa cukura diabēts, ateroskleroze, išēmija-reperfūzija, metabolā terapija.

Abstract

Type 2 diabetes mellitus is a metabolic disease that is associated with impaired glucose and lipid metabolism. Patients with type 2 diabetes are at elevated risk for a number of serious health problems, including, cardiovascular diseases. In clinical studies it has been shown that the incidence of many of these outcomes is directly associated with the degree of hyperglycemia and reduction of blood glucose level decrease incidence of cardiovascular events.

Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, exerts cardioprotective action through inhibition of fatty acid oxidation. However, its influence on glucose oxidation and pathways of cellular energy metabolism has not been studied before in details. We investigated effect of mildronate treatment on glucose metabolism in healthy animals and on development of diabetes in experimental model of type 2 diabetes mellitus - Goto-Kakizaki (G-K) rats. Since type 2 diabetes patients have increased risk of atherosclerosis and acute myocardial infarction, we also investigated the influence of mildronate administration on development of atherosclerosis in experimental model of atherosclerosis and dynamics of onset of cardioprotective effect.

During the investigations of mildronate effects on glucose metabolism in healthy animals we found for the first time that mildronate three week treatment decreased blood glucose level at fasted state and increased insulin stimulated glucose uptake in isolated mouse heart *in vitro*. Increased glucose uptake could be explained by elevated expression of GLUT-4, insulin receptor and pyruvate dehydrogenase complex enzymes. In G-K rats mildronate treatment decreased blood glucose level in fasted and fed state, reduced sensitivity of aortic rings to phenylephrine and decreased size of necrosis zone in experimental model of heart infarction *in vitro*. Moreover, mildronate administration reduced the severity of neuropathic complications in G-K rats. Mildronate treatment reduced formation of atherosclerotic lesions in aortas of apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout (apoE/LDLR^{-/-}) mice. We suggest that antiatherosclerotic mechanism of mildronate could involve inhibition of production of superoxide anion in aorta and stimulation of endothelial NO synthesis. Mildronate administration for 28 days decreased concentration of carnitine and increased concentration of GBB in both, plasma and heart. Plateau concentrations of GBB and carnitine were reached on the 14th day of mildronate treatment. In experimental model of heart infarction *in vitro*, we showed that statistically significant decrease of necrosis zone was observed only after 14 days of mildronate treatment and correlations between the size of necrosis zone and GBB as well mildronate concentration in plasma were found.

In conclusion, obtained results for the first time give evidence that mildronate regulates glucose metabolism and related gene expression, possesses antiatherosclerotic effect. In addition, we found that at least 14-day mildronate treatment is needed for achievement of anti-infarction effect that is also present in experimental model of type 2 diabetes. These findings indicate that the mildronate treatment could be beneficial in diabetes patients with other cardiovascular diseases.

Keywords: mildronate, carnitine, GBB, type 2 diabetes, atherosclerosis, ischemia-reperfusion, metabolic therapy

Saturs

PATEICĪBAS	3
ANOTĀCIJA	4
ABSTRACT	5
SATURS	6
IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI	9
DARBA STRUKTŪRA UN APJOMS	11
ZINĀTNISKĀ DARBA APROBĀCIJA	11
IEVADS.....	12
DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI.....	14
LITERATŪRAS APSKATS.....	15
MILDRONĀTS UN TĀ DARBĪBAS MEHĀNISMI	15
SIRDS ENERĢIJAS METABOLISMS	16
<i>Sirds enerģijas metabolisms normālos apstākļos</i>	<i>16</i>
<i>Ogļhidrātu metabolisms miokardā</i>	<i>17</i>
<i>Lipīdu metabolisms miokardā.....</i>	<i>18</i>
<i>Karnitīns un tā loma sirds enerģijas metabolismā</i>	<i>20</i>
<i>Miokarda enerģijas substrātu metabolisma regulācija</i>	<i>21</i>
<i>Sirds enerģijas metabolisms išēmijas un reperfūzijas apstākļos</i>	<i>22</i>
ENERĢIJAS METABOLISMA REGULĀCIJAS IESPĒJAS.....	24
<i>Sirds išēmijas gadījumā.....</i>	<i>24</i>
<i>Metabolā terapija diabēta gadījumā</i>	<i>27</i>
<i>Metabolā terapija aterosklerozes gadījumā</i>	<i>30</i>
PĒTĪJUMU EKSPERIMENTĀLIE MODEĻI	31
<i>Apolipoproteīna E „nokaut” (ApoE^{-/-}) peles</i>	<i>31</i>
<i>Apolipoproteīna E un zema blīvuma lipoproteīnu receptoru „dubultnokaut” (ApoE/LDLR^{-/-}) peles</i>	<i>32</i>
<i>Goto-Kakizaki (G-K) žurkas</i>	<i>33</i>
MATERIĀLI UN METODEDES.....	34
REAĢENTI	34
DZĪVNIEKI	34

MILDRONĀTA IEVADĪŠANA	35
IZMANTOTĀS METODEDES	37
<i>RNS izolēšana un kvantitatīva RT-PCR analīze</i>	37
<i>Sirds homogenātu pagatavošana</i>	38
<i>Proteīnu daudzuma kvantificēšana ar poliakrilamīda gēlu un „Western blot” analīzi</i>	38
<i>Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana</i>	39
<i>Asins bioķīmisko parametru analīze</i>	39
<i>Perorālais glikozes tolerances tests</i>	40
<i>NOHb daudzuma noteikšana asinīs</i>	40
<i>Superoksīda anjona noteikšana aortā</i>	40
<i>Aterosklerotiskā aplikuma daudzuma noteikšana aortā</i>	40
<i>Aterosklerotiskā aplikuma laukuma noteikšana aortas saknē</i>	41
<i>Asinsvadu reaktivitātes pētījumi izolētā aortā</i>	42
<i>Glikozes uzņemšana izolētā sirds modelī</i>	42
<i>Eksperimentālais miokarda infarkts in vitro</i>	43
<i>Invazīvie asinsspiediena mērījumi</i>	43
<i>”Tail-flick” tests</i>	43
<i>”Hot plate” tests</i>	44
DATU APSTRĀDE	44
REZULTĀTI	45
MILDRONĀTA IETEKME UZ GLIKOZES METABOLISMU	45
<i>Glikozes, insulīna, C-peptīda, lipīdu profila, karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija</i> <i>asins plazmā</i>	45
<i>Karnitīna, GBB un mildronāta saturs peļu sirds audos un plazmā</i>	46
<i>Glikozes uzņemšana izolētā peles sirdī</i>	47
<i>Ietekme uz mRNS transkripciju</i>	48
<i>Ietekme uz proteīnu ekspresiju</i>	49
MILDRONĀTA IETEKME UZ DIABĒTA ATTĪSTĪBU G-K ŽURKĀS.....	51
MILDRONĀTA IETEKME UZ ATEROSKLEROZES ATTĪSTĪBU	60
<i>Mildronāta ietekme uz aterosklerotisko pangu daudzumu apoE/LDLR^{-/-} peļu aortās</i>	60
<i>Mildronāta ietekme uz aterosklerotiskā aplikuma laukumu aortas saknē</i>	61
<i>Mildronāta lietošanas ietekme uz lipīdu homeostāzes marķiermolekulām</i>	62
<i>Mildronāta, GBB un karnitīna saturs sirds audos</i>	63
<i>Mildronāta ietekme uz superoksīda anjona producēšanos aortas sienīņā un NOHb</i> <i>koncentrāciju apoE^{-/-} peļu asinīs</i>	64
<i>Mildronāta lietošanas ietekme uz GBB un karnitīna koncentrāciju žurku aortas audos</i>	65

MILDRONĀTA IETEKME UZ GBB UN KARNITĪNA KONCENTRĀCIJU IZMAIŅĀM UN TO SAISTĪBA AR KARDIOPROTEKTĪVO EFEKTU	66
<i>Ietekme uz GBB un karnitīna koncentrācijām žurku plazmā un sirds audos.</i>	66
<i>Mildronāta kardioprotektīvā darbības attīstības dinamika</i>	68
DISKUSIJA	71
MILDRONĀTA IETEKME UZ GLIKOZES METABOLISMU	71
MILDRONĀTA IETEKME UZ DIABĒTA ATTĪSTĪBU G-K ŽURKĀS	73
MILDRONĀTA IETEKME UZ ATEROSKLEROZES ATTĪSTĪBU	75
MILDRONĀTA IETEKME UZ GBB UN KARNITĪNA KONCENTRĀCIJU IZMAIŅĀM UN TO SAISTĪBA AR KARDIOPROTEKTĪVO EFEKTU	77
MILDRONĀTA IZMANTOŠANAS JAUNĀS IESPĒJAS KLĪNIKĀ	79
SECINĀJUMI	81
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	82

Izmantotie saīsinājumi

ACC	Acetil-CoA karboksilāze
Acetil-CoA	Acetil-koenzīms A
Acil-CoA	Acil-koenzīms A
ADP	Adenozīna difosfāts
AMI	Akūts miokarda infarkts
AMP	Adenozīnmonofosfāts
AMPK	Adenozīnmonofosfāta aktivētā proteīnu kināze
ApoE	Apolipoproteīns E
ApoE ^{-/-} pele	Apolipoproteīna E „nokaut” pele
ApoE/LDL ^{-/-} pele	Apolipoproteīna E un zema blīvuma lipoproteīnu receptora „dubultnokaut” pele
ATP	Adenozīna trifosfāts
BSA	Vērša seruma albumīns
CoA	Koenzīms A
CrP	Kreatīna fosfāts
CPT-1	Karnitīna palmitoiltransferāze-1
CPT-2	Karnitīna palmitoiltransferāze-2
DHA	Dihloracetāts
DHE	Dihidroetiādijs
2-DOG	2-dezoksiglikoze
eNOS	Endoteliālā slāpekļa sintāze
EDTA	Etilēndiaminotetraetiķskābes dinātrijs sāls
FADH ₂	Flavīn-adenīndinukleotīda reducētā forma
FFK-I	Fosfofruktokināze I
FFK-II	Fosfofruktokināze II
G-K žurka	Goto-Kakizaki žurka
GBB	γ-butirobetaīns
GIK	Glikoze, insulīns un kālija hlorīds
GLUT-1	Glikozes transportmolekula 1
GLUT-4	Glikozes transportmolekula 4
GTP	Guanozīna trifosfāts
HDL	Augsta blīvuma lipoproteīni
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinētānesulfonskābe
HK I	Heksokināze I
HK II	Heksokināze II
i.p.	Intraperitoneāli
INSR	Insulīna receptors
K-H buferšķīdums	Krebsa-Henseleita buferšķīdums
LAD artērija	Kreisā priekšējā lejupejošā artērija
LDL	Zema blīvuma lipoproteīni
LVP	Kreisā kambara saraušanās spēks
LXR	Aknu X receptors
Malonil-CoA	Malonil-koenzīms A

NADH ⁺	Nikotīn-adenīdinukleotīda reducētā formā
NO	Slāpekļa oksīds
NOHb	Nitrozilhēmoglobīns
ORO	Oil-Red O
p.o.	Perorāli
PDH komplekss	Piruvāta dehidrogenāzes komplekss
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorīds
PPAR	Peroksisomu proliferāciju aktivējošais receptors
SDS	Nātrija dodecilsulfāts
SERCA-2	Sarkoplazmatiskā retikuluma Ca ²⁺ -ATPāze
TFT	2.3.5-trifeniltetrazolija hlorīds
Tris	Trishidroksimetilaminometāns
VLDL	Ļoti zema blīvuma lipoproteīni

Darba struktūra un apjoms

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, tā apjoms ir 92 lappuses. Darbs satur 6 tabulas un 25 attēlus. Literatūras saraksts sastāv no 179 atsaucēm.

Zinātniskā darba aprobācija

Promocijas darba rezultāti apkopoti 4 publikācijās, vienā patentā , kā arī 9 referātu un/vai stenda referātu viedā.

Ievads

Otrā tipa diabēts ir slimība, kam raksturīgi glikozes un lipīdu metabolisma traucējumi. Aprēķināts, ka diabēts ir vairāk nekā 150 miljoniem cilvēku pasaulē un no tiem vairāk nekā 90% sastāda 2. tipa cukura diabēts. Tiek prognozēts, ka līdz 2025. gadam 2. tipa diabēta pacientu pieaugums būs līdz pat 380 miljoniem, kas galvenokārt saistīts ar progresīvāku diagnostikas metožu attīstību, kā arī pieaugošo neveselīgā dzīves veida piekropšanu.

Pacientiem ar 2. tipa diabētu ir paaugstināts daudzu slimību, tajā skaitā kardiovaskulāro, attīstības risks. Pētījumi pierādījuši, ka 2. tipa diabēta pacientiem ateroskleroze attīstās distālajos koronārajos asinsvados un šis process norit daudz ātrāk nekā pacientiem bez diabēta, jo paaugstinātā glikozes koncentrācija asinīs ir izmainījusi asinsvadu endotēlija šūnu spēju aizkavēt imunokompetento šūnu migrāciju asinsvada sienīnā, kas, savukārt, veicina asinsvadu iekaisuma attīstību ar sekojošu aterosklerotisko bojājumu veidošanos asinsvados. Aterosklerotiskie asinsvadu bojājumi samazina koronāro artēriju lumenu un var izsaukt sirds išēmisko slimību, stenokardiju vai akūtu miokarda infarktu (AMI). Bez tam 2. tipa cukura diabētam ir raksturīga paaugstināta brīvo taukskābju koncentrācija asinīs, kas savukārt veicina to oksidāciju miokardā, bet, kā secināts daudzos pētījumos, tad paaugstināts taukskābju metabolisms išēmijas laikā veicina plašāku bojājumu attīstību. Klīnikā konstatēts, ka diabēta komplikāciju un citu patoloģiju attīstība ir saistīta ar hiperglikēmijas līmeni asinīs un glikozes koncentrācijas samazināšana veicina kardiovaskulāro komplikāciju un slimību attīstības samazināšanos. Diabēta terapija parasti tiek balstīta uz asins glikozes līmeņa samazināšanu, ko var panākt stimulējot insulīna sekrēciju no Langerhansa saliņām (sulfonilurīnvielas atvasinājumi) vai veicinot glikozes transportu šūnā (biguanidīna atvasinājumi). Pēdējā laikā arvien populārākas kļūst zāļu vielas, kas, ietekmējot šūnas metabolismu, izsauc izmaiņas enzīmu ekspresijā, kas tieši iesaistīti lipīdu un ogļhidrātu metabolismā. Pie šīs grupas zāļu vielām pieskaita peroksisomu proliferāciju aktivējošo receptoru (PPAR) un aknu X receptoru (LXR) agonistus. Šo vielu ievadīšana veicina taukskābju koncentrācijas samazināšanos asinīs, jo intensificē taukskābju β -oksidāciju muskuļos vai tauku uzkrājumu veidošanos adipocītos un insulīna jutības paaugstināšanos, kas savukārt veicina glikozes asins

koncentrācijas samazināšanos. Pierādīts, ka LXR agonisti ne tikai palielina organisma jutību pret insulīnu un pazemina asins glikozes koncentrāciju, bet arī, regulējot holesterīna metabolismu, samazina aterosklerozes attīstību.

Nereti enerģijas metabolisma regulatori tiek lietoti, lai mazinātu išēmijas reperfūzijas izsauktos bojājumus sirdī. Klīnikā tiek lietoti preparāti (trimetazīns un ranolazīns), kas, miokardā inhibējot β -oksidāciju un veicinot glikozes metabolismu, aizsargā miokardu pret išēmijas-reperfūzijas izraisītajiem bojājumiem. Līdzīgi arī mildronāts inhibē taukskābju β -oksidāciju, tomēr ir maz eksperimentālu pierādījumu par mildronāta ietekmi uz glikozes metabolismu.

Mildronāts ir karnitīna biosintēzes inhibitors, kas, samazinot taukskābju oksidāciju, aizsargā miokardu išēmijas-reperfūzijas laikā. Kaut gan ir zināmi mildronāta efekti uz taukskābju metabolismu, tomēr nav pētīta mildronāta lietošanas ietekme uz glikozes metabolismu. Mēs pētījām mildronāta ietekmi uz glikozes metabolismu veselos dzīvniekos, kā arī mildronāta ietekmi uz diabēta attīstību eksperimentālajā 2. tipa diabēta modelī – Goto-Kakizaki (G-K) žurkās. Tā kā 2. tipa diabēta pacientiem ir paaugstināts aterosklerozes un miokarda infarkta attīstības risks, mēs arī pētījām mildronāta ietekmi uz aterosklerozes attīstību un mildronāta kardioprotektīvā efekta attīstības dinamiku.

Darba mērķis un uzdevumi

Darba mērķis: noskaidrot mildronāta lietošanas ietekmi uz glikozes metabolismu un diabēta attīstību, kā arī izpētīt tā lietošanas ietekmi uz biežāk sastopamajām ar diabētu saistītajām kardiovaskulārajām slimībām (aterosklerozi un miokarda infarktu).

Darba uzdevumi:

1. Izpētīt mildronāta akūtas un hroniskas lietošanas ietekmi uz glikozes metabolismu ICR pelēs.
2. Noskaidrot mildronāta lietošanas ietekmi uz diabēta attīstību eksperimentālajā 2. tipa cukura diabēta modelī – G-K līnijas žurkās.
3. Izpētīt mildronāta lietošanas ietekmi uz aterosklerozes attīstību eksperimentālajā aterosklerozes modelī – apoE/LDLR^{-/-} pelēs un noskaidrot iespējamus mildronāta antiaterosklerotiskos darbības mehānismus.
4. Noskaidrot mildronāta kardioprotektīvā efekta attīstības dinamiku eksperimentālajā sirds infarkta modelī *in vitro* un noskaidrot tā saistību ar karnitīna un GBB koncentrāciju izmaiņām plazmā un sirds audos.

Literatūras apskats

Mildronāts un tā darbības mehānismi

Mildronāts, (3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)propionāts), pirmo reizi tika sintezēts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā pirms vairāk kā 20 gadiem (Eremeev et al., 1984, US patent 4481218). Klīnikā mildronāts tiek lietots kā kardioprotektīvs un antiišēmisks līdzeklis (Sjakste and Kalvinsh, 2006). Mildronāta kardioprotektīvais darbības mehānisms pamatojas uz taukskābju metabolisma inhibēšanu, kas, domājams, izraisa miokarda pārslēgšanos uz glikozes metabolismu, kam išēmijas laikā nepieciešms mazāk skābekļa ATP producēšanai (Dambrova et al., 2004). Pētījumos parādīts, ka mildronāts paaugstina glikozes oksidācijas ātrumu hipoksijas apstākļos izolētā žurkas sirdī (Asaka et al., 1998). Tāpat konstatēts, ka mildronāta ietekmē samazinās laktāta koncentrācija, kā arī acetil-CoA/CoA daudzumu attiecība un paaugstinās ATF saturs žurku audos pēc kreisās koronārās artērijas nosiešanas (Hayashi et al., 2000b; Kirimoto et al., 1996). Mildronāts inhibē taukskābju oksidāciju (Simkhovich et al., 1988), jo samazina karnitīna koncentrāciju šūnā un tāpēc karnitīna palmitoiltransferāze-1 (CPT-1) vairs nespēj aktivēt pietiekami daudz taukskābju β -oksidācijai. Mildronāts samazina karnitīna koncentrāciju, inhibējot γ -butirotbetaīna (GBB) hidroksilāzi, enzīmu, kas aknās, nierēs un sēklinieka piedēklī, hidroksilējot karnitīna priekšteci GBB, veic karnitīna sintēzi (Simkhovich et al., 1988). Pierādīts, ka mildronāts ir GBB hidroksilāzes konkurējošais inhibitors (Spaniol et al., 2001). Karnitīna sintēzes inhibīcija izraisa tā koncentrācijas samazināšanos gan asins plazmā, gan pārējos audos (Hayashi et al., 2000c; Kuwajima et al., 1999; Tsoko et al., 1995; Dhar et al., 1996); paralēli karnitīna koncentrācijas samazinājumam, tika konstatēta GBB koncentrācijas palielināšanās (Akahira et al., 1997). Savukārt vēlākie pētījumi parādīja, ka mildronāts, ne tikai inhibē karnitīna sintēzi, bet arī traucē tā reabsorbciju nieru kanāliņos (Kuwajima et al., 1999), kas vēl vairāk samazina karnitīna daudzumu organismā. Karnitīna koncentrācija audos var būt līdz pat 60 reizēm augstāka nekā plazmā; augsto koncentrāciju starpību nodrošina transportmolekulas, kas veic karnitīna pārnesanu no plazmas uz intracelulāro telpu (Lango et al., 2001). Pierādīts, ka mildronāts kavē arī karnitīna transportu peļu muskuļu šūnās pēc nekonkurentā

mehānisma (Georges et al., 2000). Šī pētnieku grupa arī konstatējusi mildronāta iedarbību gan uz augstas, gan zemas aktivitātes transporta proteīniem. Līdzīgi rezultāti iegūti arī pētījumā, kas veikts ar žurku miocītu un fibroblastu šūnām (Ku wajima et al., 1999). Grube et al., savos pētījumos parādīja, ka mildronāts varētu inhibēt karnitīna iekļūšanu šūnā tieši caur OCTN2 transportmolekulu (Grube et al., 2006). Pavisam nesen tika atklāts, ka mildronāts inhibē mitohondriālās karnitīna/acilkarnitīna transportmolekulas darbību. Šis enzīms nodrošina acilkarnitīnu iekļūšanu mitohondrijā, savukārt tā darbības inhibēšana arī varētu inhibēt taukskābju iekļūšanu mitohondrijā un tālāku oksidāciju (Oppedisano et al., 2008).

Ekperimentālajos sirds mazspējas modeļos pierādīts, ka mildronāts samazina letalitāti, kas radusies sirds mazspējas komplikāciju dēļ un novērš kreisā kambara „*remodelingu*” (Hayashi et al., 2000a). Mehānisms, kas nodrošina pozitīvos efektus tiek skaidrots ar mildronāta terapijas rezultātā palielinājušos heksokināzes I (HK I) aktivitāti žurku sirds audos (Yonekura et al., 2000). Tā kā HK I ir viens no ātrumu noteicošiem enzīmiem glikolīzes procesā, tad fermenta aktivēšana un ekspresija nodrošina paātrinātu glikozes izmantošanu ATF ražošanai. Interesanti, ka mildronāts palielina arī sarkoplazmatiskā retikuluma Ca^{2+} -ATPāzes (SERCA-2) koncentrāciju un aktivitāti (Yonekura et al., 2000), aktivējot kalcija atpakaļuzsūkšanās procesus sirds sarkoplazmatiskajā retikulumā diastoles laikā (Hayashi et al., 2000a).

Sirds enerģijas metabolisms

Sirds enerģijas metabolisms normālos apstākļos

Lai nodrošinātu normālu funkcionēšanu, sirds enerģijas iegūšanai izmanto dažādus enerģijas substrātus: brīvās taukskābes, ogļhidrātus, aminoskābes un ketonvielas (Kantor et al., 2000), tomēr normoksijas apstākļos lielākā daļa (60–90%) enerģijas tiek iegūta taukskābju oksidācijas rezultātā, pārējie 10–40% tiek iegūti oksidējot glikozi vai glikolīzes produktus – piruvātu vai laktātu. Sirds enerģijas avoti var mainīties dažādu faktoru ietekmē, ko nosaka atbilstošā enerģijas avota pieejamība, vecums, dažādas patoloģijas un nepieciešamais enerģijas daudzums (Sambandam and Lopaschuk, 2003). Piemēram, embrija un jaundzimušā sirdī kā galvenie enerģijas avoti tiek izmantoti glikoze un laktāts (Lopaschuk et al., 1992). Pierādīts arī, ka aktīvas fiziskās slodzes laikā

palielinās no glikozes iegūtā ATP īpatsvars miokardā (Young et al., 1999). Badošanās laikā asinīs palielinās ketonvielu un laktāta koncentrācija, tāpēc šinī periodā lielāko daļu ATP kardiomiocīti sintezē no ketonvielām un laktāta (Jeffrey et al., 1995).

Metabolisma procesā dehidrogenāzes, kas iesaistītas taukskābju β -oksidācijā, glikolīzē, piruvāta oksidācijā un Krebsa ciklā, veic NAD un FAD reducēšanu par to reducētajām formām (NADH^+ un FADH_2). FADH_2 un NADH^+ nogādā elektronus elpošanas ķēdes kompleksiem, kas atrodas uz mitohondrija iekšējās membrānas. Elektrona pārnese izsauc protona izspiešanu no mitohondriālās matricas, skābekļa saistīšanu un ATP sintēzi no ADP un neorganiskā fosfāta oksidatīvās fosforilācijas rezultātā. Tādā veidā notiek enerģijas pārnese no taukskābju, glikozes un laktāta oksidācijas uz elpošanās ķēdi, kur tiek piesaistīts skābeklis un oksidatīvās fosforilācijas rezultātā veidojas ATP (Stanley 2004). Oksidatīvās fosforilācijas rezultātā normāla sirds enerģijas metabolisma apstākļos tiek iegūta lielākā daļa (95%) šūnas ATP, atlikušie 5% tiek iegūti no glikolīzes un GTP no citronskābes cikla. Sirds audos ir samērā zema ATP koncentrācija ($5 \mu\text{mol/g}$ masas) un liels tā hidrolīzes ātrums ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{g} \text{masas}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), tādā veidā sirds ATP, ja tas netiktu visu laiku resintezēts, izsīktu 10 sekunžu laikā (Stanley et al., 2005). Lielākā daļa (60–70%) ATP sirdij nepieciešami sirds kontrakciju nodrošināšanai, bet atlikušie 30–40% tiek izmantoti galvenokārt jonu sūkņu un SERCA-2 darbības nodrošināšanai, kas nodrošina Ca^{2+} transportu atpakaļ sarkoplazmatiskajā retikulumā sirds diastoles laikā (Gibbs 1978, Suga 2003). Veselā sirdī oksidatīvās fosforilēšanas ātrums tiek saskaņots ar ATP hidrolīzes ātrumu, kas nodrošina nemainīgu ATP koncentrāciju gan fiziskas aktivitātes un kateholamīnu iedarbības, gan atpūtas laikā (Balaban et al., 1986; Heineman and Balaban, 1990).

Ogļhidrātu metabolisms miokardā

Veselā miokardā ogļhidrātu oksidācija (glikozes un laktāta) nodrošina vidēji 10–40% no nepieciešamā ATP daudzuma (Stanley et al., 1997). Kardiomiocīti aktīvi ekspresē glikozes transportmolekulas (GLUT-1 un GLUT-4), kas nodrošina augstu glikozes uzņemšanas spēju no ekstracelulārās telpas (Stanley et al., 1997; Young et al., 1999). GLUT-1 dominē miokardā līdz dzimšanai, bet pēc piedzimšanas tā ekspresija samazinās. Gluži pretēji norit GLUT-4 ekspresija (Santalucia et al., 1992), kura palielinās pēc dzemdībām un ir galvenā glikozes transportmolekula pieauguša cilvēka miokardā un

parasti GLUT-4/GLUT-1 ekspresijas attiecība ir 3/1 (Santalucia et al., 1999). GLUT-1 ir insulīn-neatkarīgā glikozes transportmolekula, kas nodrošina bazālo glikozes uzņemšanu. Savukārt GLUT-4 ir insulīn-atkarīgā transportmolekula, kuras ekspresija ir atkarīga no dažādiem faktoriem, piemēram, GLUT-4 ekspresiju var pastiprināt insulīna stimulācija, AMP aktivētā proteīnu kināze (AMPK) aktivācija, liela slodze vai išēmija (Russell et al., 1999; Young et al., 1997; Young et al., 2001). Glikozei nonākot šūnā, to aktivizē enzīms heksokināze I (HK I), sintezējot no glikozes tās aktivēto formu – glikozes-6-fosfātu, šī reakcija kardiomiocītos ir neatgriezeniska, jo tie neeskpresē glikozes-6-fosfatāzi (de Jong and Hülsmann 1970). Tālāk glikozes 6-fosfāts var iesaistīties trīs dažādos metabolisma ceļos: glikolīzē, ribozes ceļā vai arī glikogēna sintēzē. Glikogēna koncentrācija sirdī ir samērā zema (30 $\mu\text{mol/g}$), salīdzinot ar citiem muskuļiem, kuros glikogēna koncentrācija vidēji sastāda $\sim 150 \mu\text{mol/g}$ (Botker et al., 1994). Sirds glikogēna koncentrācija var palielināties substrāta koncentrācijas palielināšanās vai hiperinsulinēmijas gadījumā (Laughlin et al., 1992). Glikogēna uzkrājumi tiek izmantoti adrenerģiskās stimulācijas, ATP koncentrācijas samazināšanās, išēmijas vai intensīvas fiziskās slodzes gadījumā (Goodwin and Taegtmeier 2000; Stanley et al., 1992). Glikolīzes rezultātā no glikozes 6-fosfāta un NAD veidojas divas ATP un divas piruvāta molekulas un viena NADH^+ molekula. Tālāk piruvāts un NADH^+ tiek transportēti uz mitohondrijiem, kur notiek ATP sintēze, vai piruvāts var tikt reducēts par laktātu un NAD (Giordano 2005). Laktātu vesels miokards aktīvi uzņem no ekstracelulārās telpas (Kajiser and Berglund 1992). Oksidatīvā glikolīze un laktāta oksidācija nodrošina piruvāta producēšanos citosolā; normālos apstākļos no abiem iepriekšminētajiem ceļiem tiek iegūts vienāds piruvāta daudzums (Stanley et al., 1997). Tālāku piruvāta oksidāciju veic mitohondrijos esošais piruvāta dehidrogenāzes (PDH) komplekss. Piruvāta oksidācijas rezultātā veidojas acetil-CoA, NADH^+ un CO_2 . Iegūtais acetil-CoA iesaistās Krebsa ciklā, bet NADH^+ tiek iesaistīts elpošanas ķēdē.

Lipīdu metabolisms miokardā

Miokards kā taukskābju avotu galvenokārt izmanto plazmas brīvās taukskābes, kas tiek transportētas asins plūsmā, saistījušās pie plazmas albumīniem. Tās nodrošina vidēji no 75–80% no miokardam nepieciešamā lipīdu daudzuma, atlikušo taukskābju daļu miokards iegūst no lipoproteīnu triglicerīdu hidrolīzes (Kodde et al., 2007). Brīvo

tauskābju koncentrācija asins plazmā parasti ir robežās no 0.2–0.8 mM, bet to koncentrācija var palielināties badošanās laikā, bet pēc ēšanas, kad ir augsta insulīna koncentrācija, brīvo taukskābju koncentrācija samazinās (Lopaschuk et al., 1994a). Paaugstinātu brīvo taukskābju koncentrāciju var novērot pēc akūta miokarda infarkta un sirds ķirurģijas (Lopaschuk et al., 1994b), kā arī pēc noradrenālīna ievadīšanas (Fraser et al., 2003). Brīvo taukskābju uzņemšana sirdī pastiprinās fiziskās slodzes gadījumā, bet tiek nomākta hiperglikēmijas vai hiperinsulinēmijas gadījumā (Pilz and März 2008). Brīvās taukskābes kardiomiocītos nonāk caur speciālām transportmolekulām vai pasīvās difūzijas veidā (Bonen et al., 2007; Kampf et al., 2007). Nonākot šūnā, taukskābes tiek aktivētas, veidojot attiecīgos taukskābju acil-CoA; pierādīts, ka brīvo taukskābju aktivācija var notikt jau to transportēšanas brīdī caur plazmatisko membrānu, jo taukskābes aktivējošais enzīms ir saistīts ar transportproteīnu (Schaffer 2002). Aktivētās taukskābes tālāk var tikt esterificētas triglicerīdos, veidojot šūnas triglicerīdu uzkrājumus vai CPT-1 ietekmē tās var tikt konjugētas ar karnitīnu, veidojot attiecīgās taukskābes acilkarnitīnu. Pētījumos pierādīts, ka, ievadot [¹⁴C] vai [³H] oleātu vai palmitātu veselu cilvēku, pacientu ar koronāro slimību un lielo dzīvnieku sirds koronārajā asinsplūsmā, 70 – 90% no tām momentāni tiek metabolizētas un izdalās venozajā asinsplūsmā kā ¹⁴CO₂ vai ³H₂O (Chandler et al., 2003; Chavez et al., 2003; Wisneski et al., 1987). Tas pierāda, ka 70–90% no uzņemtajām taukskābēm tiek konjugētas ar karnitīnu un oksidētas, bet pārējie 10–30% no uzņemtajām taukskābēm tiek konjugētas ar glicerīnu veidojot triacilglicerolus (Saddik and Lopaschuk 1992), kas nepieciešamības gadījumā īslaicīgi var kompensēt taukskābju uzņemšanas traucējumus (Van der Vusse et al., 2002).

Taukskābju β-oksidācija galvenokārt norit midrohondrijos un neliela taukskābju daļa tiek metabolizēta peroksisomās (Asayama et al., 1999). Taukskābju oksidācijas produkti ir NADH⁺, FADH₂ un acetil-CoA. Acetil-CoA tālāk tiek iesaistīts un metabolizēts Krebsa ciklā. Tā kā garo ķēžu taukskābju acil-CoA nav spējīgs, iekļūt mitohondrijā, tad tas tiek attiecīgi konjugēts ar karnitīnu veidojot attiecīgo acilkarnitīnu. Šo reakciju veic mitohondrija ārējā membrānā lokalizēts enzīms CPT-1. Pēcāk acilkarnitīnu karnitīna aciltranslokāze transportē mitohondrijā, vienlaicīgi iznesot ārā no mitohondrija vienu molekulu karnitīna. Visbeidzot karnitīna palmitoiltransferāze-2 (CPT-

2) acilkarnitīnu, atšķeļot karnitīnu un konjugējot ar CoA, sintezē acil-CoA, kas tālāk tiek iesaistīts β -oksidācijā (Kodde et al., 2007).

Karnitīns un tā loma sirds enerģijas metabolismā

Karnitīnu vairāk kā pirms 100 gadiem atklāja R. Krimbergs, kopā ar kolēģiem no muskuļiem izolējot vielu – L- β -hidroksi- γ -N-trimetilaminosviestskābi (Gulewitsch and Krimberg 1905). Vārds “*karnitīns*” ir atvasināts no *caro* jeb *carnis*, kas latīņu valodā nozīmē gaļa. Karnitīna ķīmiskā struktūra tika atklāta pēc 22 gadiem (Tomita and Sendju 1927).

Karnitīnu sintezē γ -butirobetaīna hidroksilāze, hidroksilējot karnitīna priekšteci GBB. Šī sintēze notiek aknās, nierēs un sēklinieka piedēklī, kā arī karnitīns tiek uzņemts ar pārtiku, galvenokārt gaļas produktiem (Hoppel 2003). Cilvēka organisms vidēji satur 16 g karnitīna, no kuriem lielākā daļa (~98%) lokalizēta skeleta muskuļos un sirdī. Kopējā karnitīna plazmas koncentrācija parasti ir robežās no 42–85 μ M, bet brīvā karnitīna – no 35–70 μ M. Savukārt karnitīna koncentrācija miokardā ir vidēji 4.2 μ mol/g, kas ir trīs reizes vairāk kā skeleta muskuļos. Karnitīna transportu no plazmas uz kardiomiocītu šūnām nodrošina transportmolekulas (Lango et al., 2001). Karnitīns glomerulārās filtrācijas procesā tiek atfiltrēts no asinīm, tomēr vairāk kā 95% karnitīna tiek reabsorbēti nieru kanāliņos (Hoppel 2003).

Karnitīna galvenā loma organismā ir nodrošināt garo ķēžu taukskābju transportu caur mitohondriju dubultmembrānu. Garo ķēžu taukskābju transportu nodrošina karnitīna paltmitoil transferāžu komplekss. Pirmais enzīms šajā kompleksā ir mitohondrija ārējā membrānā lokalizētais CPT-1, kas atšķeļ CoA no acil-CoA un konjugē taukskābes atlikumu pie karnitīna hidroksilgrupas. Nākošais šī kompleksa enzīms (acilkarnitīna translokāze) transportē acilkarnitīnu caur mitohondrija membrānu, vienlaicīgi no mitohondrija iznesot vienu molekulu karnitīna. Atšķeļot karnitīnu un konjugējot to atkal ar CoA, β -oksidācijai taukskābes aktivē trešais šī kompleksa enzīms (CPT-2), kas ir lokalizēts mitohondrija iekšējā membrānā (Kodde et al., 2007).

Ir atrasts, ka karnitīns un acetilkarnitīns nelielās devās, stimulējot taukskābju metabolismu mitohondrijos, aizkavē brīvo taukskābju, kā arī acil-CoA uzkrāšanos (Lango et al., 2001). Savukārt lielās devās L-karnitīns veicina glikozes oksidēšanu (Broderick et al., 1992; Ferrari et al., 2004). Karnitīns regulē kā garķēžu taukskābju

transportu mitohondrijos, tā arī samazina acetil-CoA/CoA attiecību un līdz ar to palielina PDH kompleksa aktivitāti (Broderick et al., 1992; Ferrari et al., 2004). Bez tam lielā koncentrācijā karnitīns kavē taukskābju aktivēšanu mitohondrijos – acilkarnitīna pārvēršanu par acil-CoA, kā rezultātā tiek kavēts, nevis veicināts taukskābju metabolisms (Broderick et al., 1995). Tas nozīmē, ka karnitīnam ir būtiska loma ne tikai garķēžu taukskābju oksidācijā, bet arī tā kavēšanā un ogļhidrātu metabolisma veicināšanā. Tādējādi karnitīna koncentrācijas izmaiņas ļauj tieši modulēt enerģijas iegūšanas procesus audos, ietekmējot taukskābju un glikozes īpatsvaru ATF sintēzes nodrošināšanā. Tomēr jāsaprot, ka ne tikai karnitīns regulē miokarda enerģijas metabolismu un ir aprakstīti daudz citu mehānismu, kas nodrošina līdzsvaru starp lipīdu un glikozes metabolismu miokardā.

Miokarda enerģijas substrātu metabolisma regulācija

Sirds izmanto vairākus enerģijas substrātus un tie var mainīties atkarībā no sirds veiktā darba, fizioloģiskā stāvokļa vai dažādu hormonu ietekmē, piemēram, insulīna. Enerģijas substrāta metabolisms tiek regulēts, aktivējot vai inhibējot attiecīgajam metabolisma ceļam nepieciešamos enzīmus vai transportmolekulas. Parasti šo metabolismam nepieciešamo enzīmu inhibīciju vai aktivāciju nodrošina tā paša vai cita metabolisma ceļa produkti vai substrāti (Kodde et al., 2007). Pierādīts, ka pastāv līdzsvars starp glikozes un taukskābju metabolismu, respektīvi, aktīva taukskābju oksidācija nomāc glikozes un laktāta uzņemšanu šūnā un to metabolismu, savukārt glikozes metabolisma pastiprināšanās nomāc taukskābju oksidāciju (Calvani et al., 2000).

Malonil-CoA ir nozīmīgs taukskābju oksidācijas regulators, kas inhibē CPT-1 darbību. Malonil-CoA koncentrācijas paaugstināšanās gadījumā samazinās taukskābju oksidācija, savukārt samazinoties malonil-CoA koncentrācijai taukskābju koncentrācija aktivējas. Malonil-CoA sintēzi veic acetil-CoA karboksilāze (ACC) no acetil-CoA un CO₂ (Folmes and Lopaschuk 2007). Pierādīts, ka insulīna un glikozes ievadīšana paaugstina malonil-CoA koncentrāciju (Båvenholm et al., 2000; Saha et al., 1999), kas inhibē CPT-I un sekojoši arī taukskābju β-oksidāciju, intensificējot ogļhidrātu metabolismu.

Nozīmīgs faktors glikozes metabolisma regulācijā ir arī fosfofruktokināze (FFK-I). Palielinot taukskābju koncentrāciju, atbilstoši palielinās to metabolisms un viena no

taukskābju metabolītiem – citrāta koncentrācija, kas savukārt ir spēcīgs FFK-I inhibitors (Stanley et al., 1997). Līdz ar to, palielināts taukskābju daudzums samazina FFK-I aktivitāti. Bez tam šajā gadījumā ir samazināta arī PDH aktivitāte sirdī. Ir atrasts, ka kopumā hiperlipidēmija var samazināt glikozes oksidatīvo metabolismu pat līdz 50%, no kuriem 20% ir augstas citrāta koncentrācijas rezultātā kavētā FFK-I aktivitāte (Carvajal et al., 2003).

Kā jau iepriekš tika minēts, glikozes metabolismā svarīgs posms ir piruvāta degradācija par acetil-CoA, ko veic PDH kompleksa enzīmi. PDH komplekss ir aktīvs, ja PDH kināze ir defosforilēta, savukārt, ja tā tiek fosforilēta, PDH kompleksa aktivitāte samazinās (Hansford and Cohen 1978). PDH fosfatāzi aktivē Ca^{2+} un Mg^{2+} klātbūtne, kā arī acetil-CoA/CoA un $NADH^+/NAD$ attiecības palielināšanās, savukārt tās aktivitāti bremsē piruvāts un ADP (Stanley 2004). Jāatzīmē, ka taukskābju un piruvāta oksidācijas rezultātā rodas tie paši produkti ($NADH^+$ un acetil-CoA) un oksidācijas reakcijās tiek izmantoti tie paši substrāti (NAD un brīvais CoA). Intensīva taukskābju oksidācija palielina mitohondriālo $NADH^+ /NAD$ un acetil-CoA/brīvā CoA attiecību, kas savukārt veicina PDH kināzes fosforilēšanos un piruvāta oksidācijas inhibīciju (Hopkins et al., 2003). Savukārt, inhibējot taukskābju β -oksidāciju, samazinās mitohondriālā attiecība starp $NADH^+ /NAD$ un acetil-CoA/brīvā CoA un notiek PDH kināzes defosforilizācija un glikozes un laktāta oksidēšanās aktivitātes palielināšanās.

Sirds enerģijas metabolisms išēmijas un reperfūzijas apstākļos

Sirds enerģijas metabolisms išēmijas apstākļos ir atkarīgs no išēmijas smaguma pakāpes (Calvani et al., 2000). Pilnīga asins plūsmas pārtraukšana izsauc ATP un sekojoši arī kreatīnfosfāta (CrP) koncentrācijas samazināšanos, laktāta, ADP un adenozīna uzkrāšanos, glikogēna noārdīšanos un kontraktīlo disfunkciju (Jani and Bermann 2006). Miokarda išēmija inhibē PDH kompleksa darbību, kas varētu būt saistīta ar tā darbības produktu ($NADH^+$ un acetil-CoA) uzkrāšanos, jo tie vairs netiek iesaistīti elpošanās ķēdē vai Krebsa ciklā (Calvani et al., 2000). 20-30 min laikā no išēmijas sākuma palielinās brīvo taukskābju koncentrācija, kas saistīta ar membrānas fosfolipīdu noārdīšanos. Novēro arī nelielu un īslaicīgu acil-CoA koncentrācijas palielināšanos un acilkarnitīna koncentrācijas samazināšanos (Van der Vusse et al., 1992).

Sirds enerģijas metabolisms mainās arī pie nelielām išēmijām, kas pilnīgi nepārtrauc skābekļa padevi sirds muskulim. Samazinot asinsplūsmu par 20-30%, samazinās sirds kontraktīlā funkcija, kas saistīta ar ATP un CrP samazināšanos, palielinās glikolīze, kā arī laktāts vairs netiek uzņemts no ārējās vides, bet tiek aktīvi sintezēts pašā miokardā (Calvani 2004). Kā vieglas tā arī smagas išēmijas gadījumā taukskābju oksidācija samazinās, bet arvien paliek svarīgs enerģijas avots (Calvani et al., 2000). Inhibētās β -oksidācijas rezultātā šūnā sāk uzkrāties garķēžu acil-CoA un acilkarnitīns, kas iespējams, savas amifilo īpašību dēļ, var šķīdināt mitohondriju un šūnas membrānu (Hayashi et al., 2000c). Samazinātais mitohondriālais oksidatīvais metabolisms veicina anaerobo glikolīzi, kas kļūst par galveno ATP avotu (Calvani et al., 2000).

Atsākoties skābekļa padevei miokardam aktivējas Krebsa cikls un atjaunojas ATP produkcija (Lerch et al., 1992). ATP koncentrācijas atjaunošanās, veicina sirds kontraktīlās funkcijas atjaunošanos. Reperfūzijas laikā 90% enerģijas miokards iegūst no lipīdu metabolisma (Saddik and Lopaschuk 1992). Taukskābju metabolismu stimulē arī paaugstinātā brīvo taukskābju koncentrācija plazmā, ko veicinājusi hormonu (adrenalīna un noradrenalīna) lipolīzes stimulācija adipocītos (Lopaschuk et al., 1994). Taukskābju metabolismu veicina arī samazināta malonil-CoA koncentrācija, kas vairs neinhibē CPT-I darbību (Kudo et al., 1995). Samazinātā malonil-CoA koncentrācija rodas saistībā ar išēmijas rezultātā aktivējušos AMPK, kas inaktivē ACC (Towler and Hardie 2007). Reperfūzijas laikā nemainās malonil-CoA dekarboskilāzes aktivitāte, kas samazina malonil-CoA koncentrāciju un tādejādi veicina taukskābju metabolismu. Pierādīts, ka AMPK aktivācija išēmijas laikā izsauc GLUT-4 translokāciju membrānā un veicina glikozes uzņemšanu (Musi and Goodyear 2003). AMPK aktivācija stimulē glikolīzi, fosforilējot fosfofruktokināzi-II (FFK-II), kas paaugstina fruktozes-2,6-difosfāta koncentrāciju, kas savukārt stimulē FFK-I (Marsin et al., 2000). Augsta glikolītiskā aktivitāte un zema oksidatīvā glikolīze uz augsta taukskābju oksidācijas fonā veicina acidozes attīstību (Folmes et al., 2005).

Intracelulārā acidoze tiek reducēta izmantojot vairākus mehānismus, kas iekļauj Na^+ un H^+ transportmolekulu (Karmazyn 2001) un Na^+ un HCO_3^- transportmolekulu (Sterling and Casey 2002). Abi šie mehānismu veicina Na^+ uzkrāšanos šūnās, kas iedarbina $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transportmolekulu (Komuro and Ohtsuka 2004). Tas izsauc pārlieku

lielu kalcija koncentrāciju šūnā, kas var izpausties kā aritmijas, bet tālāk izraisīt apoptozi un nekrozi. Gan išēmijas, gan reperfūzijas laikā ir paaugstināta vajadzība pēc ATP, jo nepieciešama enerģija jonu disbalansa regulācijai, kas samazina ATP enerģijas izmantošanu kontraktīlajai funkcijai (Liu et al., 1996).

Balstoties uz iepriekš aprakstītajām bioķīmiskajām izmaiņām miokardā išēmijas – reperfūzijas laikā, varam secināt, ka išēmijas – reperfūzijas periodā būtu lietderīgi nomākt taukskābju oksidāciju un veicināt glikozes metabolismu, jo tas novērstu taukskābju metabolisma toksisko produktu uzkrāšanos un reperfūzijas laikā tas neveicinātu kalcija uzkrāšanos šūnā.

Enerģijas metabolisma regulācijas iespējas

Sirds išēmijas gadījumā

Kā tika minēts iepriekšējā nodaļā, tad, inhibējot taukskābju metabolismu un veicinot glikozes metabolismu miokardā, ir iespējams to pasargāt no išēmijas – reperfūzijas izsuktajiem bojājumiem. Glikozes metabolismu stimulē glikozes, insulīna, un kālija (GIK), kā dihloracetāta (DHA) ievadīšana. Taukskābju metabolismu iespējams samazināt inhibējot to metabolismā iesaistītos enzīmus vai samazinot to plazmas koncentrāciju.

Glikozes metabolisma stimulatori

Glikoze, insulīns un kālijs

Pirmie mēģinājumi mainīt miokarda metabolismu išēmijas laikā tika veikti jau 1962. gadā, kad Sodi-Pollares pacientiem ar akūtu miokarda infarktu vienlaicīgi ievadīja glikozi, insulīnu un kālija hlorīdu. Pēc GIK ievadīšanas novēroja EKG ainas uzlabošanos un sirds ektoiskās aktivitātes samazināšanos. Autori to pamatoja ar paaugstinātu kālija uzņemšanu kardiomiocītos, kas atjaunoja šūnas membrānas miera potenciālu un augstāku šūnas elektrisko stabilitāti (Wolff et al., 2002). Vēlāk tika parādīts, ka GIK ievadīšana AMI laikā samazināja brīvo taukskābju līmeni asinīs, kas infarkta gadījumā var sasniegt pat 1200 mM (Oliver et al., 2006), kā arī inhibēja taukskābju iekļūšanu kardiomiocītos (Jani and Bergmann 2006). GIK ievadīšanas ietekmē palielinās glikozes iekļūšana šūnā,

kas izskaidrojams ar GLUT-4 aktivēšanos šūnas membrānā un pastiprinās glikozes metabolisms (Folmes et al., 2005).

Dihloroacetāts (DHA)

Vieglas līdz smagas išēmijas gadījumā notiek pastiprināta glikozes uzņemšana, glikogēna noārdīšana un glikolīze, kas izraisa laktāta producēšanos un acidozes attīstību (Lopaschuk and Stanley 1997). Glikolīze ir galvenais ATP avots išēmijas laikā, bet acidoze, kas attīstās laktāta koncentrācijas palielināšanās rezultātā, izsauc sirds saraušanās spēka samazināšanos un tālāku bojājumu attīstību, tāpēc viens no veidiem kā uzlabot sirds metabolismu išēmijas laikā būtu aktivēt enzīmus, kas veic laktāta degradāciju, piemēram, PDH kompleksu (Wambolt et al., 2000). DHA aktivē ogļhidrātu metabolismu, inhibējot PDH kināzi, enzīmu, kas, fosforilējot PDH kompleksa enzīmus, tos inaktivē (Bersin and Stacpoole 1997). Bez tam DHA inhibē arī taukskābju oksidāciju, jo palielinās acetil-CoA koncentrācija citosolā, kas, savukārt, veicina malonil-CoA sintēzi, kas inhibē CPT-I darbību (Folmes and Lopaschuk 2007).

Parādīts, ka DHA uzlabo miokarda metabolismu išēmijas laikā gan *in vivo*, gan *in vitro* eksperimentālo modeļu gadījumā, kā arī ievadot to pacientiem ar koronāro artēriju slimību, uzlabojās sirds funkcionālie rādītāji (Parang et al., 2005). Tomēr, neskatoties uz DHA pozitīvajiem efektiem, to klīnikā praktiski nelieto, jo tam ir īss pussabrukšanas periods un terapeitiskā efekta sasniegšanai nepieciešama augsta plazmas koncentrācija (Stacpoole 1989).

Taukskābju metabolisma inhibitori

Nikotīnskābe un β -ardenoblokatori

Plazmas brīvo taukskābju koncentrāciju var samazināt, ievadot nikotīnskābi, tādā veidā stimulējot miokardā glikozes un laktāta uzņemšanu (Nuutila et al., 1994). Pagājušā gadsimta 70-to gadu pētījumos tika pierādīts, ka nikotīnskābes ievadīšana AMI pacientiem samazināja plazmas brīvo taukskābju koncentrāciju, kā arī paralēli tam, aritmiju smagumu un pazemināja ST-pacēlumu (Wolff et al., 2002).

Beta adrenoblokatori ir plaši lietoti išēmiskās sirds slimības ārstēšanai, jo tie samazina sirds darbu un to ievadīšana infarkta akūtā stadijā palielina izdzīvošanu.

Neskatoties uz β -adrenoblokatoru ietekmi uz sirds funkcionālajiem rādītājiem, ir parādīts, ka to ievadīšana samazina arī taukskābju koncentrāciju plazmā, ko izraisījusi hormonjutīgās lipāzes aktivācija un tādā veidā samazina taukskābju oksidāciju miokardā išēmijas laikā (Wolff et al., 2002).

CPT inhibitori

Kā tika minēts iepriekš, CPT-1 ir galvenais taukskābju β -oksidācijas ātrumu regulējošais enzīms un tā darbības inhibīcija izsauc taukskābju oksidācijas samazināšanos. Viens no šūnas dabīgajiem CPT-I inhibitoriem ir malonil-CoA, kura intracelulārās koncentrācijas palielināšanās izsauc β -oksidācijas samazināšanos (Folmes and Lopaschuk 2007). Sākotnēji mākslīgi radītie CPT-I inhibitori tika attīstīti kā 2. tipa cukura diabēta zāles (Zarain-Herzberg and Rupp 2002), tomēr vēlāk tika atklāti šo savienojumu efekti uz sirds metabolismu. Pierādīts, ka CPT-I inhibīcija izraisa glikozes metabolisma intensificēšanos normālā žurkas sirdī (Schmitz et al., 1995). Kā tika parādīts, tad šīs izmaiņas glikozes metabolismā bija saistītas ar PDH kompleksa un fosfofruktokināzes aktivitātes palielināšanos un β -oksidācijas inhibīciju. Selektīvā CPT-I inhibitora, etomixira, infūzija uzlaboja izolētās žurkas sirds funkcionālos rādītājus pēc išēmijas, neietekmējot garo ķēžu acilkarnitīna un acil-CoA koncentrācijas (Grynberg 2005). Tomēr jāmin, ka CPT-1 inhibitori izraisa sirds hipertrofiju un tāpēc tos klīnikā nelieto (Hülsmann et al., 1991).

Pierādīts, ka arī CPT-2 inhibīcija samazina taukskābju oksidāciju (Steenbergen et al., 1997), tomēr, inhibējot CPT-2 darbību ar aminokarnitīnu, audos lielos apmēros uzkrājas garķēžu acilkarnitīni un triacilgliceroli, kuru uzkrāšanos ir iespējams novērst, vienlaicīgi inhibējot arī CPT-I. Inhibējot CPT-2, asinīs var konstatēt paaugstinātu brīvo taukskābju, garo ķēžu acilkarnitīnu un triacilglicerolus transportējošo daļiņu (VLDL) koncentrāciju un samazinātu glikozes koncentrāciju. Miokardā samazinās glikogēna daudzums, kas varētu liecināt par stimulētu glikozes metabolismu, tomēr piruvāta un sukcināta metabolisms nebija mainīts (Chiodi et al., 1992; Hülsmann et al., 1991), tomēr CPT-2 inhibitoriem kardioprotektīvais efekts vēl nav atrasts.

β -oksidācijas inhibitori

Vēl viens variants kā inhibēt lipīdu metabolismu ir tieša β -oksidācijā iesaistīto enzīmu inhibīcija. Pagaidām klīnikā tiek lietoti vairāki piperazīna atvasinājumi (trimetazidīns un ranolazīns), kas, inhibējot mitohondriālo garķēžu 3-ketoacil-CoA tiolāzi, bremsē taukskābju oksidāciju un vienlaicīgi stimulē glikozes metabolismu (Carvajal and Moreno-Sánchez 2003), kas arī ir pamatā to kardioprotektīvajai darbībai.

Metabolā terapija diabēta gadījumā

2. tipa diabēta gadījumā ir raksturīgi dažādi metabolisma traucējumi un kardiovaskulāro saslimšanu riska faktori: insulīna rezistence, dislipidēmija, hipertensija, ateroskleroze, endoteliālā disfunkcija un metabolais sindroms. Pacientiem ar 2. tipa diabētu parasti ir paaugstināta glikozes koncentrācija asinīs, kas attīstījies saistībā ar insulīna rezistenci un kas netiek pietekami kompensēta no Langerhansa saliņu β -šūnu puses. Traucēts lipīdu metabolisms ir arī viens no 2. tipa cukura diabēta etioloģiskajiem faktoriem. Pastāvīgi palielināta brīvo taukskābju koncentrācija izsauc lipotoksicitāti, kas samazina glikozes uzņemšanu šūnās, palielina glikoneoģenēzi un samazina insulīna sekrēciju (Gross and Staels 2007).

Līdz šim 2. tipa diabēta pacientu ārstēšanai tika izmantotas zāļu vielas, kas veicina insulīna sekrēciju no Langerhansa saliņām (sulfonilurīnvielas atvasinājumi) vai arī zāļu vielas, kas palielina audu jutību pret insulīnu (biguanidīna atvasinājumi), tomēr šāda veida terapija neietekmē lipīdu metabolisma izmaiņas. Pētījumos parādīts, ka 2. tipa diabēta pacientiem samazinot lipīdu kā arī glikozes koncentrāciju asinīs, samazinās kardiovaskulāro slimību attīstības risks. Tāpēc, ārstējot 2. tipa diabētu, ir nepieciešama gan glikozes, gan lipīdu metabolismu regulējošas zāles. Pēdējos gados arvien plašāk 2. tipa diabēta ārstēšanai tiek lietoti peroksisomu proliferācijas aktivējošo receptoru (PPAR) agonisti (Gross and Staels 2007).

PPAR ir šūnu kodolu receptori, kas aktivējoties darbojas kā transkripcijas faktori un spēj regulēt gēnu ekspresiju. Atkarībā no to lokalizācijas un aktivētajiem gēniem, tie tiek iedalīti vairākās klasēs (α -, β/δ – kas biežāk tiek saukts par δ - un γ -) PPAR receptori. To dabīgie ligandi ir piesātinātās un nepiesātinātās taukskābes – arahidonskābe, bet tos var arī aktivēt pretdiabēta un lipīdus pazeminošās zāļu vielas. Lielākā daļa PPAR aktivēto

gēnu ir atbildīgi par proteīnu sintēzi, kas nepieciešami lipīdu un glikozes metabolismam (Gross and Staels 2007).

PPAR α aktivācija

PPAR α aktivācija ietekmē gan glikozes, gan taukskābju metabolismu, un tas tiek ekspresēts audos, kuros notiek aktīvs taukskābju metabolisms, piemēram, aknās, nierēs, sirdī un muskuļos. Parādīts, ka PPAR α aktivācija, regulē daudzu proteīnu ekspresiju, kas ir iesaistīti lipīdu un lipoproteīnu metabolismā. PPAR α aktivācija veicina triglicerīdu koncentrācijas samazināšanos un HDL koncentrācijas palielināšanos. Kā arī tiek pāātrināta VLDL lipolīze, brīvo taukskābju iekļūšana šūnā un oksidācija (Staels et al., 1998). PPAR α aktivācija izraisa PDH kināzes aktivāciju, kas, savukārt, inhibē piruvāta degradāciju, bet veicina tā iesaistīšanos glikoneoģenēzē (Wu et al., 2001). Neseni pētījumi parādīja, ka pelēm ar aptaukošanos un kas neekspresē PPAR α , novērota samazināta insulīna izdalīšanās no β -šūnām atbildē uz glikozes stimulāciju, kas liecina par PPAR α lomu insulīna izdalīšanās procesā (Lalloyer et al., 2006). Savukārt žurku β -šūnu līnijā, PPAR α aktivācija, uzlaboja glikozes stimulēto insulīna izdalīšanos (Ravnskjaer et al., 2005). Līdzīgi arī cilvēka Langerhansa saliņu β -šūnas PPAR α aktivācija uzlaboja glikozes stimulēto insulīna izdalīšanos (Lalloyer et al., 2006).

PPAR γ aktivācija

PPAR γ aktivācija samazina glikētā hemoglobīna un glikozes koncentrāciju gan tukšā dūšā, gan pēc ēšanas, kas, galvenokārt, ir saistīta ar insulīna jutības paaugstināšanos. Ir izpētīts, ka PPAR γ aktivācija veicina jaunu adipocītu diferenciāciju un veco, kas ir kļuvuši insulīn-rezistenti, apoptozi (Arner 2003). Jaunie adipocīti ir izmērā mazi un daudz jutīgāki pret insulīnu (Kahn et al., 2000). PPAR γ aktivācija veicina plazmas triglicerīdu lipolīzi un to uzkrāšanos taukaudos, bez tam adipocītos tiek stimulēta glicerīna izmantošana triglicerīdu sintēzei, kas inhibē brīvo taukskābju izdalīšanos no adipocītiem. Tā kā taukskābju koncentrācija samazinās, tad tas veicina glikozes uzņemšanu muskuļos un glikozes koncentrācijas samazināšanos asinīs (Gross and Staels 2007). Parādīts arī, ka PPAR γ aktivācija izraisa palielinātu GLUT-1 un GLUT-4 ekspresiju un translokāciju šūnas membrānā (Kramer et al., 2001), tādā veidā šūnās tiek

palielināts glikozes metabolisms. Adiponektīns ir hormons, ko izdala taukaudi un kas stimulē taukskābju metabolismu un uzlabo audu jutību pret insulīnu. 2. tipa cukura diabēta pacientiem ir samazināta plazmas adiponektīna koncentrācija, bet pierādīts, ka PPAR γ aktivācijas rezultātā, adiponektīna koncentrācija plazmā palielinās, kas, savukārt, veicina brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrācijas plazmā samazināšanos (Yamauchi et al., 2001).

PPAR δ aktivācija

PPAR δ tiek ekspresēti dažādos audospiemēram, adipocītos, tievajā zarnā, kā arī sirdī un skeleta muskuļos (Gross and Staels 2007). Insulīna rezistentos mērķos parādīts, ka PPAR δ aktivācija izraisa HDL koncentrācijas palielināšanos un LDL, VLDL un triglicerīdu koncentrācijas samazināšanos un insulīna līmeņa normalizēšanos (Oliver et al., 2001). Kaut gan plazmas lipīdu transportmolekulu koncentrāciju regulējošais mehānisms nav pilnīgi skaidrs, tomēr var domāt, ka tas varētu ietvert holestrola „atpakaļ” ceļu. Dažos eksperimentālajos peļu modeļos pierādīts, ka PPAR δ aktivācija izraisa β -oksidācijas intensificēšanos, glikozes tolerances un insulīna jutīguma uzlabošanu, kā arī aptaukošanās samazināšanos (Tanaka et al., 2003). Citi pētījumi pierādījuši, ka PPAR δ aktivācija veicina enzīmu ekspresiju, kas iesaistīti taukskābju oksidācijā, ar ko vadēru būt skaidrojama β -oksidācijas intensificēšanās (Wang et al., 2003). Līdzīgi kā PPAR γ aktivācija, tā arī PPAR δ aktivācija veicina adiponektīna izdalīšanos no adipocītiem, kas savukārt paaugstina audu jutību pret insulīnu un samazina lipīdu koncentrāciju plazmā (Choi et al., 2007). Skeleta muskuļos PPAR δ aktivācija izraisa to pašu gēnu aktivāciju, kādu novēro badošanās vai ilgstošas fiziskas slodzes laikā, kas veicina aktīvāku taukskābju iesaistīšanu enerģijas metabolismā (Gross and Staels 2007). Brīvo taukskābju izdalīšanās no adipocītiem badošanās vai fiziskās aktivitātes laikā stimulē PPAR δ aktivāciju. Tāpēc domājams, ka PPAR δ fizioloģiskā loma ir muskuļu lipīdu un taukskābju metabolisma savstarpējā regulācija (Gross and Staels 2007; Kuhl et al., 2006). Peļu aknās konstatēts, ka PPAR δ aktivācija veicina glikozes metabolizēšanos caur pentožu ceļu un taukskābju sintēzi. Domājams, ka paaugstinātā taukskābju sintēze tiek kompensēta ar aktivēto β -oksidāciju muskuļos (Lee et al., 2006).

Balstoties uz iepriekš veiktajiem pētījumiem var secināt, ka metabolā terapija 2. tipa cukura diabēta gadījumā ir balstīta uz brīvo taukskābju koncentrācijas samazināšanu asins plazmā, ko izraisa taukskābju uzņemšana adipocītos un tauku rezervju veidošana, vai taukskābju oksidācijas stimulācija muskuļos un citos audos. Taukskābju koncentrācijas samazināšanās plazmā veicina insulīna rezistences samazināšanos un glikozes koncentrācijas samazināšanos asinīs.

Metabolā terapija aterosklerozes gadījumā

Ateroskleroze un tās izraisītās komplikācijas ir galvenais nāves cēlonis diabēta pacientiem (Hsueh and Law 2001), kā arī izpētīts, ka aterosklerozes izraisītās komplikācijas sastāda ~50% no visiem nāves gadījumiem civilizētajā sabiedrībā (Lusis 2000). Insulīna rezistence, tromboze, dislipidēmija, hipertensija asinsvadu iekaisums, tie visi ir aterosklerozes riska faktori (Hsueh and Law 2001), kas veicina endotēlija disfunkciju attīstību, kas tālāk var attīstīties tālākos asinsvadu bojājumos (Ross 1999). Bojāts endotēlijs, parasti laiž cauri LDL un citas plazmas sastāvdaļas, kas, savukārt, izraisa adhēzijas molekulu ekspresiju endotēlija šūnās un monocītu migrāciju asinsvada sienīnā. LDL zem endotēlija tiek oksidēti, veidojot oksidētos-LDL, ko fagocitē makrofāgi, kas kļūst par putu šūnām. Tajā pašā laikā attīstās arī asinsvada sienīņas gludās muskulatūras iekaisums, kas pastiprina endoteliālo funkciju un veicina gludās muskulatūras šūnu proliferāciju. Tālāka iekaisuma attīstība var novest pie asinsvadu plīsumiem un letāliem gadījumiem (Duan et al., 2008).

Aknu X receptori (LXR) ir receptori, kuru aktivācijas rezultātā aktivējas dažādi enzīmi, kas iesaistīti holesterīna metabolismā un tā kā aterosklerozes attīstība tiek saistīta ar holesterīna metabolisma izmaiņām, tad šīs grupas receptoru agonisti tiek pētīti kā potenciālas pretaterosklerozes zāles (Nomiya and Bruemmer 2008). Pierādīts, ka LXR receptoru agonisti samazina aterosklerozes attīstību peles modeļos (Joseph et al., 2002). LXR receptoru aktivācija izsauc holesterīna metabolisma izmaiņas, kas inhibē aterosklerozes attīstību (Nomiya and Bruemmer 2008). Pierādīts, ka LXR aktivācija pelēs izsauc pilnīgu holesterīna uzsūkšanās inhibīciju no zarnu lumena. Absorbcijas mehānisms tiek skaidrots ar speciālu transportmolekulu ekspresijas pastiprināšanos enterocītos, kas veicina holesterīna transportu atpakaļ zarnu lumenā (Repa et al., 2000). Interesanti, ka šīs pašas transportmolekulas ekspresijas paaugstināšanās aknās veicina

holesterīna izdalīšanos žultī, kas savukārt samazina holesterīna plazmas koncentrāciju (Yu et al., 2002). Nozīmīgs posms žultsskābju sintēzē ir holesterīna hidroksilēšana, ko veic CYP7A. Tas ir enzīms, kas atrodas aknās un to inducē augsta holesterola koncentrācija, savukārt LXR^{-/-} pelēm šī indukcija nenotiek, kas ļauj secināt, ka LXR aktivācija inducē CYP7A aktivitāti un veicina holesterīna metabolizēšanos par žultsskābēm (Peet et al., 1998).

LXR aktivācija inhibē ne tikai holesterīna absorbciju, bet arī tā *de novo* sintēzi. Pētījumos parādīts, ka LXR aktivācija izsauc 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA reduktāzes, kā arī skvalēna sintāzes aktivitātes samazināšanos, kas, savukārt, samazina holesterīna sintēzi (Schultz et al., 2000). Vairāki pētījumi pierādījuši, ka lietojot selektīvos LXR agonistus palielinās HDL koncentrācija, kas liecina par holesterola transporta no perifērajiem audiem uz aknām intensificēšanos (Miao et al., 2004; Schultz et al., 2000). Aterosklerozes attīstību veicina holesterīna uzkāšanās makrofāgos, savukārt LXR agonisti izraisa holesterīna koncentrācijas samazināšanos makrofāgos, kas palēnina aterosklerozes attīstību (Naik et al., 2006).

Neskatoties uz visiem pozitīvajiem holesterīna metabolisma regulācijas efektiem aterosklerozes gadījumā, LXR agonisti veicina triglicerīdu sintēzi aknās, aktivējot enzīmus, kas piedalās *de novo* taukskābju sintēzē un izsauc hipertrigliceridēmiju (Schultz et al., 2000).

Pētījumu eksperimentālie modeļi

Apolipoproteīna E „nokaut” (ApoE^{-/-}) peles

Apolipoproteīns E (ApoE) tiek sintezēts aknās un makrofāgos un tas ietilpst lipīdu transportformu (lipoproteīnu sastāvā). Saistoties pie LDL- un LDL-līdzīgajiem receptoriem, apoE nodrošina aterosklerozi veicinošo daļiņu (LDL un VLDL atlikumu) uzņemšanu no asinīm un to koncentrācijas samazināšanos (Knowles and Maeda 2000). ApoE^{-/-} peles gandrīz vienlaicīgi tika radītas divās neatkarīgās laboratorijās (Plump et al., 1992, Zhang et al., 1992). Šīm pelēm ir inaktivēts ApoE gēns, kas izraisa izmaiņas normālā lipīdu metabolismā. Saņemot normālu barību šīm pelēm ir vismaz piecas reizes augstāks holesterīna līmenis nekā attiecīga vecuma normālām pelēm. Pat heterozigotiem tiek novērots statistiski ticami augstāks holesterīna līmenis (van Ree et al., 1994). Ja šīm

pelēm tiek dota barība ar paaugstinātu holesterīna saturu, tad holesterīna līmenis paaugstinās vēl par trīs reizēm. Savukārt, triglicerīdu koncentrācija ApoE^{-/-} pelēm, kas saņēmušas normālu barību ir uz pusi zemāka nekā attiecīgā vecuma normālām pelēm (Plump et al., 1992). Holesterīna koncentrāciju ApoE^{-/-} paaugstina arī holskābes klātbūtne barībā, tādā gadījumā arī triglicerīdu koncentrācija vairs neatšķiras no attiecīgā vecuma normālām pelēm (Zhang et al., 1994).

Holesterīns šīs līnijas pelēs, galvenokārt, tiek transportēts ar VLDL un vidēja blīvuma lipoproteīnu palīdzību un pavisam nedaudz holesterīna konstatēts LDL sastāvā. Šāds lipīdu sadalījums atgādina asinsainu III tipa hiperlipiēmijas pacientiem, kam arī konstatētas mutācijas ApoE proteīnā (Brewer et al., 1983). Aterosklerotiskie asinsvadu bojājumi šīm pelēm attīstās spontāni, savukārt, ja šīs peles saņem barību ar paaugstinātu tauku saturu, tad palielinās aterosklerotisko bojājumu apjoms un attīstīšanās ātrums (Kyselovic et al., 2005). Līdz ar aterosklerozes attīstību, šajās pelēs attīstās arī endoteliālā disfunkcija (Schröder et al., 2006). Asinsvadu bojājumu struktūra ApoE^{-/-} pelēs ļoti atgādina cilvēka aterosklerotiskos asinsvadu bojājumus (Meir and Leitersdorf 2004), tomēr jāsecina, ka šajā peļu modelī nenovēro asinsvadu bojājumu plīsumus un trombozi, kas raksturīga cilvēkiem (Rosenfeld et al., 2000), kā arī aterosklerotisko bojājumu attīstības vietas atšķiras no cilvēka aterosklerotisko bojājumu attīstības vietām asinsvados (VanderLaan et al., 2004). Neskatoties uz visiem šī modeļa trūkumiem, ApoE^{-/-} peļu modelis viens no visplašāk izmantotajiem eksperimentālās aterosklerozes modeļiem (Meir and Leitersdorf 2004).

Apolipoproteīna E un zema blīvuma lipoproteīnu receptoru

„dubultnokaut” (ApoE/LDLR^{-/-}) peles

ApoE/LDLR^{-/-} peles līdzīgi kā ApoE^{-/-} peles tika iegūtas homologās rekombinācijas ceļā un tās ne tikai neekspresē ApoE, bet arī to organismā neteik ekspresēti zema blīvuma lipoproteīnu receptori (Ishibashi et al., 1994). Atšķirībā no citiem eksperimentālajiem aterosklerozes modeļiem, šo peļu holesterīna sadalījums pa lipoproteīniem ir ļoti līdzīgs cilvēku lipoproteīnu sadalījumam, proti, lielākā daļa holesterola tiek transportēta LDL formā, kā tas ir cilvēkiem, nevis HDL formā, kā tas ir raksturīgi pelēm (Bonthu et al., 1997; Ishibashi et al., 1994). Saņemot normālu barību, šīm pelēm attīstās izteikta hiperholesterēmija, holesterīna līmenis ir ~5 reizes augstāks nekā normālām pelēm;

interesanti, ka holesterīna koncentrācija ir līdzīga atbilstoša vecuma Apo^{-/-} pelēm (Bonthu et al., 1997; Ishibashi et al., 1994). Savukārt, salīdzinot aterosklerotisko bojājumu smagumu, abās peļu līnijās pie vienādas holesterīna koncentrācijas, jāsecina, ka apoE/LDLR^{-/-} peļu līnijā veidojas izteiktāki aterosklerotiskie bojājumi, kas liecina, ka ne tikai holesterīna līmenis ir noteicošais faktors aterosklerotisko bojājumu attīstībai šajā peļu modelī (Witting et al., 1999). Aterosklerotiskie bojājumi apoE/LDLR^{-/-} pelēm attīstās, barojot tās ar normālu barību, bet, dodot tām barību ar paaugstinātu tauku un holesterīna saturu, aterosklerotisko bojājumu daudzums un attīstības ātrums palielinās (Jawień et al., 2004; Olszanecki et al., 2005). Paralēli aterosklerotiskajiem bojājumiem šīm pelēm attīstās arī endoteliālā disfunkcija (Jawien et al., 2007). Šī modeļa peles arī samērā bieži izmantotas dažādu vielu antiterosklerotiskā efekta pētījumiem (Zadelaar et al., 2007).

Goto-Kakizaki (G-K) žurkas

G-K žurku līnija tika iegūta krustojot vairākās paaudzēs žurkas, kam bija nedaudz pasliktināta glikozes tolerance (Goto et al., 1976). G-K žurkas ir otrā tipa diabēta eksperimentālais modelis, tomēr šīm žurkām nenovēro aptaukošanos, kas bieži ir raksturīga 2. tipa diabēta pacientiem, to svars pat ir par 10 – 30% mazāks nekā atbilstošā vecuma Wistar žurkām (Movassat et al., 2007). Piedzimstot šīm žurkām ir normāls glikozes līmenis tukšā dūšā un normāla insulīna sekrēcija no Langerhansa saliņām, bet, sākot ar 28 dzīves dienu, pamazām sāk attīstīties 2. tipa diabēts ar paaugstinātu bazālo glikozes līmeni un samazinātu glikozes toleranci. Bazālais glikozes līmenis G-K žurkās tukšā dūšā var sasniegt par 10-14 mM (Movassat et al., 2007). Līdzīgi kā diabēta pacientiem, šīm žurkām attīstās arī perifērās neiropatijas, kas saistītas ar perifēro nervu deģenerāciju (Yagihashi et al., 1982). Diabēta pacientiem parasti novēro endotēlija disfunkciju, pētījumi parādījuši, ka endoteliālā disfunkcija attīstās arī šīm žurkām (Brøndum et al., 2005). Interesanti, ka 12 nedēļas vecām G-K žurkām jutība pret acetilholīnu ir paaugstināta, bet 36 nedēļu vecumā ir attīstījusies endoteliālā disfunkcija (Kobayashi et al., 2004).

Materiāli un metodes

Reāģenti

Mildronāts (3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)propionāts) kā dāvana tika saņemta no A/S Grindeks. Metanols tika iegādāts no Merck (Vācija). Nātrija pentobarbitāla šķīdums (Narkodorm-n) tika iegādāts no Alvetra (Vācija). 2-Dezoksi-D-[1-³H]glikoze (DOG) (10 μCi/ml, [300 μCi/mmol]) tika iegādāta no Amersham International (Lielbritānija). Acetons, etiķskābe, hloroforms, dietilēteris, glikoze, heparīns, glicīns, amonija acetāts, NaCl, NaHCO₃, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaOH, nātrija citrāts, etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrija sāls (EDTA), nātrija piruvāts, MgCl₂•6H₂O, 2.3.5-trifeniltetrazolijs hlorīds (TFT), dihidroetīdijs (DHE), Oil Red-O (ORO), Sudan IV, fenilmetilsulfonilfluorīds (PMSF), diamīds, pepstatīns, leupeptīns, aprotinīns, 2-dezoksi-D-glikoze (2-DOG), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazīnetānesulfonskābe (HEPES), trishidroksimetilaminometāns (Tris), nātrija dodecilsulfāts (SDS), Ponceau S un vērša seruma albumīns (BSA) tika iegādāti no Sigma (ASV). 50% CaCl₂ šķīdums tika iegādāts no FarmaBalt (Latvija). Gāzu maisījums (95% O₂+5% CO₂) no Aga (Latvija). Truša Anti-GLUT-1 no Alpha diagnostics. Truša Anti-GLUT-4 antivielas tika iegādātas no Abcam. Truša Anti-HK II, Anti-INSR, Anti-CPT IA un kazas Anti-Truša IgG antivielas tika iegādātas no Millipore (Chemicon Int).

Dzīvnieki

Eksperimentiem tika izmantoti pieauguši Wistar līnijas žurku tēviņi ar ķermeņa masu no 200-300 g un ICR līnijas peļu tēviņi ar ķermeņa masu no 28-30 g. Abu līniju dzīvnieki tika iegādāti no Rīgas Stradiņa universitātes Laboratorijas dzīvnieku vivārija (Latvija). ApoE/LDL^{-/-} peļu mātītes un abu dzimumu apoE^{-/-} peles ar ķermeņa masu no 18-20 g tika iegādātas no Taconic (Dānija). G-K žurku līnijas tēviņi ar masu no 250-260 g tika iegādāti no Charles River (ASV). Pirms eksperimenta dzīvnieki tika turēti standarta sprostos pa 8 dzīvniekiem vienā sprostā. Tika nodrošināti eksperimentālo dzīvnieku uzturēšanas standarta apstākļi (gaisa temperatūra 21-23°C, relatīvais gaisa mitrums 65 ± 10%, 12 stundu gaismas/tumsas cikls). Barībai izmantoja standartizēto diētu R70 no firmas LABFOR (Lactamin AB, Zviedrija), dzeramais ūdens bija pieejams bez

ierobežojuma. Visas eksperimentālās procedūras tika veiktas saskaņā ar Eiropas Komisijas direktīvas 86/609/EEC vadlīnijām un tika saskaņotas ar Pārtikas un veterināro dienestu (atļauja Nr. 21-1-13/1034, 01.06.2006.) un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi.

Mildronāta ievadīšana

Lai noskaidrotu mildronāta ilgstošas terapijas ietekmi uz glikozes metabolismu, ICR līnijas pelu tēviņi, kas svēra no 28-30 g, tika sadalīti divās grupās, no kurām vienai grupai 20 dienas tika vadīts mildronāts (200 mg/kg) *i.p.*, savukārt otrai grupai (kontroles grupai) 20 dienas tika vadīts atbilstošs izotoniskā nātrija hlorīda šķīduma daudzums. Abu grupu peles dekapitēja 21. dienā 24 h pēc pēdējās mildronāta vai izotoniskā šķīduma ievadīšanas. Tika ņemtas asinis un sagatavota plazma insulīna un C-peptīda, glikozes, brīvo taukskābju, triglicerīdu, LDL, HDL, GBB, karnitīna un mildronāta koncentrācijas mērījumiem (sk. *Asins bioķīmisko parametru analīze*). Pēc asiņu paņemšanas, pelēm atvēra krūšu kurvi, izgriezta sirdi, ko skaloja ledusaukstā Krebsa-Henseleita (K-H) buferšķīdumā un izmantoja tālāk izolētās sirds eksperimentiem (sk. *Glikozes uzņemšana izolētā sirds modeli*). Dažas sirdis tika izņemtas izskalotas un sasaldētas šķidrā slāpekļī un vēlāk izmantotas ekstraktu pagatavošanai (sk. *Sirds homogenātu pagatavošana*) proteīnu ekspresijas daudzuma novērtēšanai (sk. *Proteīnu daudzuma kvantificēšana ar poliakrilamīda gēlu un „Western blot” analīzi.*) vai mRNS transkripcijas (sk. *RNS izolēšana un kvantitatīva RT-PCR analīze*) daudzuma novērtēšanai.

Lai noskaidrotu mildronāta lietošanas ietekmi uz diabēta attīstību G-K līnijas žurkās, eksperimentam izmantoja Wistar un G-K līnijas tēviņus ar ķermeņa masu no 250-300 g. 12. dzīves nedēļā G-K žurkas sadalīja 3 grupās, no kurām divas katru dienu *p.o.* saņēma mildronātu devā 100 vai 200 mg/kg, kontroles grupa un Wistar žurkas saņēma atbilstošu dzeramā ūdens daudzumu. Pēc četrām nedēļām no astes vēnas tika ņemtas asinis un noteikts ketonvielu un glikozes daudzums (sk. *Asins bioķīmisko parametru analīze*). Savukārt pēc astoņām nedēļām tika veikts glikozes tolerances tests (sk. *Perorālais glikozes tolerances tests*) un noteikts ketonvielu un glikozes daudzums asinīs (sk. *Asins bioķīmisko parametru analīze*). Lai novērtētu mildronāta ietekmi uz neiropātisko sāpju attīstību G-K un Wistar līnijas žurkām 20. dzīves nedēļā tika veikts

„Tail flick” un ”Hot plate” tests (sk. ”Tail-flick” tests un „Hot Plate” tests). Pēc uzvedības testu veikšanas, dzīvnieki tika iemidzināti, izmantojot nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg), ņemtas asinis un noteikta fruktozamīna, HDL un LDL, brīvo taukskābju, insulīna, C- reaktīvā proteīna un C- peptīda koncentrācija (sk. *Asins bioķīmisko parametru analīze*), sirds tika izgriezta un veikts eksperimentālais infarkts *in vitro* (sk. *Eksperimentālais miokarda infarkts in vitro*) un aotra tika izmantota asinsvadu reaktivitātes pētījumiem (sk. *Asinsvadu reaktivitātes pētījumi izolētā aortā*)

Lai noskaidrotu mildronāta ietekmi uz aterosklerozes attīstību, 23-25 g smagas apoE/LDLR^{-/-} peļu mātītes 8. dzīves nedēļā tika sadalītas trīs grupās; pirmā un otrā grupa kopā ar dzeramo ūdeni saņēma mildronātu devās 100 mg/kg vai 30 mg/kg, kontroles grupa saņēma dzeramo ūdeni. Pēc 4 mēnešiem peles tika eitanazētas un ņemtas asinis brīvo taukskābju, triglicerīdu, LDL, HDL un brīvā holesterīna koncentrāciju noteikšanai (sk. *Asins bioķīmisko parametru analīze*). Aortā tika kvantificēts aterosklerotisko bojājumu laukums (sk. *Aterosklerotiskā aplikuma daudzuma noteikšana aortā*), kā arī aterosklerotiskais aplikums pie pusmēnes vārstulēm (sk. *Aterosklerotiskā aplikuma laukuma noteikšana aortas saknē*). No sirdīm tika pagatavoti homogenāti (sk. *Sirds homogenātu pagatavošana*), kuros tika noteikta karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija (sk. *Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana*).

Lai noskaidrotu mildronāta ietekmi uz nitrozilhemoglobīna (NOHb) un superoksīda anjona producēšanos aortā, abu dzimumu apoE^{-/-} peles 8. dzīves nedēļā sāka saņemt barību ar paaugstinātu tauku un holesterīna saturu, kas saturēja 21% tauku un 0.15% holesterīnu (Sniff, Vācija). Paralēli, peles tika sadalītas divās grupās, no kurām viena kopā ar dzeramo ūdeni 4 mēnešus saņēma mildronātu devā 100 mg/kg, savukārt otra grupa – kontroles grupa saņēma dzeramo ūdeni. Pēc 4 mēnešiem peles tika eitanazētas un ņemtas asinis NOHb daudzuma noteikšanai (sk. *Nitrozilhemoglobīna daudzuma noteikšana asinīs*) un izolēta aorta superoksīda anjona daudzuma noteikšanai (sk. *Superoksīda anjona noteikšana aortā*).

Lai noskaidrotu mildronāta ietekmi uz karnitīna un GBB koncentrāciju izmaiņām aortas audos, Wistar līnijas žurku tēviņi ar masu no 200-250 g tika sadalīti divās grupās, no kurām viena perorāli saņēma mildronātu devā 100 mg/kg, otra (kontroles grupas dzīvnieki) saņēma dzeramo ūdeni. Pēc divām nedēļām dzīvnieki tika iemidzināti ar

nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg) un izņemta aorta, attīrīta un izšķīdināta kolagenāzes (2 mg/ml) šķīdumā un sagatavota tālākām karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācijas analīzēm (sk. *Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana*). Lai noskaidrotu mildronāta ilgstošas lietošanas ietekmi uz karnitīna un GBB koncentrāciju izmaiņām, Wistar līnijas žurku tēviņiem ar masu no 200–250 g četras nedēļas injekciju veidā tika ievadīts mildronāts 100 mg/kg *i.p.* Attiecīgajā dienā žurkas tika dekapitētas un ņemtas asinis, no kurām tika sagatavota plazma un noteikta karnitīna un GBB koncentrācija (sk. *Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana*). Sirds tika izgriezta un sahomogenizēta (sk. *Sirds homogenātu pagatavošana*) un homogenātā tika noteikts karnitīna un GBB daudzums (sk. *Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana*).

Lai noskaidrotu mildronāta kardioprotektīvā efekta sākšanās laiku Wistar līnijas žurku tēviņi svarā no 250–300 g kursa veidā līdz 14 dienām *p.o.* saņēma mildronātu (100 mg/kg), kontroles grupas dzīvnieki saņēma atbilstošu daudzumu dzeramā ūdens. Attiecīgajā dienā tika veikts eksperimentālais sirds infarkts *in vitro* (sk. *Eksperimentālais miokarda infarkts in vitro*).

Izmantotās metodes

RNS izolēšana un kvantitatīva RT-PCR analīze

RNS tika izolēta no saldētām sirdīm, izmantojot TRI reaģentu (Sigma, USA), vadoties pēc ražotāja instrukcijām. Katra sagatavotā RNS parauga kvalitatīvā un kvantitatīvā novērtēšana notika izmantojot agarozes gelu.

Pirmā cDNS dubultspirāle no RNS tika uzsintezēta izmantojot RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis reaģentu komplektu (Fermentas), vadoties pēc ražotāja norādītajām instrukcijām. Kvantitatīvā GLUT-1, GLUT-4, HK II, insulīna receptora (INSR), PDC E1/E2, CPT-1A un sirds β -aktīna RT-PCR analīze tika veikta, samaisot sintezēto cDNS ar adekvātajiem praimeriem un RT qPCR Master Mix šķīdumu (Super Array), reakcija tika veikta Applied Biosystems Prism 7700 sistēmā, vadoties pēc ražotāja norādītajām instrukcijām. Kā iekšējā kontrole tika izmantots β -aktīna mRNS daudzums, pret kuru tika standartizēts pārējo peptīdu mRNS daudzums. Visi paraugi tika analizēti divas reizes kopā vai bez atgriezeniskās transkriptāzes, lai izvairītos no DNS piesārņojuma. Pētījumā izmantotie „praimerī” redzami 1. tabulā.

Gēns	Praimers	Nukleotīdu secība
GLUT-1	F	5'-GCAGGAGATGAAAGAAGAGG-3'
	R	5'-CTACAACAAACAGCGACACC-3'
GLUT-4	F	5'-CTACTCAGGGCTAACATCAG-3'
	R	5'-CTTTAGACTCTTTCGGGCAG-3'
HK II	F	5'-AGTAAGGGTGACAGACAATGG-3'
	R	5'-AGACCAAGAACTCTCATCCAG-3'
INSR	F	5'-AGACAGATTACTATCGGAAAGG-3'
	R	5'-CCCAAAGGACCACATATCAG-3'
CPT-1A	F	5'-GTCCCATAAGAAACAAGACC-3'
	R	5'-ACGATGTAAAGGCAGAAGAG-3'
β-aktīns	F	5'-CCTCTGAACCCTAAGGCCAA-3'
	R	5'-AGCCTGGATGGCTACGTACA-3'

1. Tabula. Praimeru nukleotīdu secība, kas tika izmantoti pētījumā Sirds homogenātu pagatavošana

Sasaldētās peļu sirdis homogenizēja (1500 rpm; 10 min; 4°C), izmantojot stikla-teflona homogenizatoru, ledus aukstā homogenizācijas buferšķīdumā (20 mM HEPES, 150 mM KCl un 5 mM EDTA, kas saturēja 1 μM leupeptīnu un 100 μM PMSF) svāra tilpuma attiecībā 1:10. Iegūto homogenātu centrifugēja pie 2000 g 10 min 4°C. Supernatantu nodekantēja un izmantoja tālākām analīzēm.

Proteīnu daudzuma kvantificēšana ar poliakrilamīda gēlu un „Western blot” analīzi

Sirds homogenāta proteīni (40 μg) tika karsēti 90°C 3 min 2× buferšķīduma daudzumā (EC-886, National Diagnostics, Atlanta, GA) un sadalīti uz 10% SDS-Poliakrilamīda gēla 1 h pie 150 V. Elektroforēzes buferšķīdums saturēja 25 mM Tris bāzi, 192 mM glicīnu un 0.1% SDS. Proteīni tika uznesti uz PVDF membrānas (Immobilon, Millipore) blotēšanas buferšķīdumā (25 mM Tris bāze, 192 mM glicīns un 10% metanols (v/v)) 20 min laikā pie 180 mA. Membrānas tika krāsotas ar Ponceau S, lai pārlicinātos par identiska proteīna daudzuma uzņemšanu katrā paraugā. Tālāk membrānas 1 h tika apstrādātas ar 5% BSA PBS buferšķīdumā un pēc tam inkubētas 1 h istabas temperatūrā ar attiecīgajām truša monoklonālajām antivielām pret: GLUT-1, GLUT-4, HK II, INSR, CPT-1A, un β-aktīnu (visas koncentrācijā 1 μg/ml). Pēc nomazgāšanas ar

PBS (3 reizes, 10 min katru), Membrānu 30 min inkubēja istabas temperatūrā sekundāro antivielu šķīdumā (ar peroksidāzi konjugētas kazas antivielas pret truša IgG 1:15,000 (Chemicon/Millipore)). Membrānas tika attīstītas, izmantojot hemiluminiscences reaktīvus (Millipore). Tās pašas membrānas atkrāsotas (30 min pie 50°C buferšķīdumā, kas sastāvēja no 62.5 mM Tris bāzes, 2% SDS un 100 mM β-merkaptotetanolā) un vēlreiz nokrāsotas ar monoklonālo β-aktīna antivielu (0.2 µg/ml, ABCAM) un kas tālāk tika izmantots kā iekšējā kontrole.

Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana

Mildronāta, GBB un karnitīna koncentrācijas noteikšanai izmantoja UPLC/MS/MS metodi, kā iekšējo standartu izmantojot 3-(2,2-dimeil-2-prop-1-il-hidrazīnija)propionātu. Proteīnu izgulsnēšanai no analizējamā parauga (plazma, sirds un aortu homogenāti) tika izmantots metanola/acetonnitrila maisījums.

50-200 µl ekstrakta tika samaisīti ar 1,0 ml iekšējās standartvielas šķīdumu acetonnitrila/metanola šķīdumā (3:1, vol/vol). Iegūtais šķīdums tika savorteksēts un centrifugēts 20 min pie 10000 rpm. Supernatantu tālāk izmantoja UPLC/MS/MS analīzēm. UPLC analīzes tika veiktas, izmantojot Waters Acquity UPLC sistēmu, kolonas - Waters Acquity HILIC BEH 1,7 µm 2,1x100 mm, injekcijas tilpums 5 µl, eluēja ar 10 mM amonija acetātā šķīdumu (pH 4), plūsma 0,2 ml/min.

MS/MS analīzes tika veiktas izmantojot Micromass Quatro MicroTM tandēma masspektrometru. Datu apstrādei tika izmantota QuanLynx software (Waters) programmatūra.

Asins bioķīmisko parametru analīze

Glikoze un ketonvielas tika mērītas asinīs, izmantojot Optium Xceed asins glikometru (MediSense, Abbot, USA).

Asins paraugus, kas tika ņemti plazmas analīzei, centrifugēja pie + 4°C 10 min pie 3000 rpm. Plazmu atdalīja un sasaldēja – 80°C līdz turpmākajām analīzēm. Brīvās taukskābes, triglicerīdi, LDL, HDL un brīvais holesterīns tika kvantificēti izmantojot komerciāli pieejamos reaktīvu komplektus (Wako, Germany).

Insulīna un C-peptīda daudzuma noteikšanai, asinis savāca mēģenēs, kas saturēja EDTA/diimīdu un proteāžu inhibitorus (PMSF, pepstatīnu, leupeptīnu, aprotinīnu), centrifugēja + 4°C 10 min pie 3000 rpm un iegūto plazmu uzglabāja (- 80°C) līdz tālākai

analīzei. Insulīna un C-peptīda daudzums noteica, izmantojot RIA reaktīvu komplektus (Biotrend, Germany).

Perorālais glikozes tolerances tests

Žurkām paņēma „0” asins paraugu. Pēc 15 min žurkām tika *p.o.* ievadīta 2.0 g/kg glikoze un ņemti asins paraugi no astes vēnas pēc 15, 30, 45, 60, 120 un 240 min kopš glikozes ievadīšanas. Asins paraugos tūlīt pēc paņemšanas tika noteikta glikozes koncentrācija, izmantojot portatīvo glikozes mērītāju MediSense Precision QID.

NOHb daudzuma noteikšana asinīs

Eksperimenta dienā peles heparinizēja (1000 UI *i.p.*) un anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (50 mg/kg *i.p.*). Pēc narkozes iedarbošanās tām tika atvērts krūšu kurvis un ar 26 G adatu noņemtas venozās asinis no labā sirds kambara. Iegūtās asinis sasaldēja šķidrā slāpekļī un uzglabāja tajā līdz NOHb mērīšanas brīdim. NOHb daudzuma noteikšanai ar EPR spektroskopiju tika izmantota metode, ko iepriekš aprakstījis Dikalov et al. (Dikalov et al., 2005).

Superoksīda anjona noteikšana aortā

Pēc asiņu paņemšanas, NOHb daudzuma noteikšanai, pelēm tika izņemtas plaušas un sirds un uzmanīgi kopā ar aptverošajiem taukaudiem un saistaudiem tika izgriezta torakālā aorta. Aortu ievietoja atdzēsētā (+4°C) K-H buferšķīdumā, kas piesātināts ar karbogēnu, un attīrīja no saistaudiem un taukaudiem. Attīrīto aortu sagrieza gredzenos platumā no 3 līdz 4 mm, kas, izmantojot šķidro slāpekli, nekavējoties tika iesaldēti saldēšanas vidē OCT Tissue-Tek (Sakura, Nīderlande). Sasaldētās aortas sagrieza 30 μm biezos slaidos, ko uztvēra uz polilizīna pārklātiem priekšmetstikliņiem un nožāvēja. Iegūtos aortu griezumus inkubēja ar 5 μM DHE šķīdumu 30 minūtes mitrā gaismas necaurīdīgā kamerā 37°C. Nokrāsotos griezumus analizēja ar Leica MB 6000B mikroskopu (λ Ex: 488, Em: 520 nm; $\times 200$ palielinājumu), kas bija aprīkots ar TCS SP2 konfokālo sistēmu. Iegūto attēlu analīze tika veikta izmantojot Image-Pro Plus 4.5.1 programmatūru.

Aterosklerotiskā aplikuma daudzuma noteikšana aortā

Eksperimenta dienā dzīvniekiem *i.p.* ievadīja heparīnu 1000 IU/kg; 10 min pēc heparīna injekcijas peles anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg). Kad peles bija sasniegušas nepieciešamo narkozes dziļumu, tām atvēra krūšu kurvi, pārgriežot ribas pa

labi un pa kreisi no krūšu kaula. Punktēja sirds labo kambari un ņēma asinis bioķīmiskā sastāva novērtēšanai. Pēc asins parauga paņemšanas, veica iegriezumu sirds labajā kamarī un, punktējot sirds kreiso kambari, ievadīja 10 ml PBS, par sekmīgu kreisā kambara punkciju, PBS ievadīšanas laikā, liecināja aknu atkrāsošanās.

Pēc sekmīgas sirds un aortas izskalošanas, peli novietoja zem stereomikroskopa (Leica MZ6) un uzmanīgi izgriezta iekšējos orgānus, netraumējot aortu, aizkrūts dziedzeri, sidri un nieres. Tālāko aortas attīrīšanu veica, izmantojot mikropincetes (Dumont #5) un mikrodissekcijas šķērītes. Netraumējot aortu, tā tika attīrīta no saistaudiem un taukaudiem no tās sākuma līdz bifurkācijas vietai. Pēc aortas attīrīšanas nogrieza sirdi, pārgrieza zem atslēgas kaula un kreiso kopējo miega artēriju, brahiocefālisko stumbru (~2-3 mm no to sākuma) un abas kopējās iegurņa artērijas (~2-3 mm no to sadalīšanās vietas). Aortu pirms tālākas apstrādes glabāja 4% formalīna – PBS šķīdumā.

Aterosklerotiskā aplikuma daudzuma noteikšanai aortu gareniski pārgrieza un atvērtā veidā piestiprināja ar 0,1 mm adatiņām pie silikona blokiem un krāsoja ar Sudānu IV. Pēc krāsošanas aortas fotografēja ar Minolta D7 digitālo fotoaparātu. Fotografiju analīzi veica ar digitālo planimetrisko datorprogrammu Image-Pro Plus 4.5.1, savukārt matemātiskai un statistiskai datu apstrādei tika izmantotas Microsoft Excel un Grafpad Prism 3.0 programmas.

Aterosklerotiskā aplikuma laukuma noteikšana aortas saknē

Izņemto sirdi (sk. *Aterosklerotiskā aplikuma daudzuma noteikšana aortā*) fiksēja uz galdiņa virsmas tā, lai sirds priekšpuse atrastos uz augšu un nogrieza kambarus ~2 mm zem priekškambaru galotnēm, pirms griešanas skalpeli pagriežot par ~30° pret pulksteņa rādītāju griešanās virzienu. Sirds kambarus sasaldēja un homogenizēja to tālākai bioķīmiskai izpētei. Sirds pamatni ar priekškambariem iegremdēja saldēšanas vidē OCT Tissue-Tek (Sakura, Nīderlande), izspiežot gaisu no aortas saknes, un iesaldēja.

Sasaldēto sirds pamatni grieza, izmantojot kriostatu (Leica CM 1850) līdz griezumos varēja konstatēt pirmo pusmēness vārstuli, pēc pirmā vārstuļa atrašanās griezumā veica kriostata kustīgās galvas pozīcijas korekciju, lai aortas sakni pagrieztu perpendikulāri kriostata asmenim. Apmēram 100 μm attālumā no aortas saknes sākuma, kad veikta kriostata galvas pozīcijas korekcija un griezumā jau ir konstatējami visi trīs

pusmēness vārstuļi, sāka ņemt 10 µm biezus griezumus ik pa 100 µm, aterosklerotiskā aplikuma daudzuma noteikšanai. Iegūtos griezumus krāsoja ar ORO un zem mikroskopa fotografēja ar digitālo fotokameru Nikon Coolpix 5700. Fotografiju analīzi veica ar digitālo planimetrisko datorprogrammu Image-Pro Plus 4.5.1, savukārt datu apstrādei tika izmantota Microsoft Excel programma.

Asinsvadu reaktivitātes pētījumi izolētā aortā

Torakālā aorta tika uzmanīgi izgriezta un nekavējoties ievietota atdzesētā K-H buferšķīdumā, kas piesātināts ar 95% O₂ + 5% CO₂, pH=7.4. Izgriezto aortu attīrīja no saistaudiem un sagrieza 3 mm garos gredzenos. Iegūtos aortas gredzenus inkubēja orgānu vannā starp diviem nerūsējoša tērauda āķiem. Pēcāk gredzenus nostiepa līdz 4 g un ļāva 1 h adaptēties. Pēc adaptācijas perioda aortu maksimālo kontraktīlo funkciju noteica, pievienojot KCl (80 mM). Aortas gredzenus mazgāja un pievienoja fenilefrīnu tā, lai tiktu sasniegta ~80–90% no 80 mM KCl izraisītās kontrakcijas. Tālāk pievienoja acetilholīnu koncentrācijās no 10⁻⁹–10⁻⁶ M un nolasīja iegūtos rezultātus.

Glikozes uzņemšana izolētā sirds modelī

Eksperimentālās grupas: 1) kontrole; 2) mildronāts (100 µM), pievienots perfūzijas buferim; 3) insulīns (5 mU/ml), pievienots perfūzijas buferim; 4) mildronāts (100 µM) un insulīns (5 mU/ml), pievienoti perfūzijas buferim; 5) mildronātu (200 mg/kg) saņemušās peles sirds un 6) mildronātu (200 mg/kg) saņemušās peles sirds, kura tiek perfuzēta ar buferi, kam pievienots insulīns (5 mU/ml). Ja pele injekciju veidā pirms sirds izolēšanas saņēma mildronātu, tad mildronāts perfūzijas buferšķīdumam netika pievienots.

Sirds caur aortu tika kanulēta Langendorffa aparātā, kur tika perfuzēta ar K-H buferšķīdumu ar konstantu spiedienu (60 mmHg). Pēc 20 min adaptācijas perioda uz 10 min parasto K-H buferšķīdumu aizstāja ar K-H buferšķīdumu, kam glikoze aizstāta ar 5.55 mM 2-dezoksiglikozi (2-DOG) un 0.1 µCi/ml 2-dezoksi-D-[1-³H]glikozi. Pēc 10 min perfūzijas ar buferšķīdumu, kas satur 2-DOG, perfūzija 10 min tika turpināta ar parasto K-H buferšķīdumu. Pēcāk sirdis tika nosvērtas, sasmalcinātas un salizētas 1M NaOH šķīdumā. Siržu lizāti tika samaisīti ar scintilācijas šķīdumu (Perkin Elmer) un noteikts emitētās gaismas daudzums. Paralēli, lizātos arī tika mērīta proteīnu koncentrācija. Sirds muskuļa spēja uzņemt glikozi tika izteikta kā uzņemtās iezīmētās 2-DOG daudzums uz mg sirds proteīnu.

Eksperimentālais miokarda infarkts *in vitro*

Attiecīgajā eksperimenta dienā dzīvniekam *i.p.* ievadīja heparīnu (1000 U/kg) un narkotizēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg). Pēc narkozes iedarbošanās, žurkām tika atvērts krūšu kurvis un izņemta sirds, ko skaloja aukstā K-H buferšķīdumā (sastāvs mM: NaCl 118, CaCl₂ 2.52, MgCl₂ 1.64, NaHCO₃ 24.88, K₂HPO₄ 1.18, glikoze 10.0, EDTA 0.05) un kanulēja ADInstruments Langendorffa aparātā. Sirdis caur aortu retrogrādi tika perfuzētas ar konstantu perfūzijas spiedienu (60 mmHg) ar K-H buferšķīdumu, kas piesātināts ar 95% O₂ + 5% CO₂, pH=7.4. Uz diega cilpas ar atraumatisku adatu (5/0 Surgipro II) uzvēra kreisās priekšējās lejupejošās (LAD) artērijas zaru tā sākumposmā un diega galus izvēra caur katetra caurulīti. Koronāro plūsmu mērīja, izmantojot PowerLab8/30 sistēmu no ADInstruments.

Sirdij 20 min ļāva adaptēties un adaptācijas perioda noslēgumā noliģēja kreiso priekšējo lejupejošo artēriju, savēlkot diega cilpu un nofiksējot to. Pēc 60 min diegu atbrīvoja, izraisot reperfūziju. Pēc 150 min ilgas reperfūzijas LAD artēriju nosēja atkārtoti un ievadīja sirdī 3 ml 0.1% metilēnzilā šķīdumu, kas pagatavots uz K-H buferšķīdumā bāzes, lai nokrāsotu miokarda zonu, kas netika pakļauta hipoksijai. Sirds kambarus, sākot no galotnes līdz ligatūrai, sagriezta 2 mm biezus griezumus. Griezumus 10 min krāsoja 1% TFT šķīdumu PBS buferšķīdumā, pēc krāsošanas nogriezta labā kambara audus un fotografēja ar digitālo fotokameru Minolta 7D. Fotografiju analīzi veica ar digitālo planimetrisko datorprogrammu Image-Pro Plus 4.5.1, savukārt datu apstrādei tika izmantota Microsoft Excel programma.

Invazīvie asinsspiediena mērījumi

Eksperimenta dienā žurkas tika anestezētas izmantojot nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg) un tām kanulēja kreiso kopējo karotīdo artēriju un kanulu savienoja ar ADInstruments spiediena sensoriem un PowerLab reģistrācijas sistēmu. Noteica bazālos hemodinamiskos parametrus: sirds ritmu, arteriālo asinsspiedienu, + dp/dt un -dp/dt.

”Tail-flick” tests

„Tail-flick” testā žurkas asti novietoja uz „Tail-flick” aparāta (modelis DS20, Ugo Basile, Itālija) foto elementa, fokusējot infrasarkanu staru uz asti, 2 cm no tās pamatnes. Tika reģistrēts latentais atbildes laiks uz sāpju stimulu. Lai novērstu audu bojājumu,

maksimālais ekspozīcijas laiks bija 15 sekundes. Eksperimentu veica 8. nedēļā pēc mildronāta uzņemšanas sākuma.

”Hot plate” tests

„Hot plate” testā dzīvnieki tika novietoti uz uzsildītas metāliskas virsmas (plates t° - $56,5^{\circ}\text{C}$). Novēroja dzīvnieku atbildes reakcijas ilgumu (ķepu pacelšana un aplaizīšana), procedūru veica 2 reizes ar 5 min intervālu. Eksperimentu veica 8. nedēļā pēc mildronāta uzņemšanas sākuma.

Datu apstrāde

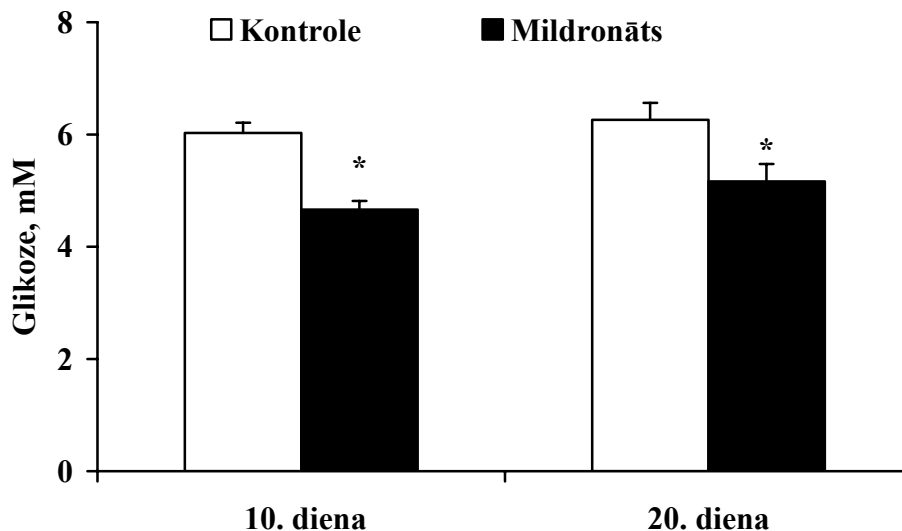
Datu apkopošanā un sistematizācijā tika izmantota programma Microsoft Excel 2002 for Windows un GraphPad Prism 3.00. Rezultātu ticamība tika pārbaudīta ar ANOVA un 2-tailed t-testu vai Kruskal-Walis testu ar sekojošu Mann-Whitney testu. Rezultāti tika uzskatīti par ticami atšķirīgiem, ja p vērtība bija mazāka par 0.05.

Rezultāti

Mildronāta ietekme uz glikozes metabolismu

Glikozes, insulīna, C-peptīda, lipīdu profila, karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija asins plazmā

Kontroles grupas pelēm asins glikozes koncentrācija bija vidēji 6 mM un tā nemainījās eksperimenta laikā. Akūta mildronāta ievadīšana devā 200 mg/kg *i.p.* neizmainīja asins glikozes koncentrāciju. Tomēr jau pēc mildronāta 10 ievadīšanas dienām devā 200 mg/kg *i.p.* tika konstatēts statistiski ticama asins glikozes līmeņa pazemināšanās, kas saglabājās līdz eksperimenta beigām (1. attēls).



1.Attēls. Mildronāta lietošanas ietekme uz glikozes koncentrāciju asinīs tukšā dūšā pēc 10 un 21 dienām mildronāta terapijas. Rezultāti parādīti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 15 dzīvniekiem. * $p < 0.05$ pret kontroles grupu.

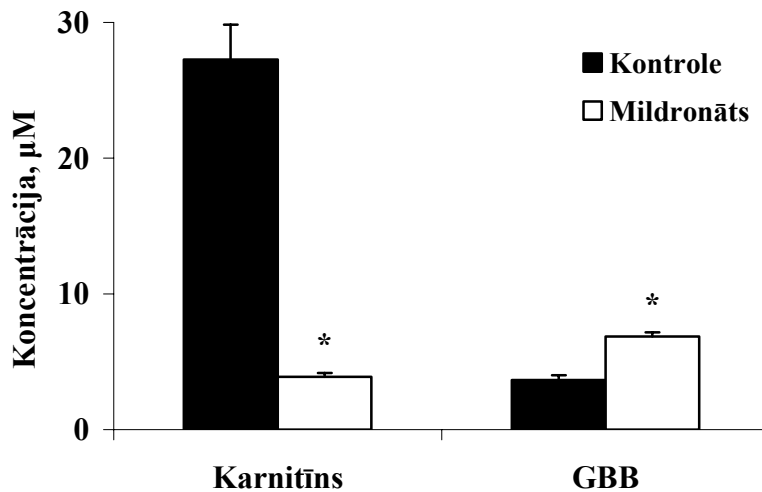
Mildronāta lietošanas ietekme uz citiem plazmas marķieriem apkopota 2. tabulā. Kā redzams 2. tabulā, trīs nedēļu mildronāta lietošana neietekmēja ne insulīna, ne C-peptīda līmeni. Mildronātu saņēmušo peļu asins plazmā tika konstatēta paaugstināta brīvo taukskābju koncentrācija. Kontroles grupā brīvo taukskābju koncentrācija bija 0.72 ± 0.06 mM, bet mildronātu saņēmušo peļu asins plazmā brīvo taukskābju koncentrācija bija 1.1 ± 0.1 mM ($p < 0.05$). Trīs nedēļu mildronāta terapija samazināja plazmas triglicerīdu līmeni par 18% un LDL-holesterīna līmeni par 29%, tomēr statistiski ticama atšķirība no

kontroles grupas tika konstatēta tikai LDL-holesterīna gadījumā. Mildronāta lietošana neietekmēja HDL-holesterīna līmeni (2. tabula).

	Kontrole	Mildronāts
Insulīns, ng/ml	0.9 ±0.18	0.96±0.10
C-peptīds, nM	1.1±0.13	1.1±0.09
Triglicerīdi, mM	1.1±0.12	0.86±0.06
Brīvās taukskābes, mM	0.72±0.06	1.1±0.1*
LDL, mg/dl	37.2±3.6	26.4±2.6*
HDL, mg/dl	51.6±2.0	49.8±1.5
Karnitīns, μM	27.2±1.9	3.9±0.3*
GBB, μM	3.1±0.1	6.9±0.3*
Mildronāts, μM	---	29.7±2.3

2. Tabula. Mildronāta 3 nedēļu lietošanas ietekme uz asins bioķīmisko sastāvu. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 10 dzīvniekiem. * p<0.05 pret kontroles grupu. Karnitīna, GBB un mildronāta saturs peļu sirds audos un plazmā

Vidējā karnitīna koncentrācija kontroles grupas dzīvnieku plazmā bija 27.2±1.9 μM, bet GBB koncentrācija - 3.1±0.1 μM. Kā redzams 2. tabulā, mildronāta koncentrācija asins plazmā eksperimenta beigās bija 29.7±2.3 μM, savukārt brīvā karnitīna koncentrācija bija samazinājusies 9 reizes (3.9±0.3 μM), bet GBB plazmas koncentrācija bija palielinājusies 2.5 reizes (6.9±0.3 μM).

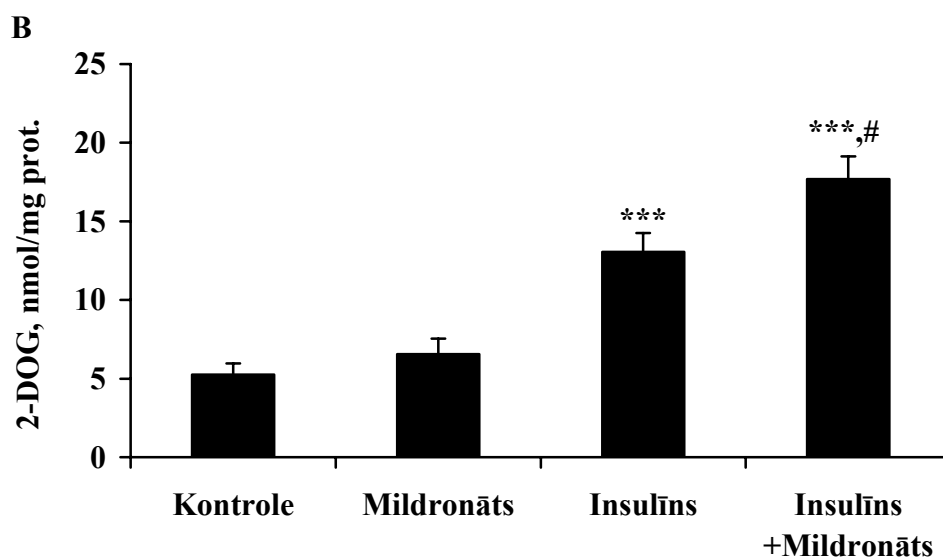
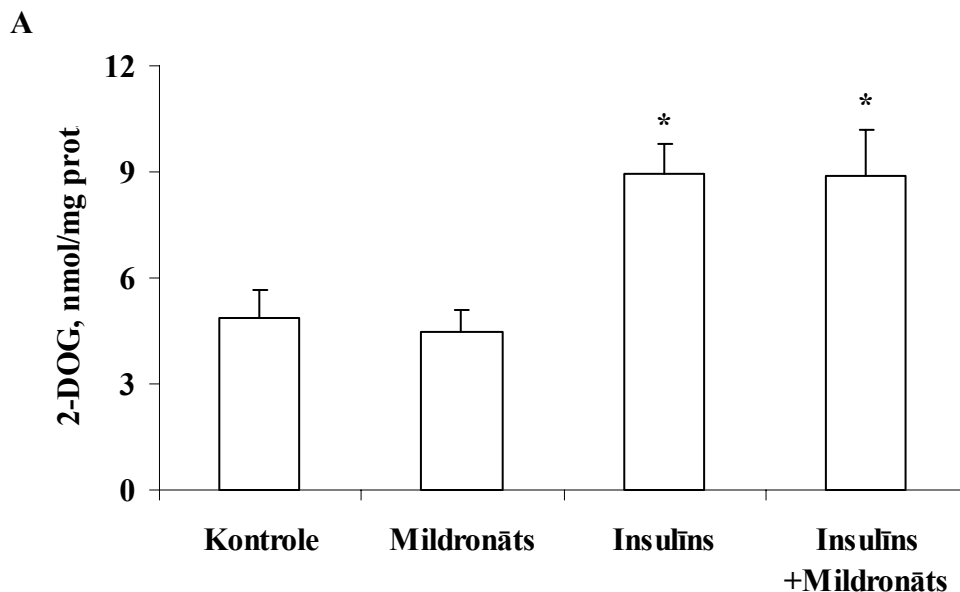


2. Attēls. Mildronāta lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB daudzumu sirds audos. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 10 dzīvniekiem. * p<0.05 pret kontroles grupu.

Sirds audu ekstraktu analīze parādīja, ka līdzīgi kā plazmā, tā arī sirds audos mildronāta lietošanas ietekmē bija izmainījušās GBB un karnitīna koncentrācijas (2. attēls). Kā redzams 2. attēlā, brīvā karnitīna koncentrācija pēc 21 dienu mildronāta kursa bija samazinājusies 4.5 reizes (no 1207 ± 130 nmol/g līdz 254 ± 16 nmol/g). Tajā pašā laikā GBB koncentrācija bija paaugstinājusies 6 reizes (no 22.1 ± 1.5 nmol/g līdz 134 ± 8.7 nmol/g). Mildronāta koncentrācija eksperimenta beigās bija 798 ± 34 nmol/g.

Glikozes uzņemšana izolētā peles sirdī

Peļu sirdīm, kas tika perfuzētas ar vai bez insulīna, bija praktiski vienāds kreisā kambara saraušanās spēks un koronārā plūsma. Peļu sirdis, kuru perfuzācijas buferim netika pievienots insulīns, glikozes uzņemšanas ātrums bija 5.3 ± 0.7 nmol/mg prot. (3. attēls (A)). Mildronāta ($100 \mu\text{M}$) pievienošana pie perfuzējāmā bufera neizmainīja glikozes uzņemšanu ne insulīna klātbūtnē, ne bez tā (3. attēls (A)). Pievienojot perfuzējamam buferim insulīnu (5 mU/ml), glikozes uzņemšanas ātrums palielinājās vidēji 2-2.5 reizes ($9.3 - 13.1 \pm 1.2$ nmol/mg prot.), salīdzinot ar kontroles līmeni. Salīdzinot glikozes uzņemšanu kontroles grupas un mildronātu saņēmušo peļu sirdīs, secinājām, ka mildronāta lietošana paaugstinājusi glikozes uzņemšanu par 25% (6.6 ± 1.1 nmol/mg prot.), savukārt, ja perfuzējamam buferim pievieno insulīnu, glikozes uzņemšana mildronātu saņēmušajās peļu sirdīs ir par 35% (17.7 ± 1.4 nmol/mg prot.) augstāka nekā kontroles grupas peļu sirdīs (3. attēls (B)).

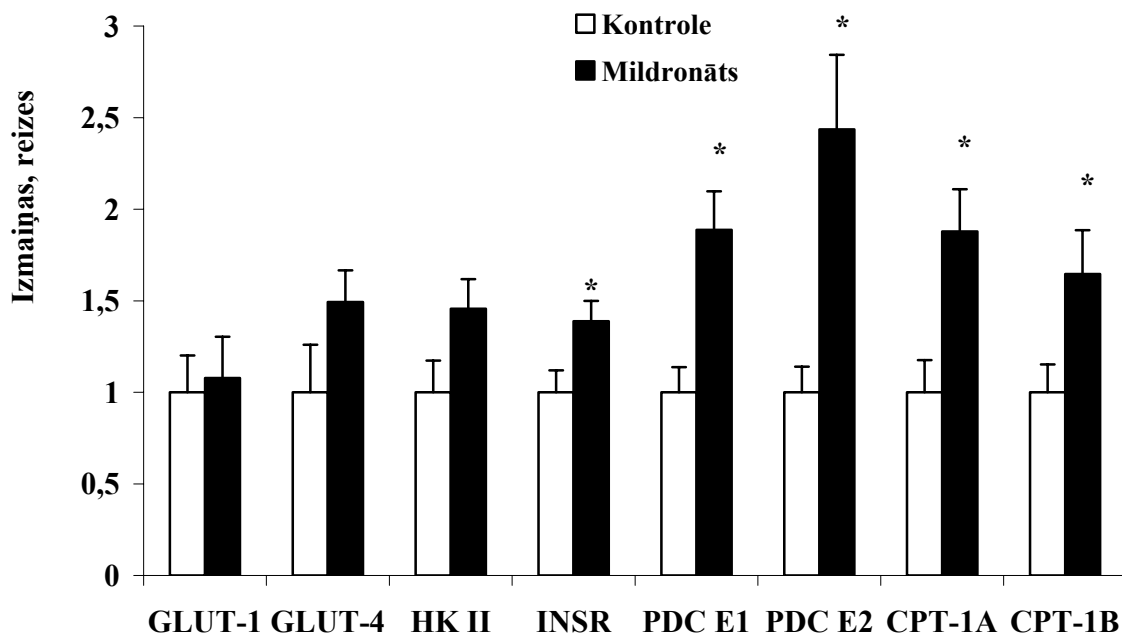


3. Attēls. Akūtas mildronāta (100 μ M) ievadīšana (A) un ilgstošas (21 diena) mildronāta (200mg/kg) ievadīšanas (B) ietekme uz glikozes uzņemšanu peļu sirdīs. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība \pm SEM no vismaz 12 dzīvniekiem. * $p < 0.001$ pret kontroles grupu; # $p < 0.01$ pret insulīna grupu.**

Ietekme uz mRNS transkripciju

Lai noskaidrotu mehānismu, kas nodrošina paaugstināto glikozes uzņemšanu sirdī, tika pētīta glikozes transportmolekulu un glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu mRNS transkripcija kontroles un mildronātu saņēmušo peļu sirdīs, izmantojot RT-PCR. Kā redzams 4. attēlā, tad mildronāta lietošana nebija ietekmējusi GLUT-1, GLUT-4 un HK

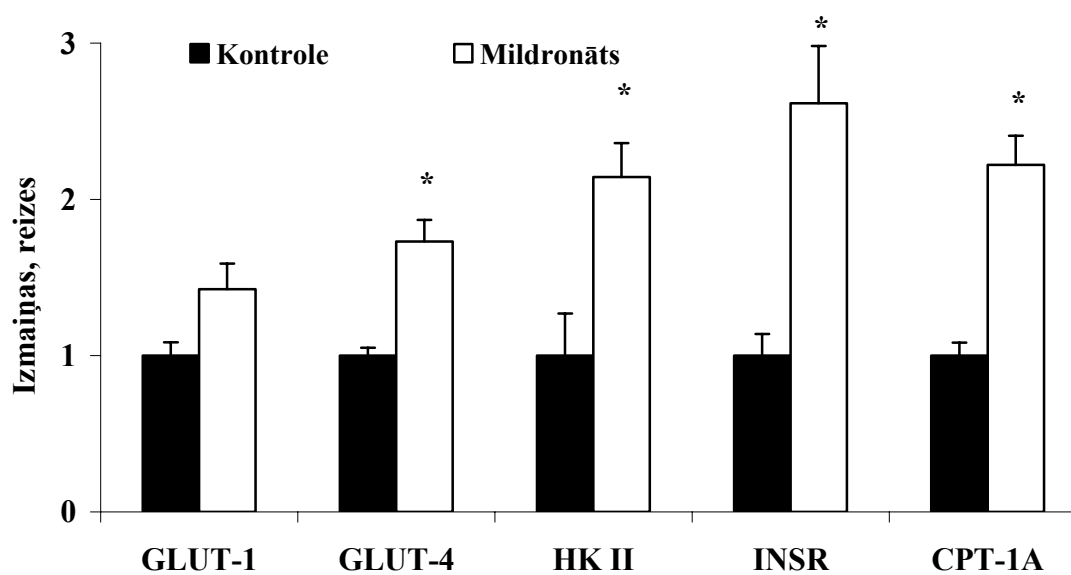
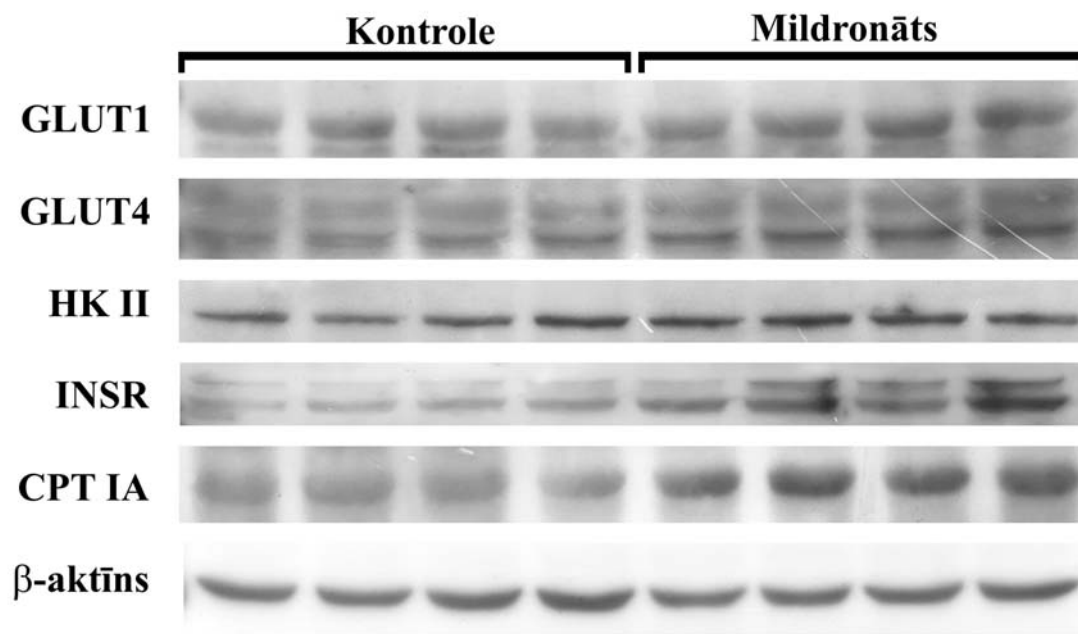
II atbilstošo mRNS transkripciju, savukārt PDC E1, PDC E2, CPT-1A un INSR mRNS transkripciju trīs nedēļu mildronāta terapija bija palielinājusi.



4. Attēls. Mildronāta lietošanas ietekme uz glikozes metabolismā iesaistīto molekulu, kā arī CPT 1A un 1B mRNS daudzumu. Rezultāti attēloti kā izmaiņas reizes \pm SEM no vismaz 12 pelēm. * $p < 0.05$ pret kontroles grupu.

Ietekme uz proteīnu ekspresiju

Rezultāti par mildronāta lietošanas ietekmi uz glikozes transportmolekulu un tās metabolismam nepieciešamo proteīnu ekspresiju apkopoti 5. attēlā. No iegūtajiem rezultātiem secinājām, ka GLUT-1 ekspresija bija palielinājusies 1.3 reizes, tomēr rezultāts nebija statistiski ticami atšķirīgs no kontroles. Savukārt statistiski ticami bija palielinājusies GLUT-4 ekspresija (1.7 reizes). Iegūto rezultātu analīze apliecināja, ka bez palielinātās GLUT-4 ekspresijas, bija arī palielinājusies HK II ekspresija (2.1 reizes), IRS ekspresija 2.5 reizes un CPT-1A 2.2 reizes, salīdzinot kontroles grupas un mildronātu saņēmušo dzīvnieku sirdis.

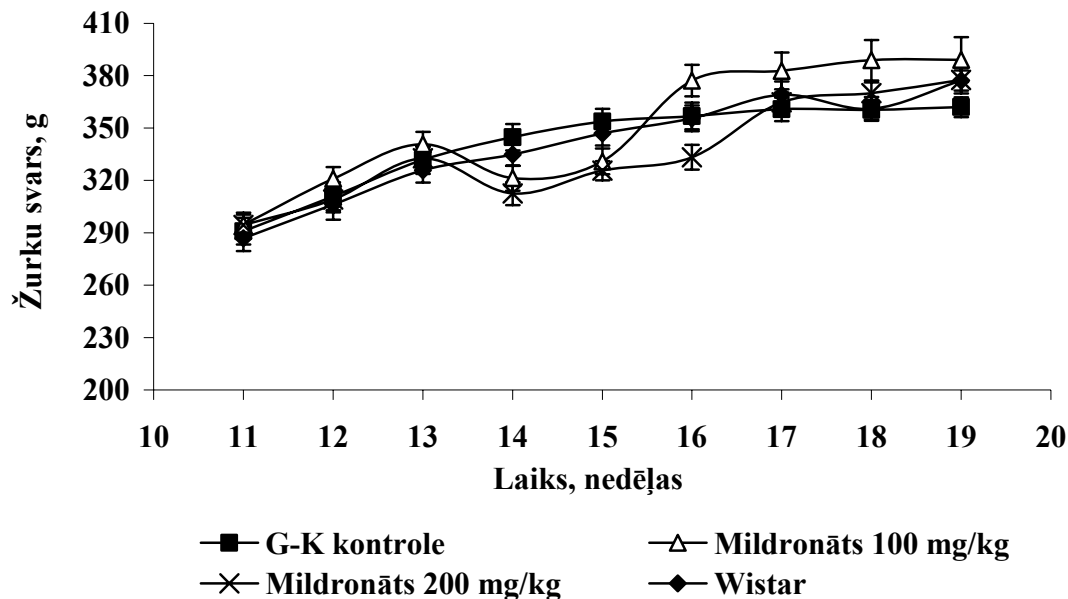


5. Attēls. Mildronāta lietošanas ietekme uz GLUT-1, GLUT-4, HK II, INSR un CPT-1A ekspresiju. Rezultāti attēloti kā izmaiņas reizes ± SEM no 4 sirdīm. * p<0.05 pret kontroles grupu.

Mildronāta ietekme uz diabēta attīstību G-K žurkās

Pēc G-K žurku adaptācijas perioda, tās bija sasniegušas 12 nedēļu vecumu, kad šīs līnijas dzīvniekiem spontāni attīstās 2. tipa diabēts (paaugstināta glikozes koncentrācija tukšā dūšā, palielināta insulīna un C-peptīda koncentrācija asinīs), sasniedzot pilnu ainu uz 14-16 dzīves nedēļu. Tāpēc eksperiments tika plānots tā, lai mildronāta ievadīšana tiktu uzsākta vēl pirms pilnas 2. tipa diabēta ainas uzsākšanās (12. nedēļā) un turpinātos 8 nedēļas.

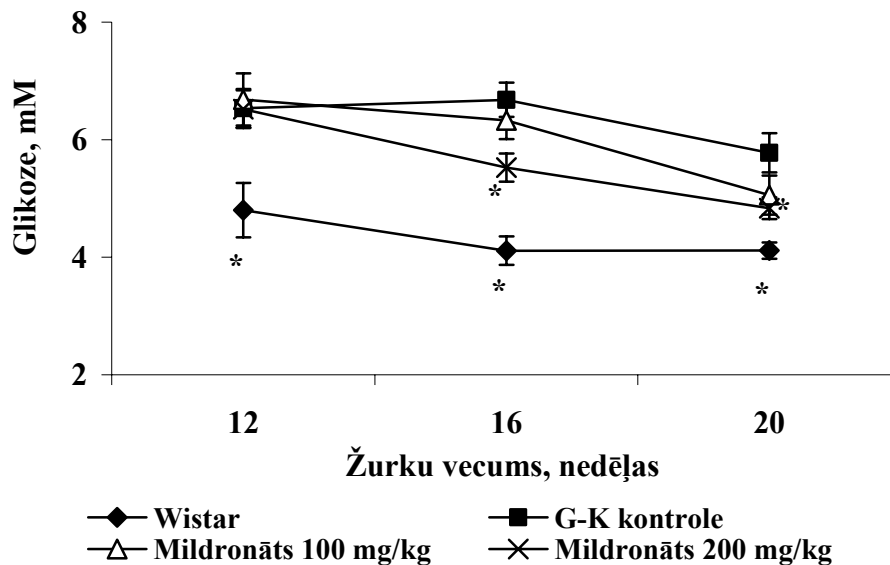
Kā redzams 6. attēlā, eksperimentā izmantoto žurku svars eksperimenta sākumā, eksperimenta gaitā un beigās bija vienāds, Wistar un G-K kontroles, gan mildronāta grupu dzīvnieki sākumā svēra 290 g, bet beigās vidēji 370 g.



6. Attēls. Eksperimentā izmantoto Wistar un G-K līnijas žurku svara izmaiņas.

Kā redzams 7. attēlā, jau eksperimenta sākumā, 12. nedēļā, G-K žurku glikozes koncentrācija asinīs tukšā dūšā ievērojami atšķīrās no Wistar kontroles dzīvniekiem (attiecīgi 6.6 un 4.8 mM). Pēc 4 nedēļām (16 ned. vecumā) G-K kontroles žurku glikozes līmenis asinīs būtiski nemainījās, bet pēc 8 nedēļām (20 ned. vecumā) nedaudz samazinājās līdz 5.8 mM, kas varētu būt saistīts ar glikozes līmeņa dabiskajām svārstībām. Mildronāts devā 100 mg/kg pēc 4 nedēļu ievadīšanas samazināja glikozes līmeni tukšā dūšā, tomēr statistiskas ticamības starp G-K kontroles grupu un 100 mg/kg

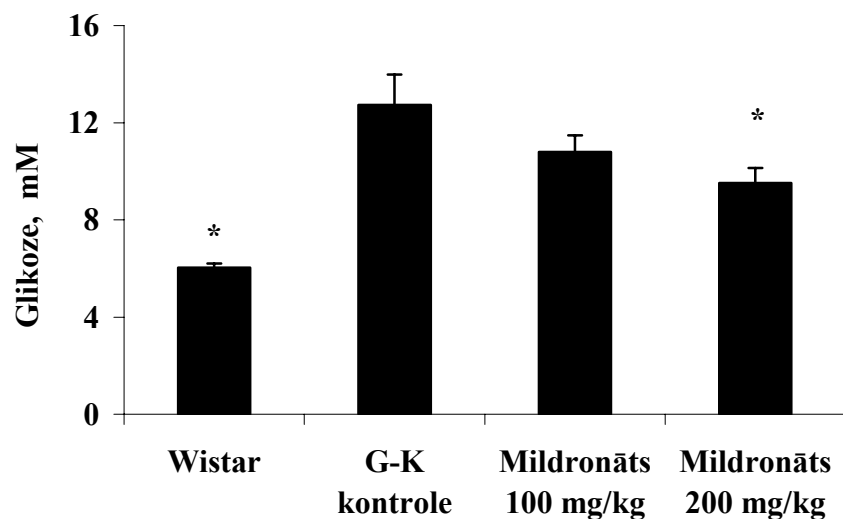
G-K grupām nebija, turpretim devā 200 mg/kg bija novērojams statistiski ticams glikozes līmeni samazinošs efekts (par 1.2 mM jeb 18% no G-K kontroles).



7. Attēls. Mildronāta ietekme uz asins glikozes līmeni tukšā dūšā G-K žurkām. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * $p < 0.05$ pret G-K kontroles grupu.

Kā redzams 7. attēlā, tad arī pēc 8 nedēļām mildronāta ievadīšanas devā 100 mg/kg glikozes koncentrācija asinīs tukšā dūšā samazinājās, tomēr efekts nebija statistiski ticams no kontroles grupas, bet mildronāta ievadīšana devā 200 mg/kg statistiski ticami samazināja glikozes līmeni gan no sākotnējā (par 1.7 mM jeb 28%), gan G-K žurku 20. dienas glikozes līmeņa (par 1mM jeb 17%).

Līdzīgs mildronāta efekts tika novērots eksperimenta 8 nedēļā, kur tika noteikta glikozes koncentrācija asins plazmā dzīvniekiem, kam bija pieeja barībai jeb barotiem dzīvniekiem. Wistar kontroles dzīvniekiem glikozes koncentrācija asins plazmā bija 6 mM, kamēr G-K kontroles dzīvniekiem tā bija 12.7 mM (8. attēls). Savukārt mildronāts devas atkarīgā veidā un statistiski ticami augstākajā devā (200 mg/kg devā) samazināja glikozes koncentrāciju. Devā 100 mg/kg glikozes asins koncentrācija bija samazināta līdz 10.8 mM (par 15%), bet 200 mg/kg attiecīgi līdz un 9.5 mM (25%).



8. Attēls. Mildronāta ietekme uz glikozes koncentrāciju barotu žurku asins plazmā pēc 8 nedēļu mildronāta ievadīšanas. Rezultāti attēloti kā vidēja vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * $p < 0.05$ pret G-K kontroles grupu.

Kā redzams 3. tabulā, G-K žurkām, salīdzinot ar Wistar līnijas žurkām, bija statistiski ticami zemāks insulīna līmenis asins plazmā, turklāt mildronāta ievadīšana devā ne 100, ne 200 mg/kg insulīna līmeni nepaaugstināja. Parasti 2. tipa diabēta gadījumā insulīna līmenis ir stipri augstāks kā Wistar kontroles dzīvniekos (9-12 ng/ml), kamēr mūsu G-K žurkās tas ir pat 2 reizes zemāks. Tas varētu nozīmēt, ka G-K žurkām 20 nedēļā varētu būt sācies pirmā tipa diabēts, jo līdzīgi ir pazemināts arī insulīna marķieris – C-peptīds (3. tabula), kas rodas tad, kad no proinsulīna rodas insulīns (izdalīšanās laikā no aizkuņģa dziedzera).

Kā jau novērots iepriekš, netika atrastas statistiski ticamas atšķirības starp Wistar, G-K kontroles žurku, kā arī mildronāta žurku asins plazmas brīvo taukskābju un LDL holesterīna koncentrācijām (3. tabula). G-K žurkām 20 nedēļā bija tendence palielināt HDL holesterīna līmeni, kamēr mildronāts nedaudz, bet statistiski ticami paaugstina to pat attiecībā pret G-K kontroli (3. tabula).

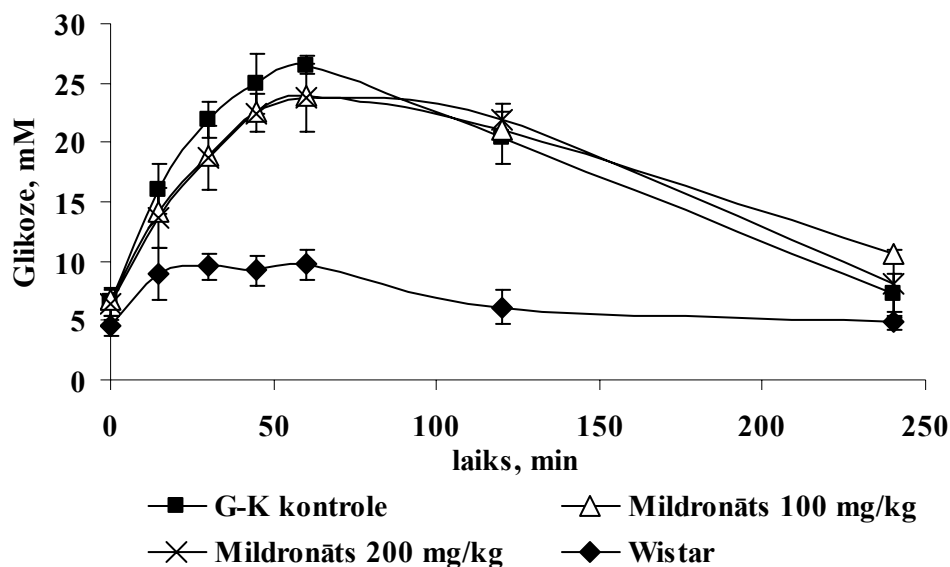
Nosakot kardiovaskulāro saslimšanu marķiera – C-reaktīvā proteīna koncentrāciju, statistiski ticama atšķirība starp grupām netika atrasta (3. tabula).

	Wistar	G-K kontrole	Mildronāts 100 mg/kg	Mildronāts 200 mg/kg
Fruktozamīns mM	0.41 ±0.05*	0.68 ±0.08	0.49 ±0.06*	0.45 ±0.06*
HDL-holesterīns, mg/dl	26.9 ±0.98	29.1 ±1.5	32.9 ±1.3*	32.7 ±0.98*
LDL-holesterīns, mg/dl	35.4 ±1.5	39.5 ±1.3	41.5 ±2.2	42.9 ±2.7
Brīvās taukskābes, mM	0.61 ±0.07	0.54 ±0.09	0.53 ±0.08	0.58 ±0.07
Insulīns, ng/ml	4.9 ±0.3*	2.1 ±0.3	1.7 ±0.2	2.1 ±0.3
C-reaktīvais proteīns, ng/ml	53.3 ±1.9	50.9 ±1.9	52.6 ±2.8	49.8 ±1.7

3. Tabula. Mildronāta lietošanas ietekme uz asins bioķīmisko sastāvu. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * p<0.05 pret G-K kontroles grupu.

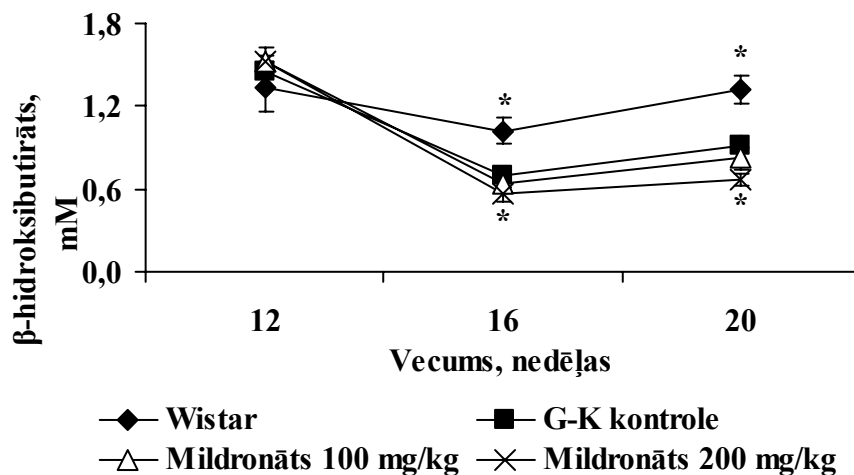
Kā redzams 3. tabulā, G-K kontroles grupas žurkām tika atrasta paaugstināta fruktozamīna koncentrācija asins plazmā, kas liecina par pastiprinātu asins proteīnu glikēšanos (neenzimātisku reakciju ar proteīniem) paaugstinātas glikozes koncentrācijas ietekmē. Atrasts, ka fruktozamīns ir diabēta komplikāciju marķieris, kas korelē ar glikozilēto hemoglobīnu. Savukārt, mildronāta ievadīšanas rezultātā fruktozamīna līmenis tika normalizēts, līdz devā 200 mg/kg šis efekts bija statistiski ticams.

Orālajā glikozes tolerances testā glikozes koncentrācijas palielinājums pēc tās ievadīšanas G-K žurkām jau 12. nedēļā būtiski atšķīrās no kontroles žurku glikozes līmeņa un šī atšķirība nemainījās ne 16. ne 20. žurku dzīves nedēļā. Mildronātam nebija būtiskas ietekmes uz glikozes koncentrāciju izmaiņām OGTT laikā ne pēc 4, ne 8 nedēļu ievadīšanas (9. attēls).



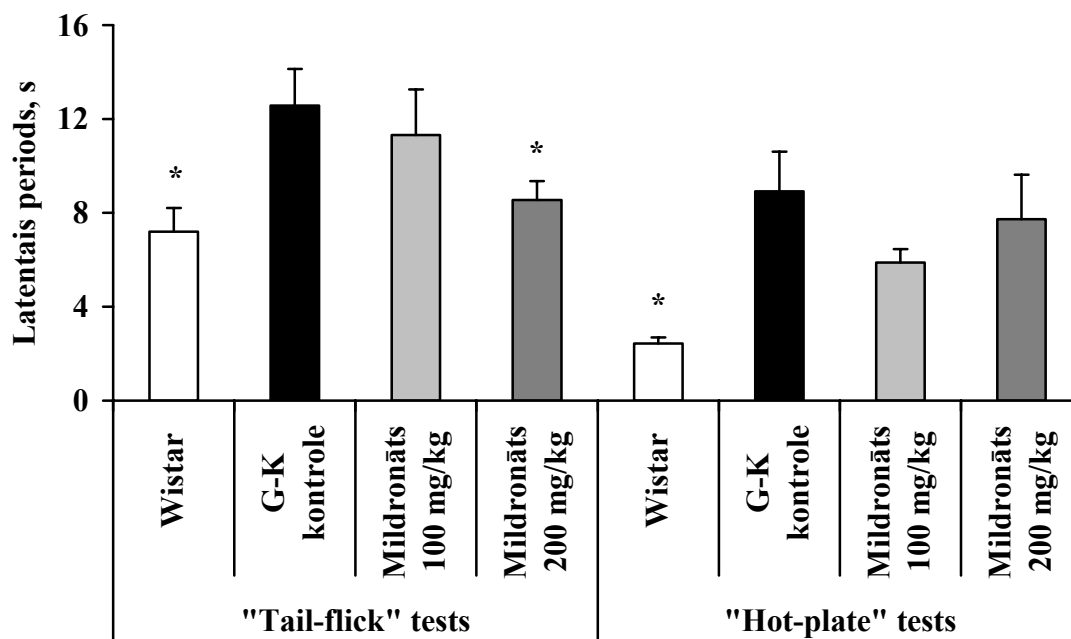
9. Attēls. Mildronāta ietekme uz glikozes toleranci testu pēc 8 nedēļu mildronāta ievadišanas. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība \pm SEM no vismaz 8 dzīvniekiem.

Kā redzams 10. attēlā, ketonvielu līmenis (β -hidroksibutirāts) 12 nedēļas vecās Wistar un G-K žurkās bija līdzīgs (attiecīgi 1.3 un 1.5 mM), tomēr gan pēc 4, gan 8 nedēļām jeb attiecīgi 16 un 20 nedēļu vecām G-K kontroles žurkām ketonvielu līmenis būtiski samazinājās līdz 0.9 mM, bet mildronāts devā 200 mg/kg statistiski ticami (pret G-K kontroli) vēl vairāk samazināja ketonvielu daudzumu žurku asins plazmā (0.7 mM). Šis ketonvielu samazinājums visticamāk saistīts ar taukskābju oksidēšanās kavēšanu, ko G-K kontroles žurkām izraisa salīdzinoši lielā insulīna koncentrācija.



10. Attēls. Mildronāta ietekme uz β -hidroksibutirāta līmeni žurku asinīs. Katrs punkts ir vidējā vērtība \pm SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * $p < 0.05$ pret G-K kontroles grupu.

Tika novērota žurku uzvedība „*tail flick*” un „*hot plate*” testos. „*Tail flick*” un „*hot plate*” testos novērojām statistiski ticamu atšķirību sāpju izpausmēs Wistar un G-K žurkām (11. attēls). Šie dati ļauj secināt, ka G-K žurkām ir diabēta rezultātā radušies neuroimpulsu pārnese traucējumi. Novērtējot mildronāta ietekmi, var secināt, ka „*tail flick*” testā tika novērota statistiski ticama neuroimpulsu pārnese uzlabošanās pēc mildronāta (devā 200 mg/kg) 8 nedēļu uzņemšanas ar dzeramo ūdeni. „*Hot plate*” testā statistiski ticamas izmaiņas G-K žurkās nebija.



11. Attēls. Mildronāta ietekme uz latento periodu „*Tail flick*” un „*Hot plate*” testā. Katrs punkts ir vidēja vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * $p < 0.05$ pret G-K kontroles grupu.

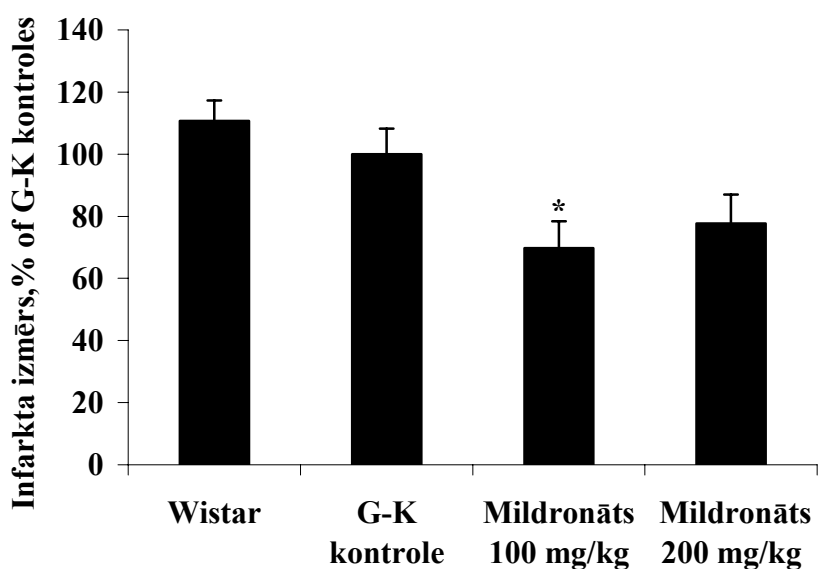
Invazīvie asinsspiediena mērījumi parādīja, ka būtiskas atšķirības starp sistolisko un diastolisko asinsspiedienu un sirds ritmu žurkām nenovēro (4. tabula). Līdzīgi ir arī ar sirds saraušanās un atslābšanas spēju *in vivo* jeb $\pm dp/dt$, kas raksturo cik ātri sirds spēj sarauties un atslābt. Arī šie parametri praktiski vienādi gan Wistar, gan G-K žurkām, kā arī netika novērojama būtiska mildronāta ietekme uz šiem radītājiem (4. tabula).

A	<i>In vivo</i>	Wistar	G-K Kontrole	Mildronāts 100 mg/kg	Mildronāts 200 mg/kg
	Sirds ritms, bpm	378±21	296±45	363±15	339±13
	Sistoliskais spiediens, mmHg	157±5	140±12	133±10	145±13
	Diastoliskais spiediens, mmHg	125±4	105±11	101±9	111±12
	+dp/dt, mmHg/s	989±160	931±143	981±132	1015±165
	-dp/dt, mmHg/s	-559±75	-533±56	-495±50	-540±64
B	<i>In vitro</i>				
	Sirds masas indekss, mg/g	2.2±0.3	2.2±0.2	2.3±0.4	2.4±0.2
	LVP, mmHg	44±5	52±6	47±5	47±4
	Sirds ritms, bpm	237±7	213±8	208±17	256±11
	Caurplūsma, ml/min	7.1±0.2*	5.8±0.3	6.3±0.8	6.8±0.2
	+dp/dt, mmHg/s	1365±209	1602±209	1490±96	1456±188
	-dp/dt, mmHg/s	-945±93	-1032±110	-1015±45	-937±86

4. Tabula. Mildronāta ietekme uz sirdsdarbības parametriem *in vivo* (A) un *in vitro* (B) pēc 8 nedēļu mildronāta ievadīšanas. Katrs punkts ir vidēja vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * p<0.05 pret G-K kontroles grupu.

Lai novērtētu iespējamo mazspējas attīstību, tika mērīti dažādi izolētās sirds parametri pirms infarkta ieskaitot sirds masas indeksu, kreisā kambara saraušanās spēku (LVP), sirds ritmu, caurplūsmu un saraušanās spēju. Tomēr nevienā no rādītājiem, izņemot sirds caurplūsmu, nebija atšķirības starp Wistar un G-K kontroles žurkām, kā arī netika novērota būtiska mildronāta ietekme uz šiem rādītājiem (4. tabula). Sirds caurplūsma G-K žurkām bija statistiski ticami zemāka, salīdzinot ar Wistar kontroli. Interesanti, ka mildronātam novērojama tendence palielināt sirds caurplūsmu.

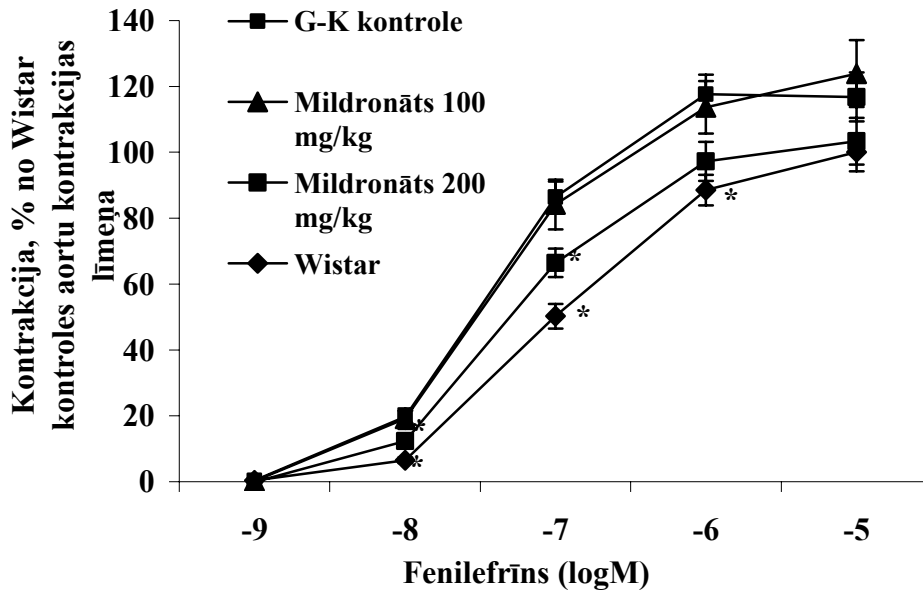
Wistar un G-K kontroles žurkām infarkta lielums praktiski neatšķiras, kamēr mildronāts devā 100 mg/kg statistiski ticami samazina infarkta lielumu par 24% (12. attēls). Kaut arī devā 200 mg/kg mildronāts samazināja infarkta lielumu, tomēr šis efekts nebija statistiski ticams.



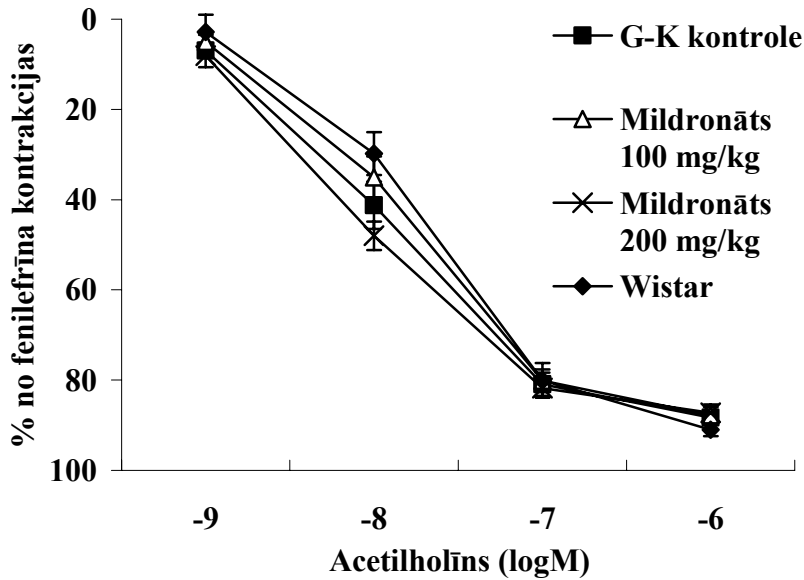
12. Attēls. Mildronāta uzņemšanas ietekme uz nekrozes zonas izmēru. Rezultāti parādīti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * p<0.05 pret G-K kontroles grupu.

Lai pētītu asinsvadu reaktivitātes izmaiņas diabēta ietekmē, tika veikts izolētas aortas eksperiments. Kā atrasts literatūrā, G-K žurkām novērojama pastiprināta jutība pret adrenomimētiskām vielām tajā skaitā fenilefrīnu. Arī mūsu žurkās tika novērota statistiski ticama sensitivitātes palielināšanās, kamēr mildronāta deva 200 mg/kg ticami novērš šo pastiprināto sensitivitāti (13. attēls). Līdz ar to, var secināt, ka mildronāts devā 200 mg/kg aizsargā asinsvadu sienīgu un bremzē tālāku bojājumu attību.

Acetilholīna relaksējošā ietekme Wistar un G-K kontroles žurku aortās nebija atšķirīga, kā arī mildronāta ievadīšana neizraisīja endotēlija-atkarīgās relaksācijas izmaiņas (14. attēls).



13. Attēls. Mildronāta ietekme uz žurku izolētu aortu kontrakcijām dažādu fenilefrīna koncentrāciju ietekmē pēc 8 nedēļu mildronāta ievadišanas. Katrs punkts izteikts procentos no Wistar žurku aortu gredzenu kontraktcijas un ir vidēja vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. * p<0.05 pret G-K kontroles grupu.

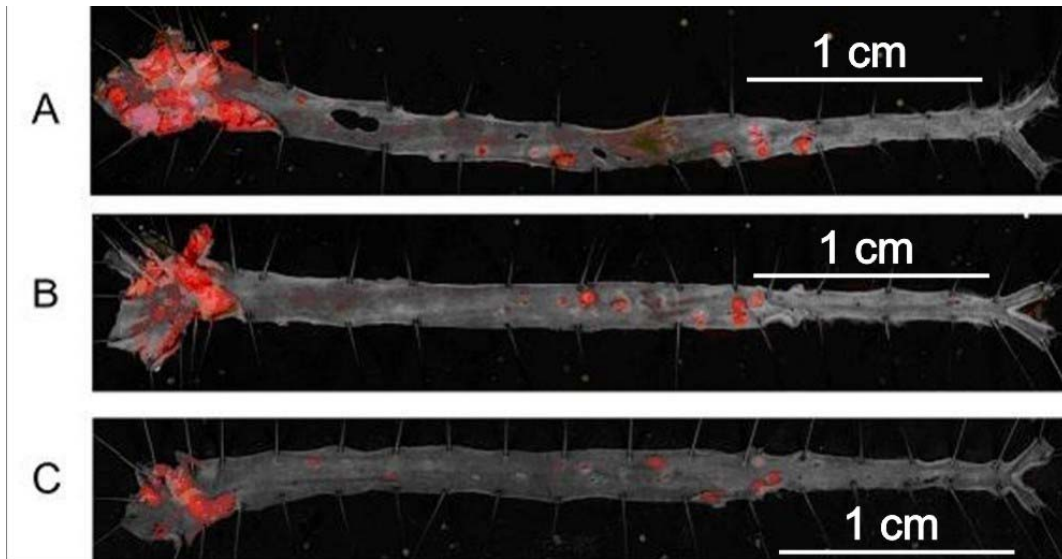


14. Attēls. Mildronāta ietekme uz izolētu žurku aortu relaksāciju dažādu acetilholīna koncentrāciju ietekmē pēc 8 nedēļu mildronāta ievadišanas. Katrs punkts izteikts procentos no maksimālās kontraktcijas un ir vidēja vērtība ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem.

Mildronāta ietekme uz aterosklerozes attīstību

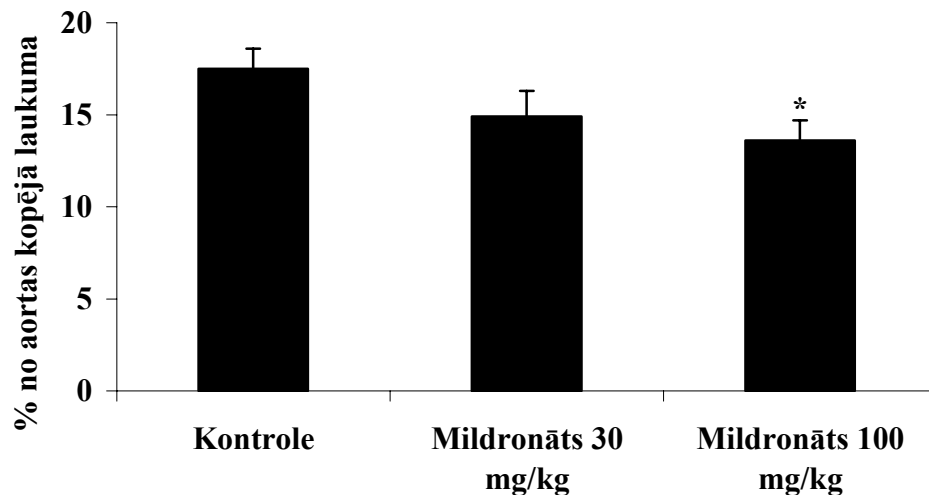
Mildronāta ietekme uz aterosklerotisko pangu daudzumu apoE/LDLR^{-/-} peļu aortās

Pēc aortu audu sagatavošanas, aterosklerotiskā aplikuma krāsošanas un fotografēšanas, kā aprakstīts metožu sadaļā, tika veikta attēlu planimetriskā analīze. Kā redzams 15. attēlā, tad visu trīs grupu dzīvnieku aortās aterosklerotiskais aplikums (sārtās zonas) bija izveidojies aortas lokā un bija konstatējamas arī aortas abdominālajā daļā.



15. Attēls. Aterosklerotiskais aplikums 6 mēnešus vecās kontroles (A) un mildronātu saņēmušo (B - 30 mg/kg; C - 100 mg/kg) apoE/LDLR^{-/-} peļu aortās. Rozā zonas aortās attēlo aterosklerotisko bojājumu lokalizāciju.

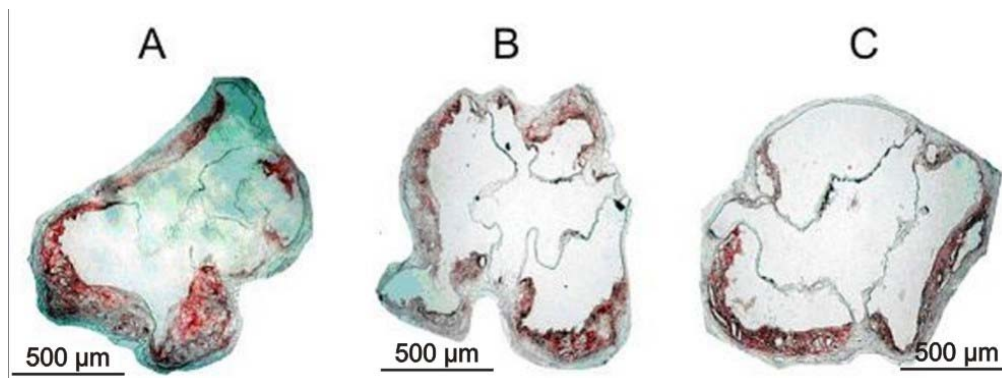
Pēc aortu attēlu planimetriskās analīzes, secinājām, ka mildronāta uzņemšana devā 100 mg/kg bija statistiski ticami samazinājusi aterosklerotisko bojājumu veidošanos. Kontroles grupā aterosklerotiskās pangas bija noklājušas $18\pm 1\%$ no aortas laukuma, bet mildronāta 100 mg/kg grupā, pangas bija pārklājušas tikai $14\pm 1\%$ no kopējā aortas laukuma. Mildronāts devā 30 mg/kg, lietots četrus mēnešus, arī samazināja kopējo aterosklerotisko pangu laukumu ($15\pm 1\%$ no kopējā aortas laukuma), bet šis samazinājums statistiski ticami neatšķīrās no kontroles grupas (16. attēls).



16. Attēls. Mildronāta ietekme uz aterosklerotiskā aplikuma daudzumu apoE/LDLR^{-/-} peļu aortās. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no 10 dzīvniekiem. * p<0.05 pret kontroles grupu.

Mildronāta ietekme uz aterosklerotiskā aplikuma laukumu aortas saknē

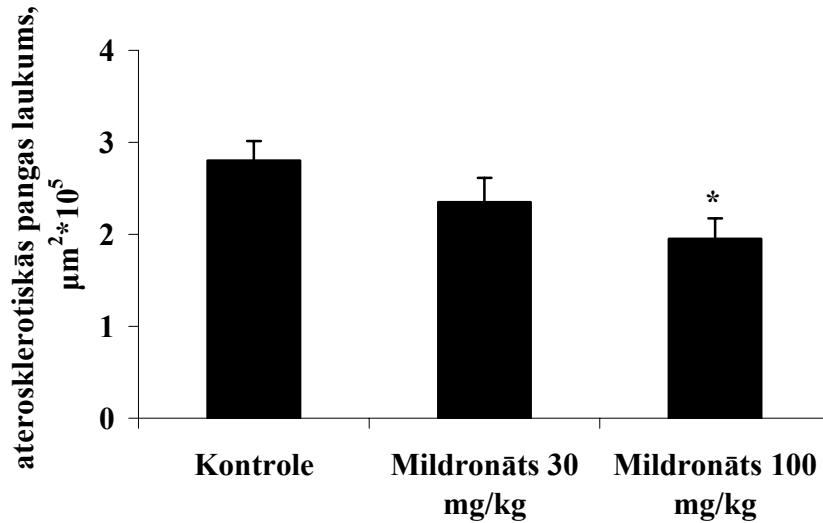
Līdzīgi kā aortās, tā arī aortas saknē mildronāts samazināja aterosklerotisko pangu veidošanos aortas saknē un pie pusemēnes vārstuļiem. Kā redzams 17. attēlā, tad kontroles dzīvnieku aortas saknē aterosklerotiskais aplikums aizņem lielu daļu no aortas lūmena. Turpretim to peļu aortu saknēs, kuras kopā ar dzeramo ūdeni saņēmušas mildronātu, aterosklerotiskais aplikums ir acīmredzami mazāk.



17. Attēls. Aterosklerotiskais aplikums 6 mēnešus vecās kontroles (A) un mildronātu saņēmušo (B - 30 mg/kg; C - 100 mg/kg) apoE/LDLR^{-/-} peļu aortu saknēs.

Planimetriski analizējot aterosklerotiskā aplikuma daudzumu, varējām secināt, ka mildronāts devā 30 mg/kg *p.o.* samazināja aterosklerotiskā aplikuma daudzumu, tomēr rezultāts nebija statistiski ticams. Turpretim 100 mg/kg *p.o.* mildronāta kurss statistiski ticami samazināja aterosklerotiskā aplikuma daudzumu apoE /LDLR^{-/-} peļu aortu saknē.

Kontroles peļu aterosklerotiskā aplikuma laukums pie pusmēness vārstulēm bija $2.8 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \cdot 10^5$, savukārt mildronātu saņēmušo (100 mg/kg) peļu aortu saknēs tas bija tikai $2.0 \pm 0.2 \mu\text{m}^2 \cdot 10^5$ (18. attēls).



18. Attēls. Mildronāta ietekme uz aterosklerotiskā aplikuma daudzumu apoE/LDLR^{-/-} peļu aortu saknēs. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība \pm SEM no 10 dzīvniekiem. * $p < 0.05$ pret kontroles grupu.

Mildronāta lietošanas ietekme uz lipīdu homeostāzes marķiermolekulām

Lai noteiktu mildronāta lietošanas ietekmi uz lipīdu metabolismu un lai pētītu eksperimentāli apstiprināto mildronāta antiaterosklerotiskā efekta bioķīmiskās iedarbības mehānisma pamatus, tika veiktas asins plazmas paraugu analīzes, izmantojot komerciāli pieejamos reaktīvu komplektus. Pēc izdarītajiem mērījumiem varējām secināt, ka 4 mēnešu mildronāta lietošana nebija ietekmējusi ne brīvo taukskābju, ne LDL-holesterīna, ne HDL-holesterīna, ne kopējā holesterīna, ne triglicerīdu koncentrāciju asins plazmā (5. tabula).

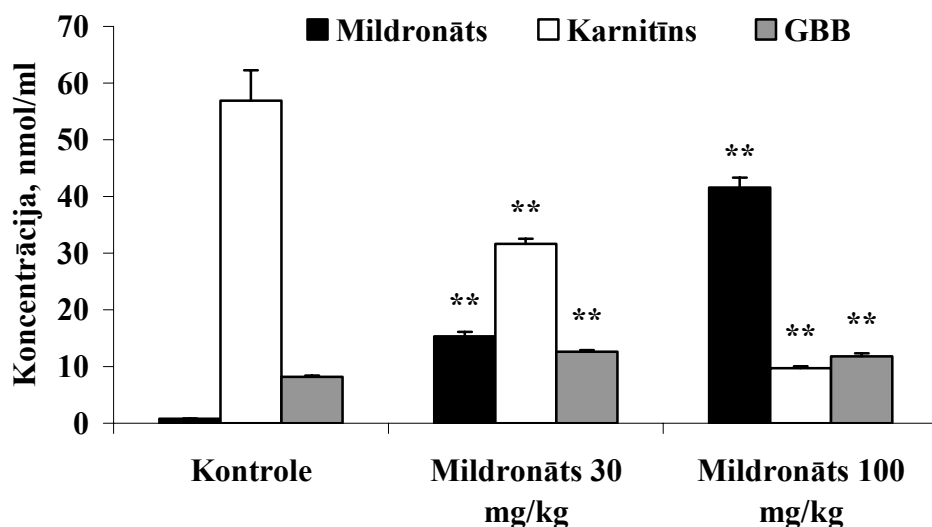
	Kontrole	Mildronāts 30 mg/kg	Mildronāts 100 mg/kg
Brīvās taukskābes, mM	1.57±0.3	1.59±0.4	1.48±0.3
Triglicerīdi, mg/dl	42.6±2.3	42.5±1.5	42.4±1.3
Brīvais holesterīns, mg/dl	152.9±6.9	139.6±5.9	130.8±6.3*
LDL-holesterīns, mg/dl	121.9±3.6	129.7±6.5	122.9±3.8
HDL-holesterīns, mg/dl	66.1±4.4	63.5±4.1	66.8±4.2
Kopējais holesterīns, mg/dl	341±30	326±19	322±25

5. Tabula. Mildronāta lietošanas ietekme uz lipīdu homeostāzes marķiermolekulām. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no 10 dzīvniekiem. * p<0.05 pret kontroles grupu.

Izmērot brīvā holesterīna koncentrāciju apoE/LDLR^{-/-} peļu asins plazmā, konstatējām, ka mildronāta ievadīšana šajā gadījumā bija izraisījusi devas atkarīgu brīvā holesterīna koncentrācijas samazināšanos. Kā redzams 5. tabulā, mildronāta 30 mg/kg grupas peļu plazmā novērojams neliels brīvā holesterīna samazinājums, bet mildronāta 100 mg/kg grupas gadījumā samazinājums sasniedz statistiski ticama efekta līmeni.

Mildronāta, GBB un karnitīna saturs sirds audos

Sirds audu hromatogrāfiskā analīze parādīja, ka 4 mēnešu laikā dzerot ūdeni, kam pievienots mildronāts, apoE/LDLR^{-/-} peļu sirds audos, bija novērojamas devas atkarīgas izmaiņas GBB un karnitīna koncentrācijās, kā arī atbilstošs mildronāta koncentrācijas pieaugums. Kā redzams 19. attēlā, karnitīna koncentrācija kontroles grupas peļu siržu ekstraktos bija 56.9±5.4 nmol/ml, bet mildronāta 30 un 100 mg/kg grupās karnitīna koncentrācija statistiski ticami atšķīrās no kontroles grupas vērtības un bija, atbilstoši 31.7±0.9 nmol/ml un 9.7±0.4 nmol/ml. Turklāt ticami atšķīrās arī karnitīna koncentrācija mildronāta 30 mg/kg un 100 mg/kg grupu dzīvnieku siržu ekstraktiem savā starpā (19. attēls).



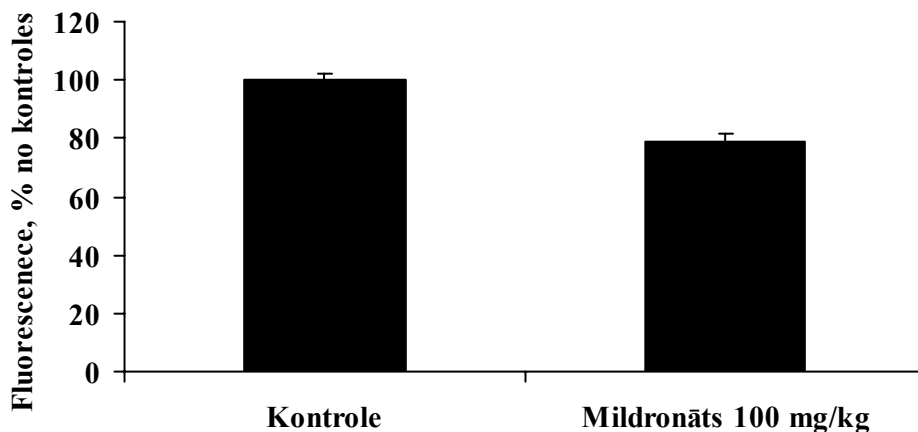
19. Attēls. Mildronāta ietekme uz GBB un karnitīna līmeni sirds audos apoE/LDLR^{-/-} pelēs, Rezultāti attēloti kā vidējais ± SEM no 10 dzīvniekiem. ** p<0.01 pret kontroles grupu.

Līdzīgā veidā atšķirās arī GBB koncentrācija visu triju grupu dzīvniekiem. Ja kontroles grupā GBB koncentrācija bija 8.2 ± 0.3 nmol/ml, tad mildronāta 30 mg/kg grupā – 12.6 ± 0.3 nmol/ml un 100 mg/kg – 11.8 ± 0.6 nmol/ml. Jāatzīmē, ka statistiski ticami atšķirās GBB līmenis abu mildronāta ievadīšanas grupu gadījumā no kontroles grupas līmeņa, bet savā starpā 30 mg/kg un 100 mg/kg grupu peļu sirds audu ekstraktos atrastā GBB koncentrācija statistiski ticami neatšķirās.

Mildronāta 30 mg/kg grupas gadījumā sirds audu ekstraktos atrastā mildronāta koncentrācija bija 15.3 ± 0.8 nmol/ml, bet mildronāta 100 mg/kg grupai gandrīz 3 reizes augstākā līmenī: 41.6 ± 1.7 nmol/ml.

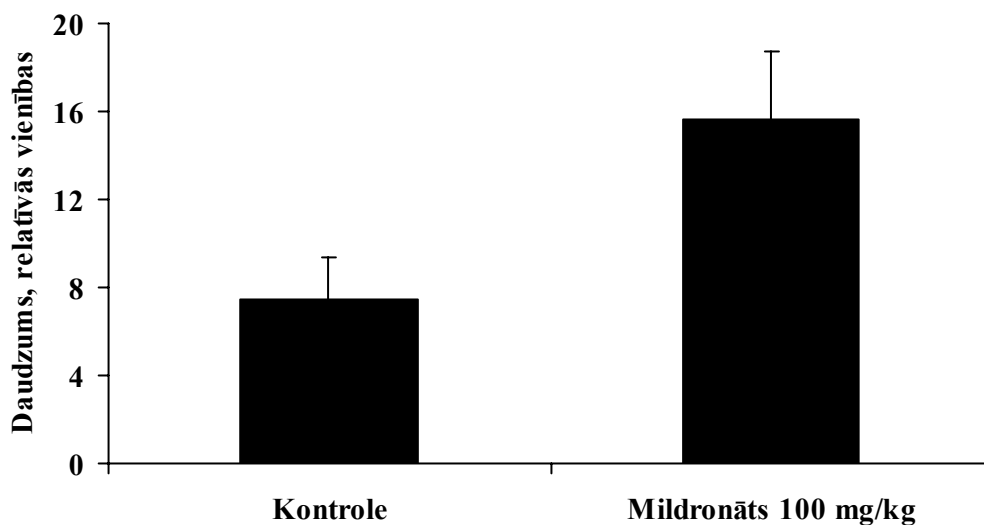
Ietekme uz superoksīda anjona producēšanos aortas sienīnā un NOHb koncentrāciju apoE^{-/-} peļu asinīs.

Sarkanā fluorescence, kas rodas fluorescējot etīdijam, kas radies reakcijā starp DHE un superoksīda anjonu, apliecināja, superoksīda rašanos gan asinsvada gludajā muskulatūrā, gan endotēlijā. Kā redzams 20. attēlā, mildronāta 4 mēnešu terapija deva 100 mg/kg/dienā bija samazinājusi superoksīda anjona produkciju par 21% salīdzinājumā ar kontroles grupas dzīvnieku līmeni ($p < 0.07$).



20. Attēls. Mildronāta ietekme uz superosīda anjona rašanos apoE^{-/-} peļu aortas sienā. Rezultāti izteikti kā % no kontroles un attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no 5 pelēm.

21. Attēlā parādīta mildronāta lietošanas ietekme uz NOHb līmeni apoE^{-/-} peļu asinīs. Kontroles grupas dzīvniekiem tas bija vidēji 8 ± 2 relatīvās vienības, bet mildronātu saņēmušo dzīvnieku asinīs tā koncentrācija bija divas reizes augstāka (16 ± 3 relatīvās vienības).

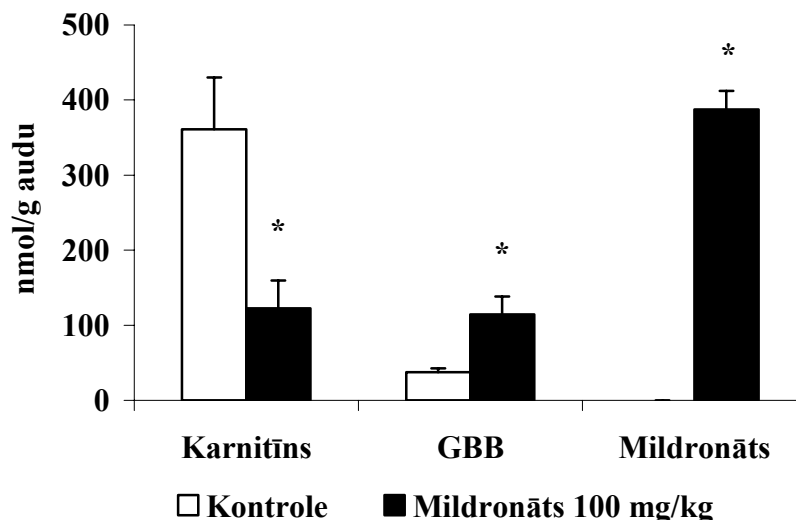


21. Attēls. Mildronāta ietekme un NOHb koncentrāciju apoE^{-/-} peļu asinīs. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 4 dzīvniekiem.

Mildronāta lietošanas ietekme uz GBB un karnitīna koncentrāciju žurku aortas audos.

Mildronāta lietošana devā 100 mg/kg, līdzīgi kā sirds audos un asins plazmā, samazināja karnitīna un palielināja GBB koncentrāciju aortas audos (22. Attēls). Karnitīna koncentrācija aortas audos samazinājās 3 reizes (no 361±69 nmol/g līdz

122±22 nmol/g), savukārt GBB koncentrācija palielinājās 3 reizes (no 38±5 nmol/g līdz 114±24 nmol/g).



22. Attēls. Mildronāta lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrācijām žurkas aortas audos. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no 10 dzīvniekiem. * p<0.05 pret kontroles grupu.

Mildronāta ietekme uz GBB un karnitīna koncentrāciju izmaiņām un to saistība ar kardioprotektīvo efektu

Ietekme uz GBB un karnitīna koncentrācijām žurku plazmā un sirds audos.

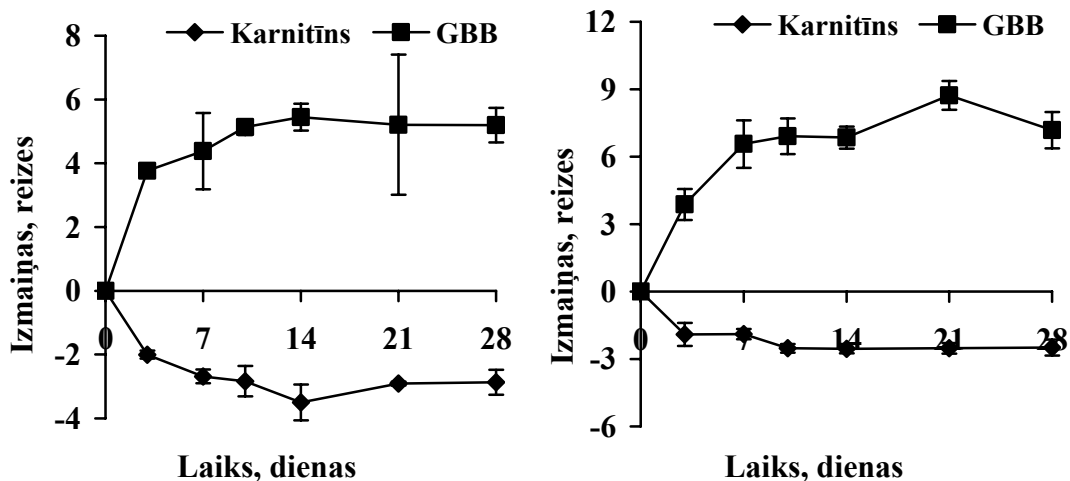
Mildronāta ievadīšana devā 100 mg/kg *i.p.* izraisīja ievērojamu karnitīna koncentrācijas samazināšanos un GBB koncentrācijas palielināšanos gan asins plazmā, gan miokardā. Iegūtie rezultāti aplūkojami 23. attēlā un 6. tabulā. Vidējā karnitīna koncentrācija kontroles grupas dzīvnieku plazmā bija 72.6±4.7 μM, savukārt GBB koncentrācija kontroles grupas dzīvnieku asnis plazmā bija 2.3±0.1 μM. Mildronāta koncentrācija asins plazmā paaugstinājās pakāpeniski, sasniedzot plato koncentrāciju (virs 30 μM) pēc 14 dienām. Karnitīna koncentrācija asins plazmā visstraujāk samazinājās mildronāta lietošanas pirmās nedēļas laikā, sasniedzot plato koncentrāciju vidēji ap 25 μM. Ja skatāmies uz GBB koncentrāciju, tad varam secināt, ka GBB koncentrācija pamazām palielinājās, sasniedzot savu plato koncentrāciju (12 μM) ~10

dienā. Kā redzams 23. attēlā, 14 dienu mildronāta ievadīšana samazināja plazmas karnitīna koncentrāciju 3 reizes un palielināja GBB koncentrāciju vairāk nekā 5 reizes.

Laiks, dienas	Plazma			Sirds		
	Karnitīns	GBB	Mildronāts	Karnitīns	GBB	Mildronāts
0	72.6±4.7	2.3±0.1	—	1894±40	33 ±5	—
1	48.2±8.0	6.3±0.5	16.2±1.3	1282±196	127±23	598±136
3	36.2±2.2	8.7±0.16	22.2±6.2	995±195	127±23	598 ±136
7	27.0±2.2	10.2±2.8	16.2±6.0	998±111	215±35	674 ±106
10	25.6±4.3	11.9±0.57	22.2±2.6	751±55	226 ±26	790 ±22
14	20.7±3.3	12.6±1.0	35.7±3.3	745±59	224 ±16	866 ±82
21	25.0±0.5	12.1±5.1	33.8±0.0	751±70	286 ±21	907 ±41
28	25.3±3.4	12.0±1.2	34.4±2.2	759±93	235 ±27	841 ±34

6. Tabula. Mildronāta terapijas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrācijām asins plazmā un sirdī. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 3 dzīvniekiem.

Sirds ekstraktu analīze parādīja līdzīgas GBB un karnitīna koncentrāciju izmaiņas, kas bija notikušas mildronāta lietošanas rezultātā. Kā redzams 23. attēlā un 6. tabulā, mildronāta ievadīšana bija izraisījusi divkārtīgu karnitīna koncentrācijas samazinājumu (no 1894±40 līdz 995±195 nmol/g) sirds audos jau pēc 3 mildronāta lietošanas dienām un pēc 10 mildronāta lietošanas dienām sasniedza savu plato koncentrāciju (745±60 nmol/g). Tajā pašā laikā GBB koncentrācija sirds audos paaugstinājās līdz pat 7 reizēm (no 32.8±4.9 līdz 226±26 nmol/g). Mildronāta koncentrācija, līdzīgi kā plazmā, paaugstinājās pamazām pirmās 14 terapijas dienas, pēc tam sasniedzot savu plato koncentrāciju.

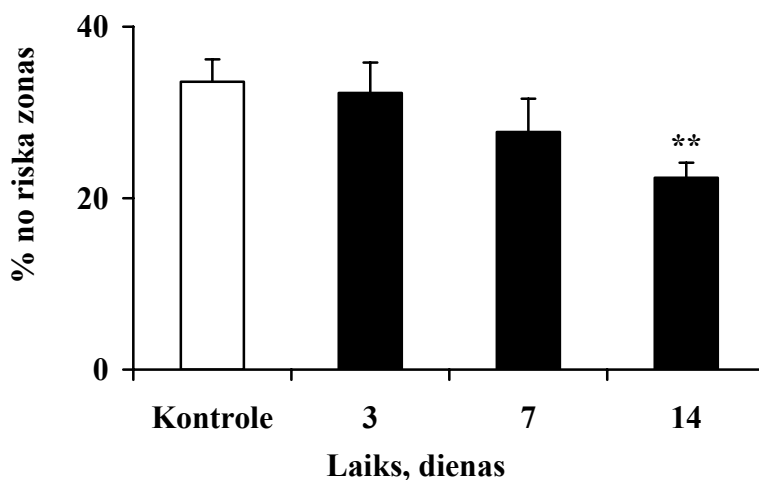
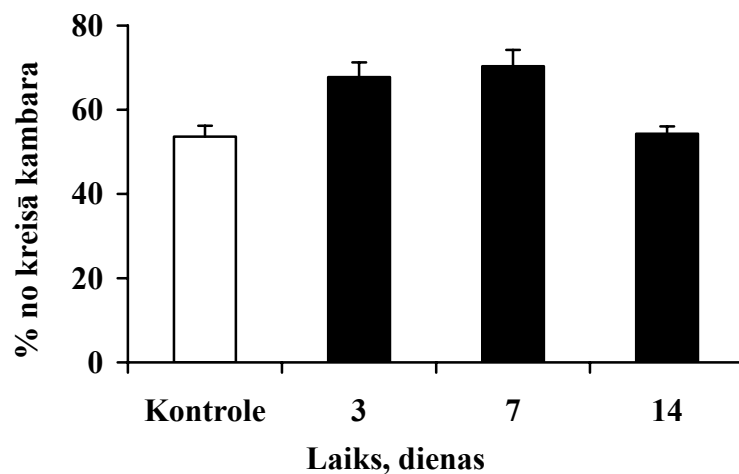


23. Attēls. Mildronāta ietekme uz karnitīna un GBB daudzumu žurku asins plazmā (A) un sirdī (B). Vēlu daudzumi izteikti kā izmaiņas reizes no sākotnējā daudzuma. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no 3 mērījumiem.

Aprēķinot korelācijas ar Persona korelāciju analīzes testu starp GBB un karnitīna koncentrāciju izmaiņām un mildronāta koncentrāciju izmaiņām, secinājām, ka pastāv saistība starp mildronāta koncentrāciju un brīvā karnitīna koncentrāciju izmaiņām asins plazmā ($r=-0.544$, $p<0.0001$) un sirds audos ($r=-0.682$, $p<0.0001$). Tika atrasta arī korelācija starp koncentrāciju izmaiņām plazmā un sirds audos, karnitīna gadījumā ($r=0.71$, $p<0.05$) un GBB gadījumā ($r=0.73$, $p<0.05$).

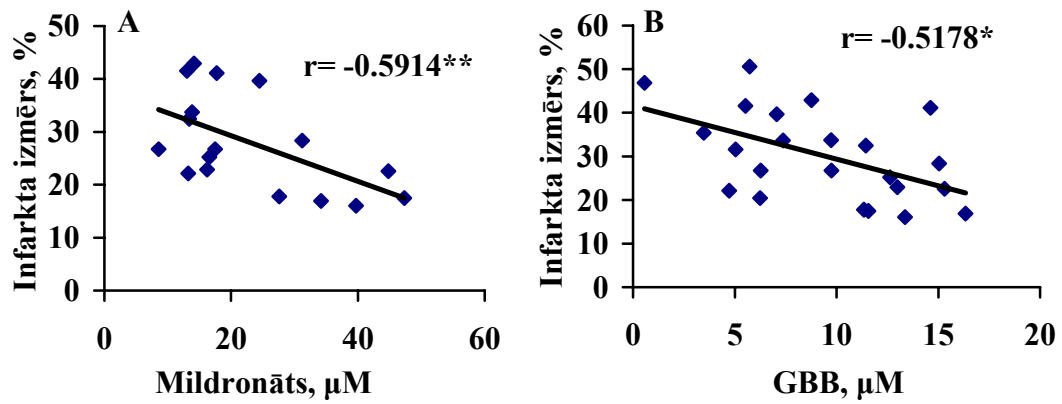
Mildronāta kardioprotektīvā darbības attīstības dinamika

Mildronāta kardioprotektīvā darbība tika pārbaudīta izolētās žurkas eksperimentālā infarkta modelī 3., 7. un 14. dienā pēc mildronāta terapijas uzsākšanas. Nosienot LAD koronāro artēriju, hipoksijai tika pakļauta vidēji 60% no kreisā kambara audu. Kā redzams 24. attēlā (A), riska zonas visās eksperimenta grupās bija vienādas un nebija statistiski ticamas atšķirības starp grupām. Trīs dienu mildronāta lietošana nesamazināja nekrozes zonu, salīdzinot ar kontroles grupas nekrozes zonu (20. attēls (B)). 7 dienu mildronāta lietošana uzrādīja tendenci samazināt nekrozes zonu, tomēr nebija statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas. Savukārt 14 dienu mildronāta ievadīšana izsauca statistiski ticamu kardioprotektīvo efektu (resp.: nekrozes zona kontroles grupā bija $34\pm 2\%$ no riska zonas, bet mildronāta 100 mg/kg grupā nekrozes zona bija tikai $22\pm 2\%$ no riska zonas).



24. Attēls. Riska zonas izmērs (A) un mildronāta terapijas ietekme uz nekrozes zonu (B). Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no vismaz 5 dzīvniekiem. ** p<0.01 pret kontroles grupu.

Persona korelāciju analīze uzrādīja korelāciju starp mildronāta un GBB koncentrācijām plazmā un nekrozes zonas izmēru (25. attēls). Mildronāta koncentrācijai un nekrozes zonas izmēram $r=-0.59$, $p<0.001$ un GBB koncentrācijai un nekrozes zonas izmēram $r=-0.52$, $p<0.05$. Korelācija nebija starp karnitīna koncentrāciju asins plazmā un nekrozes zonas izmēru.



25. Attēls. Persona korelāciju analīze starp nekrozes zonu un mildronāta (A) un GBB (B) koncentrācijām asins plazmā.

Diskusija

Mildronāta ietekme uz glikozes metabolismu

Mildronāta ietekme uz glikozes metabolismu tika pētīta veselās pelēs, kas saņēma mildronātu 21 dienu devā 200 mg/kg. Līdz šim bija pierādīts, ka mildronāts, inhibējot GBB hidroksilāzi, bremsē karnitīna sintēzi (Simkhovich et al. 1988). Tā kā karnitīns ir nepieciešams taukskābju oksidācijai, tad iepriekšējos pētījumos, galvenokārt, tika pētīta mildronāta ietekme uz taukskābju metabolismu. Mūsu eksperimentā mildronāta inhibējošo darbību uz GBB hidroksilāzi apstiprināja GBB koncentrācijas paaugstināšanās gan asins plazmā, gan sirds audos (2. tabula un 2. attēls). Plazmā GBB koncentrācija palielinājās 2.5 reizes savukārt sirdī 6 reizes (2. tabula un 2. attēls). Karnitīna un GBB koncentrāciju izmaiņas nebija simetriskas, jo mildronāts ne tikai inhibē GBB hidroksilāzi, bet arī bremsē karnitīna reabsorbciju nierēs (Kuwajima et al., 1999), kā arī GBB koncentrācijas palielināšanās varētu būt kā kompensators mehānisms, lai palielinātu GBB hidroksilāzes substrātā koncentrāciju. Tomēr kā parādījuši iepriekšējie pētījumi, tad glikozes metabolisma izmaiņas galvenokārt varētu būt saistītas ar karnitīna koncentrācijas izmaiņām (Morris et al., 1995).

Karnitīna koncentrācijas samazināšanās kompensatori sirds audos bija veicinājusi CPT-1A un CPT-1B mRNS transkripciju (4. attēls). CPT-1 darbība nodrošina reakciju starp taukskābju acil-CoA un L-karnitīnu, veidojot acilkarnitīnu, kas tiek transportēts mitohondrijā, kur notiek tālāka taukskābju β -oksidācija. Kaut gan CPT-1 aktivitāte ir palielināta, tomēr taukskābju oksidācija mitohondrijos tiek bremsēta (Simkhovich et al., 1988; Spaniol et al., 2003), un papildus L-karnitīna pievienošana *in vitro* apstākļos ir nepieciešama, lai atjaunotu sākotnējo CPT-1 aktivitāti (Degrace et al., 2004). Ir pierādīts, ka mildronāts samazina gan karnitīna, gan garo ķēžu acilkarnitīna koncentrāciju, kā arī inhibē $1\text{-}^{14}\text{C}$ -palmitāta oksidāciju žurkas miokardā (Simkhovich et al., 1988). Palmitāta oksidācija bija samazināta arī žurkās, kas saņēmušas mildronātu devā 200 mg/kg trīs nedēļas (Spaniol et al., 2003). Mūsu iegūtie rezultāti uzrādīja paaugstinātu brīvo taukskābju koncentrāciju peļu asins plazmā (2. tabula), kas varētu liecināt par samazinātu brīvo taukskābju oksidāciju. Kaut gan brīvo taukskābju koncentrācija mildronātu

saņēmušo peļu asins plazmā, salīdzinot ar kontroles grupas peļu plazmu, bija palielināta, triglicerīdu plazmas koncentrācija bija vienāda abās grupās, savukārt LDL-holesterīna koncentrācija, ko varētu skaidrot ar pastiprinātu LDL receptoru ekspresiju un stimulētu triglicerīdu uzņemšanu aknās, kā tas tika parādīts pirms tam (Degrace et al., 2004).

Mūsu pētījumā pirmo reizi ir parādīts, ka ilglaicīgas mildronāta terapijas gadījumā ir samazināts asins glikozes līmenis (1. attēls), kā arī, ka mildronāta ilgstoša lietošana palielināja par 35% insulīna stimulēto glikozes uzņemšanu izolētā peles sirdī, savukārt glikozes bazālā uzņemšana tika stimulēta par 25% (3. attēls (B)). Insulīna klātbūtnē glikozes transports muskuļu šūnā galvenokārt notiek caur GLUT-4. Pelēs, kam izraisīta GLUT-4 paaugstina ekspresija, tika novērota paaugstināta jutība pret insulīnu un uzlabota glikozes tolerance (Hansen et al., 1995). Mūsu rezultāti liecina, ka mildronāta 3 nedēļu ievadīšana izraisa paaugstinātu GLUT-4 un INSR proteīnu ekspresiju sirds audos (5. attēls). Bez tiešajiem insulīna efektiem uz glikozes transportu šūnā, insulīna receptoru aktivācija izraisa ar fosfoinozitola-3-kināzes un mitogēna-aktivēto proteīna kināzes saistīto enzīmu aktivitātes izmaiņas, kas ir iesaistītas kardioprotekcijā reperfūzijas periodā (Jonassen et al., 2001; Youngren et al., 2007). Tādā veidā ar paaugstināto INSR ekspresiju daļēji varētu būt arī skaidrojama mildronāta kardioprotektīvā darbība.

PDH kompleksa enzīmi un HK II ir intracelulārie enzīmi, kas nepieciešami glikozes metabolismam. HK II daudzuma palielināšanās ģenētiski modificēto peļu muskuļos izraisīja tiešu insulīna jutības palielināšanos (Fueger et al., 2004), bet PDH komplekss saista glikolīzi ar Krebsa ciklu. Mēs konstatējām divkārtu HK II un PDH E1/E2 daudzuma palielināšanos mildronātu saņēmušo peļu sirdīs, salīdzinot ar kontroles peļu sirdīm (5. attēls). Bez tam mēs nenovērojām laktāta koncentrācijas palielināšanos (dati nav parādīti). Iepriekšējos pētījumos tika novērota mildronāta spēja samazināt laktāta koncentrāciju sirds audos išēmijas laikā, kas liecina par mildronāta ilgstoša lietošana ne tikai veicina glikozes uzņemšanu, bet arī varētu veicināt glikozes fosforilāciju un aerobo oksidāciju (Asaka et al., 1998; Hayashi et al., 2000b).

Glikozes oksidācijas veicināšana tiek uzskatīta par iespējamo mildronāta darbības mehānismu (Asaka et al., 1998; Dambrova et al., 2002), bet līdz šim tas nebija izpētīts eksperimentāli. Ir pierādīts, ka funkcionāli sirds reperfūzijas laikā atgūstas, ja tieši vai netieši tiek stimulēta glikozes oksidācija, lietojot β -oksidācijas inhibitorus (Lopaschuk et

al., 1990). Bez tam insulīna rezistence, samazināta glikozes uzņemšana un oksidācija tiek saistīta ar kardiovaskulārajām patoloģijām (Kamalesh 2007; Taegtmeier et al., 2002). Lielākā daļa mildronāta pētījumu ļauj domāt, ka mildronāta kardioprotektīvās darbības mehānisma pamatā ir garo ķēžu acilkarnitīna uzkrāšanās inhibīcija išēmijas laikā (Asaka et al., 1998; Hayashi et al., 2000c; Kirimoto et al., 1996), tomēr mūsu pētījums parādīja, ka ilglaicīga mildronāta lietošana stimulē glikozes metabolismu miokardā, kas varētu nodrošināt miokarda aizsardzību išēmijas laikā.

Mildronāta ietekme uz diabēta attīstību G-K žurkās

Balstoties uz iepriekšējā pētījuma posmā iegūtajiem rezultātiem par mildronāta lietošanas ietekmi uz glikozes metabolismu veselā organismā, varētu domāt, ka insulīna jutības paaugstināšana un glikozes metabolisma veicināšana būtu pielietojama 2. tipa cukura diabēta ārstēšanai, tāpēc tālāk tika pētīta mildronāta lietošanas ietekme uz diabēta attīstību. Mildronāta ietekme uz diabēta attīstību tika pētīta G-K līnijas žurkās, kam sākot ar 12 dzīves spontāni attīstās 2. tipa cukura diabēts (Movassat et al., 2007). Tika atrasts, ka mildronāta lietošana samazināja glikozes koncentrāciju gan tukšā dūšā (7. attēls), gan pēc ēšanas (8. attēls), neietekmējot insulīna līmeni, kas bija saskaņā ar iepriekš iegūtajiem datiem (2. tabula). Bez tam tika pierādīts, ka mildronāta ievadīšana samazina neiropātisko un asinsvadu bojājumu attīstību (11. attēls), kā arī mildronāta ievadīšana aizsargāja sirdis no išēmijas–reperfūzijas izsuktajiem bojājumiem eksperimentālajā sirds infarkta modelī *in vitro* (12. attēls). Kā redzams 3. tabulā, mildronāta ievadīšana abās devās samazināja fruktozamīna koncentrāciju G-K asins plazmā līdz Wistar žurku līmenim.

Balstoties uz iepriekšējā pētījuma posma rezultātiem, varētu apgalvot, ka asins glikozes koncentrācijas samazināšanās varētu skaidrojama ar GLUT-4 un citu glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresijas palielināšanos (5. attēls). Tā kā G-K žurku asins plazmā netika konstatēta paaugstināta brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrācija, kas varētu liecināt par inhibētu taukskābju oksidāciju, mēs mērījām β -hidroksibutirāta koncentrāciju. β -hidroksibutirāts rodas taukskābju oksidācijas rezultātā un var tikt izmantots taukskābju oksidācijas intensitātes novērtēšanai. Eksperimenta sākumā β -hidroksibutirāta koncentrācija bija vienāda visās pētījuma grupās, tomēr pēc 4

un 8 nedēļām β -hidroksibutirāta koncentrācija bija samazinājusies visās trīs G-K žurku grupās. Mildronāta ievadīšana devā 200 mg statistiski ticami vēl samazināja β -hidroksibutirāta koncentrāciju (10. attēls).

Daudzos pētījumos pierādīts, ka diabēta gadījumā attīstās endoteliālā disfunkcija (Azuma et al., 2006; Rösen and Wiernsperger 2006), samazināta asinsvadu spēja relaksēties atbildē uz acetilholīnu konstatēta arī izolētos G-K žurku aortas gredzenos (Sena et al., 2008), gan mezenteriālajās artērijās (Cheng et al., 2001), kas liecina, ka endotēlijs tiek bojāts gan kompresijas, gan pretestības veida asinsvados. Bez endoteliālās disfunkcijas diabēta gadījumā novērota arī asinsvadu paaugstināta jutība pret noradrenalīnu un citiem ardenoreceptoru agonistiem (Rösen and Wiernsperger 2006). Mūsu pētījumā G-K žurku asinsvados nebija attīstījusies endoteliālā disfunkcija un aortas gredzenu atbildes reakcija *in vitro* pret acetilholīnu bija identiska Wistar žurku līnijas aortu gredzenu atbildei (14. attēls). Tas varētu būt skaidrojams ar nepietiekamo dzīvnieku vecumu, jo parādīts, ka endotēlija-atkarīgā vazorelaskācija 12 nedēļas vecām G-K žurkām ir pat labāka nekā attiecīgā vecuma Wistar līnijas žurkām, savukārt 36 nedēļu vecumā G-K žurkām jau ir attīstījusies endoteliālā disfunkcija (Kobayashi et al., 2004). Kaut gan G-K žurkām vēl nebija attīstījusies endoteliālā disfunkcija, tomēr tām tika konstatēta paaugstināta aortu gredzenu jutība pret fenilefrīnu, kas tika normalizēta, saņemot mildronātu devā 200 mg/kg (15. attēls). Salīdzinot koronāro caurplūsmu G-K un Wistar līnijas žurku sirdīs *in vitro*, secinājām, ka G-K žurku sirdīm tā ir samazināta. Savukārt mildronāta terapija devā 200 mg/kg, to statistiski ticami palielināja gandrīz līdz Wistar žurku siržu līmenim (4. tabula). Iegūtie rezultāti varētu liecināt ar par to, ka mildronāts uzlabo koronāro asinsvadu stāvokli diabēta gadījumā, kas, savukārt, varētu aizkavēt aterosklerozes attīstību.

Kā redzams 12. attēlā mildronāta ievadīšana devā 100 mg/kg, aizsargāja sirdis no išēmijas–reperfūzijas radītajiem bojājumiem un samazināja nekrozes zonu par 25–30% eksperimentālajā sirds infarkta modelī *in vitro*. Ja mēs salīdzinām mildronāta kardioprotektīvo efektu starp Wistar (24. attēlā (B)) un G-K (12. attēls) žurkām, tad jāsecina, ka mildronāta kardioprotektīvā darbība uz diabēta fona nav zudusi un ir tāda pati kā veselām žurkām. Tomēr nācās secināt, ka kardioprotektīvais efekts, ievadot mildronātu devā 200 mg/kg, nebija tik izteikts, kā mazākajā devā, kaut gan augstākajā

devā mildronāta ievadīšana pazemināja glikozes līmeni asinīs un mazināja diabēta komplikāciju attīstību.

Iepriekšējos pētījumos secināts, ka līdz ar diabēta attīstību G-K žurkām, attīstās arī perifērās neiropātijas, kam raksturīga sāpju sliekšņa paaugstināšanās (Suzuki et al., 1990). Neiropātijas attīstības smagums atkarīgs no glikozes koncentrācijas asinīs un laika, kurā asinīs ir paaugstināta glikozes koncentrācija (Suzuki et al., 1990). Mildronāta ievadīšana devā 200 mg/kg pēc 8 nedēļām samazināja hiperglikēmiju un paralēli paaugstināja sāpju sliekšni (11. attēls). Maz ticams, ka mildronāts tieši ietekmē neirus, kas iesaistīti sāpju signāla vadīšanā, jo netika novērots sāpju sliekšņa pazemināšanās pēc vienreizējas mildronāta devas ievadīšanas. Tādejādi var secināt, ka mildronāta ietekme uz asins glikozes koncentrāciju varētu būt nozīmīga neiropātijas attīstības inhibīcijai 2. tipa cukura diabēta pacientiem.

Mildronāta ietekme uz aterosklerozes attīstību

Aterosklerozes attīstību var veicināt gan paaugstināta brīvo taukskābju koncentrācija (Pilz and Marz 2008), gan hiperglikēmija (Aronson and Rayfield, 2002). Tā kā tika iepriekš pierādīts, ka mildronāta ievadīšana izsauc gan taukskābju, gan glikozes metabolisma izmaiņas, tad tā ievadīšana varētu ietekmēt aterosklerozes attīstību. Mūsu iegūtie rezultāti apstiprināja šo hipotēzi, jo mildronāta uzņemšana samazināja aterosklerotisko pangu attīstību (16. attēls un 18. attēls) un brīvā holesterīna līmeni ApoE/LDLR^{-/-} peļu asins plazmā (5. tabula), kā arī samazināja karnitīna daudzumu aortas audos (22. attēls).

Līdz šim veiktajos pētījumos parādīts, ka, sistemātiska L-karnitīna vai tā atvasinājuma – propionil-L-karnitīna ievadīšana, dzīvniekiem, kam eksperimentāli izsaukta aterosklerozes attīstība, tiek samazināta vai pilnīgi nomākta aterosklerozes attīstība (Sayed-Ahmed et al., 2001; Spagnoli et al., 1995). Bez tam, parādīts, ka karnitīna deficīts organismā, kas ierosināts dzīvniekam ievadot D-karnitīnu, pastiprina aterosklerozes attīstību un tiek pat izvirzīta hipotēze par to, ka karnitīna trūkums būtu uzskatāms par papildus riska faktoru aterosklerozes attīstībā (Sayed-Ahmed et al., 2001). Tā kā aterosklerotiskie bojājumi attīstās artērijās, mēs pētījām mildronāta lietošanas ietekmi uz karnitīna koncentrāciju izmaiņām žurku aortās. Kā tas bija sagaidāms,

mildronāta ievadīšana 14 dienas devā 100 mg/kg samazināja karnitīna koncentrāciju aortas audos 3-reizes (22. attēls). Mūsu iegūtie dati bija saskaņā ar citiem pētījumiem (Hayashi et al., 2000c), kā arī ar pašu iegūtajiem rezultātiem (2. tabula un 2. attēls), kas bija parādījuši, ka mildronāta lietošanas ietekmē samazinās karnitīna koncentrācija dažādos audos. Tomēr mildronāta ievadīšana apoE/LDLR^{-/-} pelēm neizsauca aterosklerozes attīstības paātrināšanos, kā tas būtu sagaidāms no iepriekšējiem pētījumiem, kas parādīja pozitīvu saistību starp samazinātu karnitīna koncentrāciju un aterosklerozes attīstību (Sayed-Ahmed et al., 2001). Tieši pretēji, mūsu dati parādīja, ka mildronāts samazināja aterosklerotisko pangu attīstību gan aortā (16. attēls), gan aortas saknē (18. attēls) devas atkarīgā veidā. Interesanti, ka karnitīna koncentrācijas analīze apoE/LDLR^{-/-} peļu sirdīs arī parādīja devas atkarīgu samazinājumu (19. attēls) un vadoties no iepriekšējiem pētījumiem, kas parādījuši, mildronāta ievadītās devas sakarību ar karnitīna koncentrācijas izmaiņām dažādos audos (Hayashi et al., 2000c), varētu domāt, ka līdzīgi karnitīna koncentrācija ir samazinājusies arī apoE/LDLR^{-/-} peļu aortās. Tas ļauj domāt, ka karnitīna koncentrācijas samazinājums varētu būt iesaistīts mildronāta antiaterosklerotiskajā darbības mehānismā.

Superoksīda anjona pārprodukcija asinsvadu sienīgas gludajā muskulatūrā un endotēlijā tiek saistīta ar endoteliālās disfunkcijas un aterosklerozes attīstību (Ballinger et al., 2002; Schroder et al., 2006). Mildronāta 4 mēnešu terapija samazināja superoksīda anjona rašanos apoE^{-/-} peļu aortās par 21% (20. attēls). Tā kā mildronāts inhibē β-oksīdāciju (Simkhovich et al., 1988), mēs uzskatām, ka mehānisms, kādā veidā mildronāts samazina superoksīda rašanos, varētu būt saistīts ar mildronāta spēju inhibēt taukskābju oksīdāciju mitohondrijos. Plazmas brīvo taukskābju analīze apoE/LDLR^{-/-} pelēs parādīja paaugstinātu to koncentrāciju (5. tabula), salīdzinājumā normālām kontroles pelēm (2. tabula). Pierādīts, ka paaugstināta taukskābju koncentrācija veicina superoksīda producēšanos endotēlija šūnās, savukārt CPT-1 inhibīcija samazināja tā rašanos (Du et al., 2006), kā arī paaugstina endoteliālo slāpekļa sintāzes (eNOS) aktivitāti (Du et al., 2006). Kaut gan mildronātam nav tiešas ietekmes uz CPT-1 darbību (Spaniol et al., 2003), tomēr tā ievadīšana samazina karnitīna koncentrāciju. Samazinātā karnitīna koncentrācija samazina CPT-1 spēju aktivēt taukskābes, lai tās varētu iekļūt

mitohondrijā, kur notiktu to β -oksidācija un tādā veidā tiktu inhibēta superoksīda anjona rašanās.

Endotēlijā sintezētajam NO piemīt pretiekaisuma un antitrombotiska darbība un pierādīts, ka endotēlijā sintezētais NO aizsargā pret aterosklerozes attīstību (Giannotti and Landmesser, 2007), kā arī, ka eNOS inhibīcija, paātrina aterosklerozes attīstību (Kauser et al., 2000). Daļa sintezētā NO, difundējot uz asinīm, reaģē ar hemoglobīnu, veidojot NOHb. Tiek uzskatīts, ka fizioloģiskos apstākļos NOHb koncentrācija asinīs attēlo eNOS darbību un ir marķieris endoteliālai funkcijai (Fink et al., 2006). Mēs konstatējam divkārtu NOHb koncentrācijas palielināšanos mildronātu saņēmušo peļu asinīs (21. attēls). Bieži samazināta NO producēšanās tiek saistīta ar paaugstinātu superoksīda anjona rašanos asinsvada gludajā muskulatūrā un endotēlijā (Madamanchi and Runge 2007) vai eNOS darbības traucējumiem (Kawashima and Yokoyama 2004). Mūsu gadījumā paaugstināto NOHb koncentrāciju mildronātu saņēmušo peļu asinīs varētu skaidrot ar samazināto superoksīda anjona sintēzi aortas sienīnā (20. attēls).

Mildronātu saņēmušo žurku aortu ekstraktu analīze parādīja ne tikai karnitīna koncentrācijas samazināšanos, bet arī GBB koncentrācijas palielināšanos (22. attēls). Kaut gan literatūrā nav daudz datu par to, ka GBB uzrādītu endotēliju vai gludo muskulatūru aizsargājošus efektus, tomēr Akahira et al., atklājuši, ka tieša GBB perfūzija, aizsargā izolētu sirdi no ūdeņraža peroksīda izraisītajiem bojājumiem (Akahira et al., 1997). Kaut gan praktiski pierādījumi tam vēl nav atrasti, tiek uzskatīts, ka GBB uzkrāšanās varētu veicināt GBB esteru sintēzi (Sjakste et al., 2004) un ir pierādīts, ka GBB esteri saistās pie muskarīniskajiem receptoriem (Dambrova et al., 2004), kas arī varētu izskaidrot paaugstināto NOHb koncentrāciju asinīs.

Mildronāta ietekme uz GBB un karnitīna koncentrāciju izmaiņām un to saistība ar kardioprotektīvo efektu

Iegūtie rezultāti pirmo reizi parādīja sakarību starp mildronāta lietošanu un karnitīna un GBB koncentrāciju izmaiņām asins plazmā un sirds audos, kā arī tika noskaidrota mildronāta kardioprotektīvā efekta sākšanās laiks.

Lai noskaidrotu mildronāta kardioprotektīvā efekta attīstības dinamiku, eksperimentālajiem dzīvniekiem tika vadīts mildronāts devā 100 mg/kg un attiecīgajā

dienā veikts eksperimentālais infarkts *in vitro*. Pēc 3 dienu mildronāta terapijas netika konstatēta nekrozes zonas samazināšanās, pēc 7 mildronāta terapijas dienām jau tika novērots neliels nekrozes zonas samazinājums, tomēr tas statistiski ticami neatšķīrās no kontroles grupas. Statistiski ticams nekrozes zonas samazinājums tika konstatēts tikai pēc 14 mildronāta ievadīšanas dienām (24. attēls). Plazmas un sirds ekstraktu analīze parādīja, ka, sākot ar 7. mildronāta ievadīšanas dienu, karnitīna, GBB un mildronāta koncentrāciju izmaiņu ātrums samazinās un 14. dienā tās sasniedza savu plato koncentrāciju. Mildronāta ievadīšana nebija izsaukusi sirds funkcionālo parametru (sirds ritms un kreisā kambara saraušanās spiediens) izmaiņas, kas liecināja, ka mildronāta kardioprotektīvā darbība nav saistīta ar sirds darba samazināšanu.

Kā tas bija sagaidāms, mūsu pētījums parādīja, ka mildronāta ievadīšana izraisīja karnitīna koncentrācijas samazināšanos asins plazmā un sirds audos (6. tabula un 23. attēls). Līdz šim veiktie pētījumi parādīja, ka karnitīna koncentrācija var mainīties atkarībā no mildronāta devas un ievadīšanas laika (Asaka et al., 1998; Hayashi et al., 2000c; Yonekura et al., 2000). Tomēr lielākā daļa pētījumu parādīja 2-3 reizes samazinātu karnitīna koncentrāciju pēc 10 dienu mildronāta ievadīšanas (Asaka et al., 1998; Simkhovich et al., 1988; Yonekura et al., 2000). Saskaņā ar līdz šim veiktajiem pētījumiem, mūsu rezultāti parādīja, ka karnitīna koncentrācija sasniedza savu plato koncentrāciju pēc 7-10 dienām pēc mildronāta ievadīšanas sākšanas un tā bija samazinājies vidēji 2-3 reizes (6. tabula un 23. attēls).

Mūsu rezultāti parādīja, ka mildronāts sasniedz savu plato koncentrāciju (30 mM) pēc 14 mildronāta ievadīšanas dienām (6. tabula). Mildronāta inhibīcijas konstante GBB hidroksilāzei ir 16 mM (Spaniol et al., 2001) un kā redzams, tad plazmā šāda koncentrācija tiek sasniegta jau pēc pirmās mildronāta ievadīšanas reizes (6. tabula), kas ļauj apgalvot, ka, ievadot mildronātu devā 100 mg/kg, jau pēc pirmās ievadīšanas reizes tiek inhibēta GBB hidroksilāze. Savukārt inhibīcijas konstante karnitīna reabsorbcijai nierēs ir 52.2 μ M, bet karnitīna transportēšanai kardiomiocītos 1340 μ M (Kuwajima et al., 1999), kas arī pierāda, ka vienreizēja mildronāta ievadīšana devā 100 mg/kg ir pietiekama, lai kavētu karnitīna reabsorbciju nierēs un transportu kardiomiocītos. Tas ļauj secināt, ka neskatoties uz mildronāta spēju ietekmēt karnitīna un GBB koncentrāciju jau pēc pirmās ievadīšanas reizes vēl ir nepieciešamas 14 dienas, lai attīstītos mildronāta

kardioprotektīvā aktivitāte, kas ir saistītas ar šūnas metabolisma izmaiņām, kas tika pierādītas pētījuma iepriekšējos posmos.

Eksperimentālajā sirds infarkta modelī *in vitro*, ne karnitīns, ne mildronāts netika pievienots perfūzijas buferšķīdumam, kas vēlreiz apliecina to, ka mildronāta ievadīšana, kā arī karnitīna un GBB koncentrāciju izmaiņas ir veicinājušas šūnas metabolisma izmaiņas, kas aizsargā kardiomiocītus pret išēmijas–reperfūzijas izsauktajiem bojājumiem.

Mildronāta izmantošanas jaunās iespējas klīnikā

Kardiovaskulārās saslimšanas ir viens no galvenajiem nāves iemesliem civilizētajā sabiedrībā (Braun 2006). Daudzu kardiovaskulāro saslimšanu risks ir paaugstināts 2. tipa cukura diabēta pacientiem (Steiner 2007), tāpēc mērķtiecīgi būtu attīstīt un pētīt zāļu vielas un to darbības mehānismus, kas uzlabotu glikozes un taukskābju metabolismu 2. tipa cukura diabēta pacientiem un līdz ar to samazinātu arī tālāko komplikāciju attīstību.

Mūsu iegūtie rezultāti apstiprināja, ka mildronāta lietošana stimulē glikozes metabolismu, veicinot glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresijas palielināšanos (5. attēls) un paaugstina jutību pret insulīnu (3. attēls). Eksperimentālajā 2. tipa cukura diabēta modelī, G-K līnijas žurkās mildronāta lietošana samazināja glikozes līmeni gan tukšā dūšā (7. attēls), gan pēc ēšanas (8. attēls), kā arī mildronāta kardioprotektīvā darbība nebija zudusi arī uz diabēta fona (12. attēls). Bez tam mildronāta terapija aizsargāja asinsvadus no bojājumu attīstības (13. attēls), samazināja neiropātiju attīstību (11. attēls), kas raksturīga diabēta pacientiem.

Tā kā 2. tipa cukura diabēta pacientiem ir paaugstināts aterosklerozes attīstības risks (Steiner 2007), tad tika pētīta arī mildronāta ietekme uz aterosklerozes attīstību. Mildronāta antiaterosklerotiskā darbība tika pētīta divās devās (30 un 100 mg/kg) un statistiski ticamu aterosklerotisko asinsvadu bojājumu samazinājumu konstatējām augstākajā mildronāta devā (16. attēls un 18. attēls). Iepriekšējie rezultāti parādījuši, ka mildronāts tādā pašā devā aizsargājis sirdi no išēmijas–reperfūzijas izraisītajiem bojājumiem (12. attēls un 24. attēls), kā arī uzlabojis sirds darbību pēc infarkta (Aoyagi et al., 1997; Hayashi et al., 2000a).

Balstoties uz iegūtajiem rezultātiem, varam izteikt domu, ka mildronāts klīnikā varētu tikt izmantots ne tikai kā kardioprotektīvs līdzeklis, bet tas varētu būt pielietojams arī kā līdzeklis 2. tipa cukura diabēta pacientu ārstēšanai, kā arī tā lietošana varētu samazināt ar 2. tipa cukura diabēta saistīto komplikāciju (aterosklerozes, neiropātisko sāpju) attīstību.

Secinājumi

1. Trīs nedēļu mildronāta kurss inhibēja taukskābju β -oksidāciju, samazināja glikozes koncentrāciju asinīs un stimulēja insulīna stimulēto glikozes uzņemšanu izolētā peles sirdī *in vitro*, kas varētu būt skaidrojams ar GLUT-4, INSR un PDH kompleksa enzīmu palielinātu ekspresiju.
2. Mildronāta terapija G-K līnijas žurkās normalizēja hiperglikēmiju, samazināja diabēta komplikāciju attīstību un aizsargāja sirdi no išēmijas–reperfūzijas radītajiem bojājumiem.
3. Mildronāts samazināja aterosklerozes attīstību apoE/LDLR^{-/-}, samazinot aterosklerotisko bojājumu daudzumu gan aortā, gan pie aortas vārstulēm. Mildronāta antiaterosklerotiskā darbība varētu būt saistīta ar samazināta superoksīda anjona producēšanos aortās un uzlabotu endoteliālo NO sintēzi.
4. Pretinfarkta efekta sasniegšanai nepieciešams vismaz 14 dienu mildronāta kurss un mildronāta kardioprotektīvā darbība korelē ar plazmas mildronāta un GBB koncentrācijām.

Izmantotā literatūra

1. Akahira M, Hara A, Abiko Y. Effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on myocardial derangements induced by hydrogen peroxide in the isolated perfused rat heart. *Fundam Clin Pharmacol*. 1997;11(4):356-64.
2. Aoyagi T, Sugiura S, Eto Y, Yonekura K, Matsumoto A, Yokoyama I, Kobayakawa N, Omata M, Kirimoto T, Hayashi Y, Momomura S. Inhibition of carnitine synthesis protects against left ventricular dysfunction in rats with myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997 Oct;30(4):468-74.
3. Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab*. 2003 Apr;14(3):137-45.
4. Aronson D, Rayfield EJ. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol*. 2002 Apr 8;1:1.
5. Asaka N, Muranaka Y, Kirimoto T, Miyake H. Cardioprotective profile of MET-88, an inhibitor of carnitine synthesis, and insulin during hypoxia in isolated perfused rat hearts. *Fundam Clin Pharmacol*. 1998;12(2):158-63.
6. Asayama K, Sandhir R, Sheikh FG, Hayashibe H, Nakane T, Singh I. Increased peroxisomal fatty acid beta-oxidation and enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in diabetic rat liver. *Mol Cell Biochem*. 1999 Apr;194(1-2):227-34.
7. Azuma K, Toyofuku Y, Iesaki T, Otsuka A, Tanaka A, Mita T, Hirose T, Tanaka Y, Daida H, Kawamori R, Watada H. Acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor, improves endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki rats exhibiting repetitive blood glucose fluctuation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Jun 30;345(2):688-93.
8. Balaban RS, Kantor HL, Katz LA, Briggs RW. Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science*. 1986 May 30;232(4754):1121-3;
9. Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z, Reuf J, Horaist C, Lebovitz R, Hunter GC, McIntyre K, Runge MS. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*. 2002 Jul 30;106(5):544-9.
10. Båvenholm PN, Pigon J, Saha AK, Ruderman NB, Efendic S. Fatty acid oxidation and the regulation of malonyl-CoA in human muscle. *Diabetes*. 2000 Jul;49(7):1078-83.
11. Bersin RM, Stacpoole PW. Dichloroacetate as metabolic therapy for myocardial ischemia and failure. *Am Heart J*. 1997 Nov;134(5 Pt 1):841-55.
12. Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ, Glatz JF. Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)*. 2007 Feb;22:15-29.
13. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Lamping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Nov;17(11):2333-40.
14. Bøtker HE, Helligsø P, Kimose HH, Thomassen AR, Nielsen TT. Determination of high energy phosphates and glycogen in cardiac and skeletal muscle biopsies, with special reference to influence of biopsy technique and delayed freezing. *Cardiovasc Res*. 1994 Apr;28(4):524-7.
15. Braun LT. Cardiovascular disease: strategies for risk assessment and modification. *J Cardiovasc Nurs*. 2006 Nov-Dec;21(6 Suppl 1):S20-42; quiz S43-5.

16. Brewer HB Jr, Zech LA, Gregg RE, Schwartz D, Schaefer EJ. Type III hyperlipoproteinemia: diagnosis, molecular defects, pathology, and treatment. *Ann Intern Med.* 1983 May;98(5 Pt 1):623-40.
17. Broderick TL, Panagakis G, DiDomenico D, Gamble J, Lopaschuk GD, Shug AL, Paulson DJ. L-carnitine improvement of cardiac function is associated with a stimulation in glucose but not fatty acid metabolism in carnitine-deficient hearts. *Cardiovasc Res.* 1995 Nov;30(5):815-20.
18. Broderick TL, Quinney HA, Lopaschuk GD. Carnitine stimulation of glucose oxidation in the fatty acid perfused isolated working rat heart. *J Biol Chem.* 1992 Feb 25;267(6):3758-63
19. Brøndum E, Nilsson H, Aalkjaer C. Functional abnormalities in isolated arteries from Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated diabetic rat models. *Horm Metab Res.* 2005 Apr;37 Suppl 1:56-60.
20. Calvani M, Reda E, Arrigoni-Martelli E. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic Res Cardiol.* 2000 Apr;95(2):75-83
21. Carvajal K, Baños G, Moreno-Sánchez R. Impairment of glucose metabolism and energy transfer in the rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2003 Jul;249(1-2):157-65.
22. Carvajal K, Moreno-Sánchez R. Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res.* 2003 Mar-Apr;34(2):89-99.
23. Chandler MP, Chavez PN, McElfresh TA, Huang H, Harmon CS, Stanley WC. Partial inhibition of fatty acid oxidation increases regional contractile power and efficiency during demand-induced ischemia. *Cardiovasc Res.* 2003 Jul 1;59(1):143-51
24. Chavez PN, Stanley WC, McElfresh TA, Huang H, Sterk JP, Chandler MP. Effect of hyperglycemia and fatty acid oxidation inhibition during aerobic conditions and demand-induced ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 May;284(5):H1521-7.
25. Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H, Muller D, Park JK, Luft FC, Mervaala EM. Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension.* 2001 Feb;37(2 Part 2):433-9.
26. Chiodi P, Maccari F, Ramacci MT. Tissue lipid accumulation by L-aminocarnitine, an inhibitor of carnitine-palmitoyltransferase-2. Studies in intact rats and isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Jul 9;1127(1):81-6.
27. Choi KC, Lee SY, Yoo HJ, Ryu OH, Lee KW, Kim SM, Baik SH, Choi KM. Effect of PPAR-delta agonist on the expression of visfatin, adiponectin, and resistin in rat adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 May 25;357(1):62-7.
28. Dambrova M, Chlopicki S, Liepinsh E, Kirjanova O, Gorshkova O, Kozlovski VI, Uhlen S, Liepina I, Petrovska R, Kalvinsh I. The methylester of gamma-butyrobetaine, but not gamma-butyrobetaine itself, induces muscarinic receptor-dependent vasodilatation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 May;369(5):533-9.
29. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med.* 2002 Aug;12(6):275-9.
30. 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 Mar;258(1-2):171-82.
31. Dhar PK, Grupp IL, Schwartz A, Grupp G, Matlib MA. Reduction of Carnitine Content by Inhibition of Its Biosynthesis Results in Protection of Isolated Guinea Pig Hearts Against Hypoxic Damage. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 1996 Jul;1(3):235-242.

32. Dikalov S, Fink B. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo and in tissues. *Methods Enzymol.* 2005;396:597-610.
33. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):1071-80.
34. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. *Circ Res.* 2008 Feb 15;102(3):283-94.
35. Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G, Mele D, Fucili A, Ceconi C. Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Nov;1033:79-91
36. Fink B, Dikalov S, Fink N. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo as an index of endothelial function. *Pharmacol Rep.* 2006;58 Suppl:8-15.
37. Folmes CD, Clanachan AS, Lopaschuk GD. Fatty acid oxidation inhibitors in the management of chronic complications of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2005 Feb;7(1):63-70.
38. Folmes CD, Lopaschuk GD. Role of malonyl-CoA in heart disease and the hypothalamic control of obesity. *Cardiovasc Res.* 2007 Jan 15;73(2):278-87.
39. Fraser H, Gao Z, Ozeck MJ, Belardinelli L. N-[3-(R)-tetrahydrofuranyl]-6-aminopurine riboside, an A1 adenosine receptor agonist, antagonizes catecholamine-induced lipolysis without cardiovascular effects in awake rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Apr;305(1):225-31
40. Fueger PT, Bracy DP, Malabanan CM, Pencek RR, Granner DK, Wasserman DH. Hexokinase II overexpression improves exercise-stimulated but not insulin-stimulated muscle glucose uptake in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Diabetes.* 2004 Feb;53(2):306-14.
41. 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 Jun 1;59(11):1357-63.
42. Giannotti G, Landmesser U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz.* 2007 Oct;32(7):568-72.
43. Gibbs CL. Cardiac energetics. *Physiol Rev.* 1978 Jan;58(1):174-254;
44. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):500-8.
45. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Präger D, Haney J, Möritz KU, Meissner K, Roszkopf D, Eckel L, Böhm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation.* 2006 Feb 28;113(8):1114-22.
46. Goodwin GW, Taegtmeyer H. Improved energy homeostasis of the heart in the metabolic state of exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Oct;279(4):H1490-501.
47. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med.* 1976 May;119(1):85-90;
48. Gross B, Staels B. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Dec;21(4):687-710.
49. Grynberg A. Effectors of fatty acid oxidation reduction: promising new anti-ischaemic agents. *Curr Pharm Des.* 2005;11(4):489-509
50. Gulewitsch W, Krimberg R. Zur Kenntnis der Extractivstoffe der Muskeln. *Z Physiol Chem.* 1905;45:326-8.

51. Hansen PA, Gulve EA, Marshall BA, Gao J, Pessin JE, Holloszy JO, Mueckler M. Skeletal muscle glucose transport and metabolism are enhanced in transgenic mice overexpressing the Glut4 glucose transporter. *J Biol Chem.* 1995 Jan 27;270(4):1679-84.
52. Hansford RG, Cohen L. Relative importance of pyruvate dehydrogenase interconversion and feed-back inhibition in the effect of fatty acids on pyruvate oxidation by rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 1978 Nov;191(1):65-81;
53. Hayashi Y, Ishida H, Hoshiai M, Hoshiai K, Kirimoto T, Kanno T, Nakano M, Tajima K, Miyake H, Matsuura N, Nakazawa H. MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, improves cardiac SR Ca²⁺ uptake activity in rats with congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2000a Jun;209(1-2):39-46.
54. Hayashi Y, Kirimoto T, Asaka N, Nakano M, Tajima K, Miyake H, Matsuura N. Beneficial effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor in rats with heart failure following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol.* 2000b May 3;395(3):217-24.
55. Hayashi Y, Muranaka Y, Kirimoto T, Asaka N, Miyake H, Matsuura N. Effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on tissue carnitine and lipid levels in rats. *Biol Pharm Bull.* 2000c Jun;23(6):770-3.
56. Heineman FW, Balaban RS. Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. *Annu Rev Physiol.* 1990;52:523-42;
57. Hopkins TA, Sugden MC, Holness MJ, Kozak R, Dyck JR, Lopaschuk GD. Control of cardiac pyruvate dehydrogenase activity in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Jul;285(1):H270-6
58. Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis.* 2003 Apr;41(4 Suppl 4):S4-12.
59. Hsueh WA, Law RE. PPARgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 Dec;21(12):1891-5.
60. Hülsmann WC, Schneijdenberg CT, Verkleij AJ. Accumulation and excretion of long-chain acylcarnitine by rat hearts; studies with aminocarnitine. *Biochim Biophys Acta.* 1991 Nov 21;1097(4):263-9.
61. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 10;91(10):4431-5.
62. Jani S, Bergmann SR. Metabolic modulation of myocardial ischemia. *Curr Cardiol Rep.* 2006 Mar;8(2):123-30
63. Jawien J, Csanyi G, Gajda M, Mateuszuk L, Lomnicka M, Korbut R, Chlopicki S. Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 2007 Feb 5;556(1-3):129-35.
64. Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Sep;55(3):503-17.
65. Jeffrey FM, Diczku V, Sherry AD, Malloy CR. Substrate selection in the isolated working rat heart: effects of reperfusion, afterload, and concentration. *Basic Res Cardiol.* 1995 Sep-Oct;90(5):388-96;
66. Jonassen AK, Sack MN, Mjøs OD, Yellon DM. Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res.* 2001 Dec 7;89(12):1191-8.

67. de Jong JW, Hülsmann WC. A comparative study of palmitoyl-CoA synthetase activity in rat-liver, heart and gut mitochondrial and microsomal preparations. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Mar 3;197(2):127-35.
68. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusic AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 28;99(11):7604-9.
69. Kahn CR, Chen L, Cohen SE. Unraveling the mechanism of action of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(11):1305-7.
70. Kaijser L, Berglund B. Myocardial lactate extraction and release at rest and during heavy exercise in healthy men. *Acta Physiol Scand*. 1992 Jan;144(1):39-45
71. Kamalesh M. Heart failure in diabetes and related conditions. *J Card Fail*. 2007 Dec;13(10):861-73.
72. Kampf JP, Parmley D, Kleinfeld AM. Free fatty acid transport across adipocytes is mediated by an unknown membrane protein pump. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Nov;293(5):E1207-14.
73. Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):580-8.
74. Karmazyn M. Role of sodium-hydrogen exchange in cardiac hypertrophy and heart failure: a novel and promising therapeutic target. *Basic Res Cardiol*. 2001 Jul;96(4):325-8.
75. Kauser K, da Cunha V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 May;278(5):H1679-85.
76. Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):998-1005.
77. Kirimoto T, Nobori K, Asaka N, Muranaka Y, Tajima K, Miyake H. Beneficial effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on energy metabolism in ischemic dog hearts. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1996 Mar-Apr;331(2):163-78.
78. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Nov;20(11):2336-45.
79. Kobayashi T, Matsumoto T, Ooishi K, Kamata K. Differential expression of alpha2D-adrenoceptor and eNOS in aortas from early and later stages of diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jul;287(1):H135-43.
80. Kodde IF, van der Stok J, Smolenski RT, de Jong JW. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Jan;146(1):26-39.
81. Komuro I, Ohtsuka M. Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchanger studies: role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger--lessons from knockout mice. *J Pharmacol Sci*. 2004 Sep;96(1):23-6.
82. Kramer D, Shapiro R, Adler A, Bush E, Rondinone CM. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism*. 2001 Nov;50(11):1294-300.
83. Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk GD. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*. 1995 Jul 21;270(29):17513-20.

84. Kuhl JE, Ruderman NB, Musi N, Goodyear LJ, Patti ME, Crunkhorn S, Dronamraju D, Thorell A, Nygren J, Ljungkvist O, Degerblad M, Stahle A, Brismar TB, Andersen KL, Saha AK, Efendic S, Bavenholm PN. Exercise training decreases the concentration of malonyl-CoA and increases the expression and activity of malonyl-CoA decarboxylase in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jun;290(6):E1296-303.
85. Kuwajima M, Harashima H, Hayashi M, Ise S, Sei M, Lu K, Kiwada H, Sugiyama Y, Shima K. Pharmacokinetic analysis of the cardioprotective effect of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate in mice: inhibition of carnitine transport in kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Apr;289(1):93-102.
86. Kyselovic J, Martinka P, Batova Z, Gazova A, Godfraind T. Calcium channel blocker inhibits Western-type diet-evoked atherosclerosis development in ApoE-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Oct;315(1):320-8.
87. Lalloyer F, Vandewalle B, Percevault F, Torpier G, Kerr-Conte J, Oosterveer M, Paumelle R, Fruchart JC, Kuipers F, Pattou F, Fiévet C, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha improves pancreatic adaptation to insulin resistance in obese mice and reduces lipotoxicity in human islets. *Diabetes.* 2006 Jun;55(6):1605-13.
88. Laughlin MR, Taylor JF, Chesnick AS, Balaban RS. Regulation of glycogen metabolism in canine myocardium: effects of insulin and epinephrine in vivo. *Am J Physiol.* 1992 Jun;262(6 Pt 1):E875-83
89. Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, Lysiak-Szydłowska W. Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res.* 2001 Jul;51(1):21-9.
90. Lee CH, Olson P, Hevener A, Mehl I, Chong LW, Olefsky JM, Gonzalez FJ, Ham J, Kang H, Peters JM, Evans RM. PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 28;103(9):3444-9.
91. Lerch R, Tamm C, Papageorgiou I, Benzi RH. Myocardial fatty acid oxidation during ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem.* 1992 Oct 21;116(1-2):103-9.
92. Liu B, Clanachan AS, Schulz R, Lopaschuk GD. Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons. *Circ Res.* 1996 Nov;79(5):940-8.
93. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schönekeß BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 1994 Aug 4;1213(3):263-76.
94. Lopaschuk GD, Collins-Nakai RL, Itoi T. Developmental changes in energy substrate use by the heart. *Cardiovasc Res.* 1992 Dec;26(12):1172-80;
95. Lopaschuk GD, Collins-Nakai R, Olley PM, Montague TJ, McNeil G, Gayle M, Penkoske P, Finegan BA. Plasma fatty acid levels in infants and adults after myocardial ischemia. *Am Heart J.* 1994 Jul;128(1):61-7.
96. Lopaschuk GD, Spafford MA, Davies NJ, Wall SR. Glucose and palmitate oxidation in isolated working rat hearts reperfused after a period of transient global ischemia. *Circ Res.* 1990 Feb;66(2):546-53.
97. Lopaschuk GD, Stanley WC. Glucose metabolism in the ischemic heart. *Circulation.* 1997 Jan 21;95(2):313-5.
98. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000 Sep 14;407(6801):233-41.
99. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res.* 2007 Mar 2;100(4):460-73.

100. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*. 2000 Oct 19;10(20):1247-55.
101. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):1006-14.
102. Miao B, Zondlo S, Gibbs S, Cromley D, Hosagrahara VP, Kirchgessner TG, Billheimer J, Mukherjee R. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res*. 2004 Aug;45(8):1410-7.
103. Morris GS, Zhou Q, Wolf BA, Christos SC, DiDomenico DF, Shug AL, Paulson DJ. Sodium pivalate reduces cardiac carnitine content and increases glucose oxidation without affecting cardiac functional capacity. *Life Sci*. 1995;57(24):2237-44.
104. Movassat J, Calderari S, Fernández E, Martín MA, Escrivá F, Plachot C, Gangnerau MN, Serradas P, Alvarez C, Portha B. Type 2 diabetes - a matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes Obes Metab*. 2007 Nov;9 Suppl 2:187-95.
105. Musi N, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand*. 2003 Aug;178(4):337-45.
106. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2006 Jan 3;113(1):90-7.
107. Nomiya T, Bruemmer D. Liver X receptors as therapeutic targets in metabolism and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2008 Feb;10(1):88-95.
108. Nuutila P, Knuuti MJ, Raitakari M, Ruotsalainen U, Teräs M, Voipio-Pulkki LM, Haaparanta M, Solin O, Wegelius U, Yki-Järvinen H. Effect of antilipolysis on heart and skeletal muscle glucose uptake in overnight fasted humans. *Am J Physiol*. 1994 Dec;267(6 Pt 1):E941-6.
109. Oliver MF. Sudden cardiac death: the lost fatty acid hypothesis. *QJM*. 2006 Oct;99(10):701-9.
110. Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):5306-11.
111. Olszanecki R, Jawień J, Gajda M, Mateuszuk L, Gebaska A, Korabiowska M, Chłopicki S, Korbut R. Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Dec;56(4):627-35.
112. Oppedisano F, Fanello D, Calvani M, Indiveri C. Interaction of mildronate with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transport protein. *J Biochem Mol Toxicol*. 2008 Feb;22(1):8-14.
113. Parang P, Singh B, Arora R. Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2005 Dec;10(4):217-23.
114. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 1998 May 29;93(5):693-704.
115. Pilz S, März W. Free fatty acids as a cardiovascular risk factor. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(4):429-34.
116. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992 Oct 16;71(2):343-53.
117. Ravnskjaer K, Boergesen M, Rubi B, Larsen JK, Nielsen T, Fridriksson J, Maechler P, Mandrup S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) potentiates, whereas

- PPARgamma attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2005 Aug;146(8):3266-76.
118. van Ree JH, van den Broek WJ, Dahlmans VE, Groot PH, Vidgeon-Hart M, Frants RR, Wieringa B, Havekes LM, Hofker MH. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 1994 Nov;111(1):25-37.
 119. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000 Sep 1;289(5484):1524-9.
 120. Rösen P, Wiernsperger NF. Metformin delays the manifestation of diabetes and vascular dysfunction in Goto-Kakizaki rats by reduction of mitochondrial oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Jul-Aug;22(4):323-30.
 121. Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Dec;20(12):2587-92.
 122. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
 123. Russell RR 3rd, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol*. 1999 Aug;277(2 Pt 2):H643-9.
 124. Saddik M, Lopaschuk GD. Myocardial triglyceride turnover during reperfusion of isolated rat hearts subjected to a transient period of global ischemia. *J Biol Chem*. 1992 Feb 25;267(6):3825-31.
 125. Saha AK, Laybutt DR, Dean D, Vavvas D, Sebokova E, Ellis B, Klimes I, Kraegen EW, Shafrir E, Ruderman NB. Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 1):E1030-7.
 126. Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res*. 2003 May;42(3):238-56.
 127. Santalucía T, Camps M, Castelló A, Muñoz P, Nuel A, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Developmental regulation of GLUT-1 (erythroid/Hep G2) and GLUT-4 (muscle/fat) glucose transporter expression in rat heart, skeletal muscle, and brown adipose tissue. *Endocrinology*. 1992 Feb;130(2):837-46.
 128. Santalucía T, Boheler KR, Brand NJ, Sahye U, Fandos C, Viñals F, Ferré J, Testar X, Palacin M, Zorzano A. Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem*. 1999 Jun 18;274(25):17626-34.
 129. Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, Mostafa N. L-carnitine prevents the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolaemic rabbits. *Pharmacol Res*. 2001 Sep;44(3):235-42.
 130. Schaffer JE. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Feb;282(2):E239-46.
 131. Schmitz FJ, Rösen P, Reinauer H. Improvement of myocardial function and metabolism in diabetic rats by the carnitine palmitoyl transferase inhibitor Etomoxir. *Horm Metab Res*. 1995 Dec;27(12):515-22.
 132. Schröder K, Vecchione C, Jung O, Schreiber JG, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, Busse R, Brandes RP. Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radic Biol Med*. 2006 Nov 1;41(9):1353-60.

133. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000 Nov 15;14(22):2831-8.
134. Sena CM, Nunes E, Louro T, Proença T, Fernandes R, Boarder MR, Seiça RM. Effects of alpha-lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153(5):894-906.
135. Sesti C, Simkhovich BZ, Kalvinsh I, Kloner RA. Mildronate, a novel fatty acid oxidation inhibitor and antianginal agent, reduces myocardial infarct size without affecting hemodynamics. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 Mar;47(3):493-9.
136. Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuķe 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 Jan 15;37(2):195-202.
137. Sjakste, N., Kalvinsh, I. Mildronate: an antiischemic drug with multiple indications. *Pharmacologyonline.* 2006(1), 1-18.
138. Sjakste N, Kleschyov AL, Boucher JL, Baumane L, Dzintare M, Meirena D, Sjakste J, Sydow K, Münzel T, Kalvinsh I. Endothelium- and nitric oxide-dependent vasorelaxing activities of gamma-butyrobetaine esters: possible link to the antiischemic activities of mildronate. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jul 8;495(1):67-73.
139. Spagnoli LG, Orlandi A, Marino B, Mauriello A, De Angelis C, Ramacci MT. Propionyl-L-carnitine prevents the progression of atherosclerotic lesions in aged hyperlipemic rabbits. *Atherosclerosis.* 1995 Apr 7;114(1):29-44.
140. 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 Mar;268(6):1876-87.
141. 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 Jan;44(1):144-53.
142. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation.* 1998 Nov 10;98(19):2088-93.
143. Stacpoole PW. The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism.* 1989 Nov;38(11):1124-44.
144. Stanley WC. Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2004 Sep;9 Suppl 1:S31-45.
145. Stanley WC, Hall JL, Stone CK, Hacker TA. Acute myocardial ischemia causes a transmural gradient in glucose extraction but not glucose uptake. *Am J Physiol.* 1992 Jan;262(1 Pt 2):H91-6.
146. Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res.* 1997 Feb;33(2):243-57
147. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* 2005 Jul;85(3):1093-129.
148. Steenbergen RH, Drummen GP, Op den Kamp JA, Post JA. The use of cis-parinaric acid to measure lipid peroxidation in cardiomyocytes during ischemia and reperfusion. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Dec 4;1330(2):127-37.
149. Steiner G. Atherosclerosis in type 2 diabetes: a role for fibrate therapy? *Diab Vasc Dis Res.* 2007 Dec;4(4):368-74.

150. Sterling D, Casey JR. Bicarbonate transport proteins. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(5):483-97.
151. Suga H. Cardiac energetics: from E(max) to pressure-volume area. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003 Aug;30(8):580-5.
152. Suzuki K, Yen-Chung H, Toyota T, Goto Y, Hirata Y, Okada K. The significance of nerve sugar levels for the peripheral nerve impairment of spontaneously diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Diabetes Res.* 1990 May;14(1):21-5.
153. Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part I: general concepts. *Circulation.* 2002 Apr 9;105(14):1727-33.
154. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 23;100(26):15924-9.
155. Tomita M, Sendju Y. Über die Oxyaminverbindungen welche die Biuret Reaktionen zeigen. III. Spaltung der γ -amino- β -oxybuttersäure in die optisch-aktiven Komponente. *Z Physiol Chem.* 1927;169:263-77.
156. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007 Feb 16;100(3):328-41.
157. 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 May 17;49(10):1403-10.
158. Van der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev.* 1992 Oct;72(4):881-940.
159. Van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF, Hasselbaink DM, Luiken JJ. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol Cell Biochem.* 2002 Oct;239(1-2):9-15.
160. VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):12-22.
161. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003 Apr 18;113(2):159-70.
162. Wambolt RB, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Dichloroacetate improves postischemic function of hypertrophied rat hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Oct;36(4):1378-85.
163. Wisneski JA, Gertz EW, Neese RA, Mayr M. Myocardial metabolism of free fatty acids. Studies with ^{14}C -labeled substrates in humans. *J Clin Invest.* 1987 Feb;79(2):359-66.
164. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J.* 1999 Apr;13(6):667-75.
165. Wolff AA, Rotmensch HH, Stanley WC, Ferrari R. Metabolic approaches to the treatment of ischemic heart disease: the clinicians' perspective. *Heart Fail Rev.* 2002 Apr;7(2):187-203.
166. Wu P, Peters JM, Harris RA. Adaptive increase in pyruvate dehydrogenase kinase 4 during starvation is mediated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Sep 21;287(2):391-6.

167. Yagihashi S, Tonosaki A, Yamada K, Kakizaki M, Goto Y. Peripheral neuropathy in selectively-inbred spontaneously diabetic rats: electrophysiological, morphometrical and freeze-replica studies. *Tohoku J Exp Med.* 1982 Sep;138(1):39-48.
168. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001 Aug;7(8):941-6.
169. Yonekura K, Eto Y, Yokoyama I, Matsumoto A, Sugiura S, Momomura S, Kirimoto T, Hayashi Y, Omata M, Aoyagi T. Inhibition of carnitine synthesis modulates protein contents of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and hexokinase type I in rat hearts with myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2000 Oct;95(5):343-8.
170. Young ME, Goodwin GW, Ying J, Guthrie P, Wilson CR, Laws FA, Taegtmeyer H. Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl-CoA decarboxylase by fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Mar;280(3);
171. Young LH, Renfu Y, Russell R, Hu X, Caplan M, Ren J, Shulman GI, Sinusas AJ. Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation.* 1997 Jan 21;95(2):415-22.
172. Young LH, Russell RR 3rd, Yin R, Caplan MJ, Ren J, Bergeron R, Shulman GI, Sinusas AJ. Regulation of myocardial glucose uptake and transport during ischemia and energetic stress. *Am J Cardiol.* 1999 Jun 17;83(12A):25H-30H.
173. Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Apr;64(7-8):873-91
174. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):16237-42.
175. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1706-21.
176. Zarain-Herzberg A, Rupp H. Therapeutic potential of CPT I inhibitors: cardiac gene transcription as a target. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002 Mar;11(3):345-56
177. Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest.* 1994 Sep;94(3):937-45.
178. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992 Oct 16;258(5081):468-71.

Patenti:

1. Eremeev A, Kalvinsh I, Semenikhina V, et al. 1984 (1984-11-06.). 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium) propionate and method for the preparation and use thereof. US patent 4481218.