

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE



BAIBA ŠVALBE

**L-KARNITĪNA BIOSINTĒZES INHIBITORA
MILDRONĀTA NEIROTROPO EFEKTU PĒTĪJUMI
EKSPERIMENTĀLAJOS MODEĻOS**

Promocijas darbs

Doktora grāda iegūšanai Farmācijas nozarē
Apakšnozare: Farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2014

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē un Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā, laika posmā no **2009. gada līdz 2013. gadam.**



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā «Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē» Nr. 2009/0138/1DP/1.1.2.1.2./09/IPIA/VIAA/004.

Darbs sastāv no 134 lapām, nodaļām - ievads, literatūras apskats, materiāli un metodes, rezultāti, diskusija, secinājumi, aizstāvāmās tēzes, publikācijas un ziņojumi par pētījuma tēmu, pateicības, literatūras saraksts, 6 pielikumiem, 7 tabulām, 40 attēliem.

Darba forma: disertācija farmācijas nozarē, farmaceitiskās farmakoloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskās vadītājas: **asoc. prof. Dr. pharm. Maija Dambrova**
prof. Dr. habil. biol. Ruta Muceniece

Darba recenzenti:

- 1) prof. *Dr. med.* **Alfrēds Jānis Sīpols**, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte;
- 2) asoc. prof. *Dr. biol.* **Andrejs Šķesters**, Rīgas Stradiņa universitātes Bioķīmijas laboratorija;
- 3) prof. *Dr. med.* **Ago Rinke**, Tartu Universitāte.

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2014. gada 04. aprīlī plkst. 12.00 Latvijas Universitātes medicīnas, farmācijas un bioloģijas nozaru promocijas padomes atklātā sēdē Latvijas Universitātes Mazajā aulā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes priekšsēdētājs _____/prof. *Dr. med.* **Valdis Pīrāgs**/

LU Medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes sekretāre _____/Dr. *pharm.* **Kristīne Saleniece**/

© University of Latvia, 2014

© Baiba Švalbe, 2014

ANOTĀCIJA

Neurodeģeneratīvās slimības mūsdienās skar miljoniem cilvēku, pieaug ar tām saistītā invaliditāte un mirstība, tāpēc tiek meklētas jaunas terapijas iespējas un līdzekļi. L-karnitīns piedalās garo ķēžu taukskābju transportā caur mitohondriju membrānām, tādējādi nodrošinot taukskābju oksidāciju un enerģijas metabolisma regulēšanu šūnā. Jauna pieeja L-karnitīna sistēmas regulācijai un L-karnitīna fizioloģisko funkciju pētījumiem centrālajā nervu sistēmā (CNS) ir tā koncentrācijas farmakoloģiska samazināšana. L-karnitīna koncentrāciju var samazināt, izmantojot tā biosintēzes inhibitoru mildronātu. Promocijas darba mērķis bija eksperimentāli noskaidrot mildronāta terapijas neotropos efektus un izpētīt šo efektu regulācijas molekulāros mehānismus saistībā ar L-karnitīnu, kas varētu kalpot par pamatu jaunu zāļu mērķu meklējumiem neiroloģisko slimību ārstēšanai.

Promocijas darba ietvaros parādīta mildronāta terapijas efektivitāte dažādos dzīvnieku eksperimentālajos modeļos. Pirmo reizi peļu eksperimentālajā modelī parādīts mildronāta pretkrampju efekts, kas saistīts ar slāpekļa oksīda un adrenerģisko signālceļu regulāciju. Akūta mildronāta ievadīšana samazināja arī etanola iedarbību un aizsargāja smadzenes pret akūtiem smadzeņu asinsrites traucējumiem *a. carotis communis* oklūzijas modelī. Hroniska mildronāta ievadīšana uzlaboja žurku tēviņu seksuālo funkciju un samazināja brīvā L-karnitīna koncentrāciju sēkliniekos. Pētījuma rezultāti varētu būt nozīmīgi klīnikā, vīriešiem ilgstoši lietojot mildronātu kardioprotektīvo un antiišēmisko efektu sasniegšanai. Hroniska mildronāta ievadīšana uzlaboja motorās, taktilās un jušanas funkcijas žurkām pēc insulta un samazināja L-karnitīna koncentrāciju smadzenēs. Tika konstatēts, ka mildronāta ievadīšana paaugstina acil-koenzīms A pieejamību un izraisa daļēju elpošanas ķēdes atjūgšanu, tādējādi uzlabojot smadzeņu mitohondriju toleranci anoksijas-reoksigenācijas gadījumā.

Pēc darbā iegūtajiem datiem var secināt, ka L-karnitīna koncentrācijas regulēšanu smadzeņu audos un asins cirkulācijā var izmantot jaunu farmakoloģisku preparātu izstrādei CNS saslimšanas gadījumos un ar to saistīto komplikāciju ārstēšanā.

Atslēgvārdi: L-karnitīns, mildronāts, seksuālā uzvedība, cerebrālā išēmija, mitohondriju funkcija

ANNOTATION

Neurodegenerative diseases affect millions of people worldwide. In order to decrease the associated disability and mortality rates, new therapies and drugs are required. L-carnitine is as cofactor for long-chain fatty acid transport into mitochondria; thereby it ensures fatty acid oxidation and the regulation of cellular metabolism. Mildronate, an inhibitor of L-carnitine biosynthesis, reduces the concentration of L-carnitine and could be used to investigate L-carnitine functions in the central nervous system (CNS). The aim of this thesis is to investigate both the neurotrophic effects of mildronate treatment and the molecular regulation mechanisms that underlie the L-carnitine system, as these could serve as new drug targets for the treatment of neurological diseases.

This thesis describes the neurotropic effects of mildronate in different experimental animal models. Acute treatment with mildronate induced anticonvulsant effects involving both the nitric oxide and adrenergic signalling pathways. Acute mildronate administration also counteracted the hypnotic effect of ethanol and protected the brain against acute cerebrovascular disorders in an *a. carota communis* occlusion model. Chronic administration of mildronate improved sexual function in male rats and the decreased L-carnitine concentration in the testis. These results may be clinically relevant for long-term mildronate treatment in male cardiovascular patients. The chronic mildronate treatment also reduced the concentration of carnitine in brain tissue and improved the functional neurological recovery of motor, sensory and tactile function after ischemia. In addition, we found that mildronate treatment increased the availability of acyl-coenzyme A (acyl-CoA) and caused an uncoupling preconditioning-like effect and thus improved mitochondrial tolerance to conditions of anoxia/reoxygenation in brain tissue.

This thesis demonstrates that mildronate-induced regulation of L-carnitine in brain tissue and the vascular system can be used as a new pharmacological tool for treatment of CNS diseases and related conditions.

Key Words: L-carnitine, mildronate, sexual behaviour, stroke, mitochondrial function

SATURS

ANOTĀCIJA	3
ANNOTATION	4
IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI.....	9
IEVADS.....	11
DARBA MĒRĶIS.....	12
DARBA UZDEVUMI.....	12
DARBA HIPOTĒZE	12
1. LITERATŪRAS APSKATS	13
1.1. Karnitīna darbības bioķīmiskie mehānismi.....	13
1.1.1. Karnitīna biosintēze	13
1.1.2. Karnitīna transports smadzeņu audos	16
1.1.3. Karnitīns šūnu enerģijas metabolisma reakcijās.....	16
1.1.4. Karnitīna ietekme uz CNS signālu pārnesei molekulām	20
1.2. Karnitīna sistēmas nozīme un farmakoloģiskā regulācija dažādu CNS slimību gadījumā.....	21
1.2.1. Karnitīns eksperimentālajos modeļos un klīnikā.....	22
1.2.2. Acetilkarnitīns eksperimentālajos modeļos un klīnikā	24
1.2.3. Mildronāts kā karnitīna signāļceļus inhibējošs aģents.....	28
2. MATERIĀLI UN METODES.....	31
2.1. Eksperimentālie dzīvnieki	31
2.2. Materiāli	32
2.3. Metodes	33
2.3.1. Uzvedības testi akūto efektu novērtēšanai pēc mildronāta ievadīšanas.....	33
2.3.1.1. <i>Mildronāta pretkrampju darbības mehānismu noskaidrošana</i>	33
2.3.1.2. <i>Hipnotiskās darbības tests</i>	34
2.3.1.3. <i>Smadzeņu garozas asins plūsmas mērījumi žurkām</i>	34
2.3.1.4. <i>Asins plūsmas un skābekļa daudzuma izmaiņas žurku smadzenēs pēc īslaicīgas a.carotis communis oklūzijas.....</i>	35
2.3.1.5. <i>Kustību aktivitātes tests</i>	35
2.3.4. Seksuālās uzvedības novērošana	36
2.3.5. Spermas kvalitātes novērtēšanas analīze un reproduktīvo orgānu svars	38

2.3.6. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzija	39
2.3.7. Uzvedības testi pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas.....	40
2.3.7.1. <i>Ķepu novietošanas tests</i>	41
2.3.7.2. <i>Ūsu kairinājuma izsauktais ķepu novietošanas tests</i>	42
2.3.7.3. <i>Cilindra tests</i>	42
2.3.7.4. <i>Pārvietošanās pa laipu tests</i>	43
2.3.7.5. <i>Rotējošā stieņa tests</i>	44
2.3.7.6. <i>Pasīvā nosacījuma refleksa (PNR) tests</i>	44
2.3.7.7. <i>Darbības atmiņas novērtēšanas tests</i>	45
2.3.8. Insulta bojājumu histoloģiskais novērtējums un izmēra noteikšana	45
2.3.9. Karnitīna, γ -butirotbetaīna un mildronāta daudzuma analīze.....	46
2.3.10. Acil-karnitīna profila un acil-KoA daudzuma noteikšana smadzeņu audos	47
2.3.11. Bioķīmisko parametru mērījumi.....	48
2.3.11.1. <i>Testosterona koncentrācijas noteikšana</i>	48
2.3.11.2. <i>Imunoblota (Western blot) analīze</i>	48
2.3.11.3. <i>Ribonukleīnskābes izolēšana un kvantitatīva reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcijas analīze</i>	49
2.3.11.4. <i>Smadzeņu mitohondriju izolēšana</i>	50
2.3.11.5. <i>Adenozīna trifosfāta koncentrācijas noteikšana smadzeņu audos un izolētos mitohondrijos</i>	50
2.3.11.6. <i>Karnitīna acetiltransferāze un palmitoiltransferāzes I aktivitātes mērījumi</i>	51
2.3.11.7. <i>Krebsa ciklā iesaistīto enzīmu aktivitātes noteikšana</i>	51
2.3.11.8. <i>Smadzeņu mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumi normoksijas apstākļos un pēc anoksijas-reoksigenācijas</i>	52
2.4. Statistiskā datu apstrāde	54
3. REZULTĀTI.....	55
3.1. Mildronāta ietekme uz karnitīna un γ -butirotbetaīna koncentrāciju asins plazmā un audos.....	55
3.2. Mildronāta akūtā pretkrampju un antihipnotiskā darbība	59
3.2.1. Mildronāta ietekme uz pentilēn-tetrazola un bikukulīna radītajiem krampjiem	59

3.2.2. Mildronāta ietekme uz etanola hipnotisko efektu.....	61
3.2.3. Mildronāta ietekme uz žurku smadzeņu garozas asins plūsmu pēc etanola ievadīšanas	63
3.2.4. Mildronāta ietekme uz asins plūsmas un skābekļa daudzumu žurku smadzenēs pēc īslaicīgas <i>a.carotis communis</i> oklūzijas.....	63
3.2.5. Mildronāta ietekme uz peļu kustību un izpētes aktivitāti.....	65
3.3. Karnitīna biosintēzes inhibitora ietekme uz žurku tēviņu seksuālo aktivitāti.....	66
3.3.1. Mildronāta ietekme uz žurku tēviņu seksuālo uzvedību	66
3.3.2. Mildronāta ietekme uz reproduktīvo orgānu svaru un spermas kvalitāti.....	67
3.3.3. Mildronāta ietekme uz karnitīna palmitoiltransferāzes 1B gēnu ekspresiju žurku sēkliniekos.....	68
3.3.4. Mildronāta ietekme uz testosterona koncentrāciju žurku asins plazmā	69
3.4. Pārejošās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku sensori-motoro un izzināšanas funkciju	70
3.4.1. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme ķepu novietošanas testā.....	70
3.4.2. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku ūsu kairinājuma izraisīto ķepu novietošanas testu.....	71
3.4.3. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku pārvietošanās pa laipu testu.....	72
3.4.4. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku uzvedību cilindra testā.....	74
3.4.5. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme pasīvā nosacījuma refleksa testā.....	75
3.4.6. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz darbības atmiņas novērtēšanas testu	76
3.4.7. Infarkta izmērs	76
3.4.8. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku ķermeņa svaru.....	77
3.5. Mildronāta ietekme uz vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas izraisītiem bojājumiem žurkām.....	78

3.5.1. Mildronāta ietekme uz žurku ķepu taktilo funkciju.....	78
3.5.2. Mildronāta ietekme uz žurku sensori-motoro funkciju.....	79
3.5.3. Mildronāta ietekme uz žurku ķepu motoro darbību.....	80
3.5.4. Mildronāta ietekme uz žurku priekšējo un pakaļējo ķepu sensori-motoro funkciju	82
3.5.5. Mildronāta ietekme uz žurku kustību koordināciju	83
3.5.6. Dzīvnieku svara izmaiņas pēc insulta radītajiem bojājumiem	84
3.5.7. Smadzeņu insulta radīto bojājumu histoloģiskā atradne.....	84
3.6. Mildronāta ietekme uz smadzeņu mitohondriju funkciju normoksijas apstākļos un pēc anoksijas-reoksigenācijas.....	85
3.6.1. Mildronāta ietekme uz acil-karnitīnu koncentrāciju smadzeņu audos	85
3.6.2. Mildronāta ietekme uz karnitīna acetiltransferāzes un palmitoiltransferāzes I aktivitāti smadzeņu audos	86
3.6.3. Mildronāta ietekme uz karnitīna palmitoiltransferāzes gēnu ekspresiju smadzeņu audos.....	87
3.6.4. Mildronāta ietekme uz Krebsa cikla enzīmu aktivitāti smadzeņu audos	87
3.6.5. Mildronāta ietekme uz smadzeņu mitohondriju elpošanu normoksijā un pēc anoksijas-reoksigenācijas.....	88
3.6.7. Mildronāta ietekme uz adenožīna trifosfātu koncentrāciju	90
4. DISKUSIJA	91
4.1. Mildronāta neirotropā darbība akūtas ievadīšanas gadījumā	91
4.2. Karnitīna daudzuma samazināšanas ietekme uz seksuālo funkciju.....	95
4.3. Sensori-motorās darbības un atmiņas traucējumi pēc 90 un 120 minūšu pārejošās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas žurkās	99
4.4. Karnitīna daudzuma samazināšanas ietekme uz smadzeņu audu išēmisko bojājumu	104
4.5. Mildronāta ietekme uz smadzeņu mitohondriju funkciju	107
5. SECINĀJUMI	112
6. AIZSTĀVAMĀS TĒZES.....	113
7. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU.....	114
8. PATEICĪBAS.....	116
9. IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	117
10. PIELIKUMS	134

IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

Acetil-KoA	Acetil-koenzīms A
A β	beta amiloīds
ACh	Acetilholīns
Acil-KoA	Acil-koenzīms A
ADF	Adenozīna difosfāts
AK	Acil-karnitīns
ANOVA	Dispersijas analīze (<i>one – way Analysis of variance</i>)
ANT	Adenīna nukleotīda translokāze
ATF	Adenozīna trifosfāts
BIK	Bikukulīns
BK	Brīvais karnitīns
BSA	Vērša seruma albumīns
CCA	<i>arteria carotis communis</i>
CNS	Centrālā nervu sistēma
CS	Citrātsintāze
EDTA	Etilēndiamīntetraetiķskābe
EKK	Elpošanas kontroles koeficients
FADH ₂	Flavīna adenīna dinukleotīda reducētā forma
GASS	γ -aminosviestskābes receptors
GASS _A	γ -aminosviestskābe receptora A apakštīps
GBB	γ -butirobetaīns
GBBOH	γ -butirobetaīna hidroksilāze
GLUT1	Glikozes transportproteīns-1
HTML	3-hidroksitrimetilizīns
HTMLA	3-hidroksitrimetilizīna aldolāze
<i>i.p.</i>	Intraperitoneāla ievadīšana
<i>i.v.</i>	Intravenoza ievadīšana
IL-1 β	Interleikīns 1 beta
KAKT	Karnitīna-acilkarnitīna translokāze
KATR	Karboksiatraktilozīds
kDNS	Komplementārā dezoksiribonukleīnskābe
K _i	Inhibitora saistīšanās līdzsvara konstante
K _m	Mihaelisa-Mentenā konstante
KoA	Koenzīms A
KPT-1	Karnitīna palmitoiltransferāze 1
KPT-1A	Karnitīna palmitoiltransferāzes 1 aknu tips
KPT-1B	Karnitīna palmitoiltransferāzes 1 muskuļu tips
KPT-1C	Karnitīna palmitoiltransferāzes 1 smadzeņu tips
KPT-2	Karnitīna palmitoiltransferāze 2
KrAT	Karnitīna acetiltransferāze
KTP	Karnitīna transportproteīns
L-NAME	NG-nitro-L-arginīns
MDH	Malātdehidrogenāze
MRM	Multi reakciju monitorings
mRNS	Matricas jeb informācijas ribonukleīnskābe
NAD ⁺	Oksidētais nikotīnamīda adenīdinukleotīds

NADH	Nikotīnamīda adenīdinukleotīds
NF-κB	Kodola faktors-κB
NMDA	N-metil-D-aspartāta receptors
NO	Slāpekļa oksīds
OKTN	Organisko katjonu/karnitīna transportproteīns
<i>p.o.</i>	Perorāla ievadīšana
PBS	Fosfātu buferšķīdums
PDH	Piruvātdehidrogenāze
PNR	Pasīvā nosacījuma refleksa tests
PPAR	Peroksisomu proliferāciju aktivējošais receptors
PPARα	Peroksisomu proliferāciju aktivējošais receptors alfa
PGC1α	PPARγ koaktivators 1 alfa
PRZ	„Pārvelšanās” refleksa zudums
PTZ	Pentilēn-tetrazols
RT-PKĀR	Reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcijas analīze
<i>s.c.</i>	Ievadīšana zem ādas
S.E.M.	Vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda
SAP	Specifiskais atjūdzēj-proteīns
SDS	Nātrijs dodecilsulfāts
SKoAS	Sukcinil-KoA sintetāze
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilēndiamīns
TFT	Trifeniltetrazolija hlorīds
TMABA	4-N-trimetilaminobutiraldehīds
TMABA-DH	4-N-trimetilaminobutiraldehīda dehidrogenāze
TML	N ⁶ -trimetillizīns
TMLOH	Trimetillizīna hidroksilāze
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilēndiamīna dihidrohlorīds
TMZ	Trimetazidīns (1-(2,3,4) trimetobenzil) piperazīna hidrohlorīds
TNF-α	Tumora nekrozes faktors alfa
Tris-HCl	Tris[hidroksimetil] aminometāns buferšķīdumā
UPLC/MS/MS	Augstas efektivitātes hromatogrāfija sajūgta ar tandēma masspektrometriju
VCA	Vidējā cerebrālā artērija
VCAO	Vidējās cerebrālās artērijas oklūzija
α KGDH	alfa-ketoglutarātdehidrogenāze

IEVADS

L-karnitīns ir plaši lietots uztura bagātinātājs, ko izmanto enerģijas metabolisma reakciju regulēšanai organismā. L-karnitīns piedalās garo ķēžu taukskābju transportā caur šūnu mitohondriju membrānu, tādējādi nodrošinot taukskābju oksidāciju un adenoziņa trifosfāta molekulu veidošanos. Pirmo reizi no muskuļaudiem karnitīns tika izdalīts 1905. gadā. To paveica latviešu fiziologs un bioķīmiķis, profesors Roberts Krimbergs (1874 – 1941), izolējot karnitīnu no Lībiga gaļas ekstrakta (liellopu gaļas ekstrakts) un noskaidrojot tā molekulāro formulu, taču karnitīna molekulas struktūra tika noteikta tikai 20 gadus vēlāk. Strauji attīstoties bioķīmisko pētījumu metodēm, pagājušā gadsimta 50.–60. gados tika atklāti karnitīna metabolisma un transporta proteīni, kā arī noskaidrota karnitīna loma garo ķēžu taukskābju oksidācijas procesos. Vēlāk karnitīna metabolisma traucējumi tika saistīti ar iedzimtām saslimšanām (piemēram, mutācijas karnitīna transportproteīnu gēnos) un zāļu lietošanu (piemēram, valprojskābe epilepsijas ārstēšanai) vai nieru mazspējas slimniekiem dialīzes rezultātā.

L-karnitīna bioķīmisko mehānismu loma muskuļu šūnu, tostarp kardiomiocītu, enerģijas metabolisma procesu norisē tiek pētīta, papildus ievadot L-karnitīnu. Ir zināms, ka L-karnitīns atrodams smadzeņu audos, bet tā funkcijas un fizioloģiskā nozīme tajos pilnībā nav izprasta. Ir plaši pētīta L-karnitīna loma sirds enerģijas metabolismā, bet salīdzinoši mazāk veikti pētījumi par karnitīna nozīmi smadzeņu funkcionēšanā. Par L-karnitīna terapijas lietderību dažādu neiroloģisko saslimšanu gadījumos nav izkristalizējies viennozīmīgs viedoklis, tomēr tā terapija tiek ieteikta tādu saslimšanu gadījumā kā Alcheimera, Pārkinsona slimība, insults un epilepsija.

Kardiovaskulārajā farmakoloģijā veiksmīga izrādījusies karnitīna koncentrācijas regulācija, izmantojot Latvijā labi pazīstamo kardioprotektīvo savienojumu mildronātu, kas efektīvi samazina L-karnitīna koncentrāciju audos (Liepinsh *et.al.*, 2006). Šādos eksperimentos novērota uzlabota šūnu dzīvotspējas saglabāšana išēmijas apstākļos (Dambrova *et.al.*, 2002). Lai gan ir parādīts, ka mildronāta protektīvā iedarbība novērojama arī centrālās nervu sistēmas (CNS) saslimšanu gadījumos (Sjakste *et.al.*, 2005), līdz šim nav veikti eksperimentāli pētījumi, kas palīdzētu skaidrot mildronāta ilgstošas lietošanas izraisītā L-karnitīna koncentrācijas samazinājuma ietekmi uz CNS procesiem un nervu šūnu enerģijas

metabolismu. Interesanti, ka L-karnitīns ir atrodamas smadzeņu audos diezgan lielā daudzumā, lai gan smadzeņu audu fizioloģiskais enerģijas substrāts ir glikoze, nevis taukskābes. Izmantojot mildronātu kā karnitīna līmeņa regulatoru, paveras iespēja pētīt karnitīna lomu šūnas signālceļu darbībā išēmijas apstākļos (eksperimentālais insulta modelis) un organisma uzvedības reakciju norisēs (piemēram, seksuālā aktivitāte).

Šis pētījums palīdzēs identificēt jaunus mērķproteīnus CNS signālceļu farmakoloģiskai regulācijai neiroloģisko saslimšanu ārstēšanai.

Promocijas darba eksperimentālā daļa izstrādāta Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā.

DARBA MĒRĶIS

Eksperimentāli noskaidrot mildronāta terapijas neotropos efektus un izpētīt šo efektu regulācijas molekulāros mehānismus saistībā ar L-karnitīnu, kas varētu kalpot par pamatu jaunu zāļu mērķu meklējumiem neiroloģisko slimību ārstēšanai.

DARBA UZDEVUMI

1. Pētīt mildronāta akūto CNS efektu farmakoloģiskās darbības mehānismus.
2. Noskaidrot L-karnitīna biosintēzes un transporta inhibitora mildronāta ietekmi uz seksuālo funkciju žurku tēviņu eksperimentālajā modelī.
3. Eksperimentālajā insulta modelī pētīt ar mildronāta ievadīšanu saistītās L-karnitīna signālceļu regulācijas neiroprotektīvo efektu.
4. Pētīt mildronāta izraisītās L-karnitīna koncentrācijas regulācijas ietekmi uz smadzeņu audu mitohondriju funkcionalitāti.

DARBA HIPOTĒZE

Samazinātai L-karnitīna koncentrācijai smadzeņu audos un asins cirkulācijā ir neiroprotektīvs efekts dažādu CNS slimību gadījumā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Karnitīna darbības bioķīmiskie mehānismi

L-karnitīns (3-hidroksi-4-N-trimetilaminobutirāts) (tālāk tekstā – karnitīns) ir vitāli nepieciešams garo ķēžu taukskābju transportam caur mitohondriju membrānu. Pirmo reizi no muskuļaudiem karnitīns tika izdalīts 1905. gadā, un to paveica latviešu fiziologs un bioķīmiķis, profesors Roberts Krimbergs (1874 – 1941), izolējot karnitīnu no liellopu gaļas ekstrakta un noskaidrojot tā molekulārformulu (Valtneris, 1999), bet karnitīna ķīmisko struktūrunoteica tikai 20 gadus vēlāk. Strauji attīstoties bioķīmisko pētījumu metodēm, pagājušā gadsimta 50.–60. gados tika atklāti karnitīna metabolisma un transporta proteīni, kā arī noskaidrota karnitīna loma garo ķēžu taukskābju oksidācijas procesos. Vēlāk tika atklāti karnitīna metabolisma traucējumi saistībā ar iedzimtām saslīmšanām. Joprojām aktīvi notiek pētījumi par karnitīna un no tā atvasināto savienojumu iespējamo farmakoloģisko aktivitāti dažādu saslīmšanu modeļos.

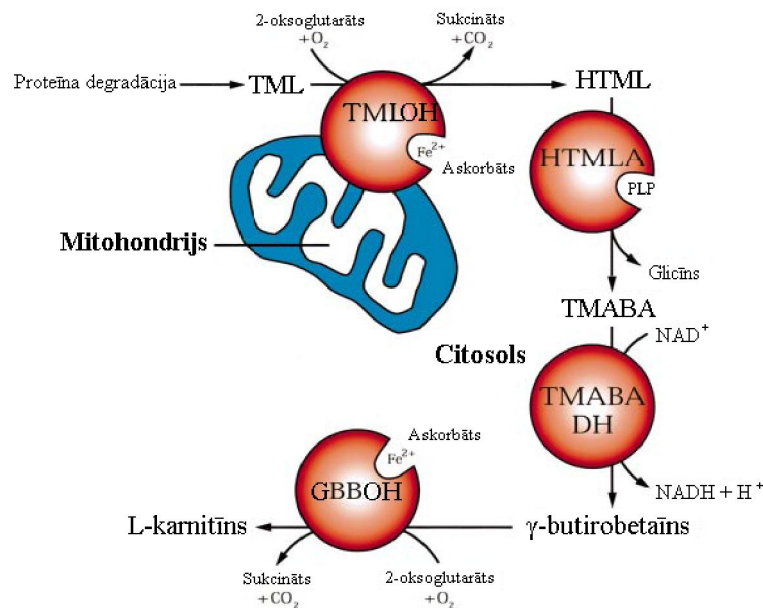
1.1.1. Karnitīna biosintēze

Organismā tiek nodrošināta un efektīvi regulēta karnitīna homeostāze, pateicoties gan absorbcijai no pārtikas, gan biosintēzei, gan arī intensīvai reabsorbcijai no glomerulu filtrāta nieru proksimālajos kanāliņos (Ramsay *et.al.*, 2001; Rebouche, 2004). Ikdienā ar pārtikas produktiem uzņemtā karnitīna biopieejamība ir 75%, taču no papildus uzņemtā karnitīna (1–6 g devas) cilvēka organisms spēj uzņemt tikai 5–18%, līdz ar to vēl lielāka tā uzņemšana netiks pilnvērtīgi absorbēta organismā (Evans un Fornasini, 2003; Lennon *et.al.*, 1986). Dzīvnieku izcelsmes produkti ir galvenais karnitīna avots, jo īpaši sarkanā gaļa, kas satur karnitīnu no 300 līdz 600 μmol 100 gramos produkta. Mazāki daudzumi atrodami zivīs un jūras veltēs (4–40 $\mu\text{mol}/100\text{g}$), graudu produktos (0–50 $\mu\text{mol}/100\text{g}$), augļos (1–20 $\mu\text{mol}/100\text{g}$), dārzeņos (0–50 $\mu\text{mol}/100\text{g}$), pākšaugos ($\sim 0,5$ $\mu\text{mol}/100\text{g}$) un piena produktos (0–200 $\mu\text{mol}/100\text{g}$) (Demarquoy *et.al.*, 2004; Panter un Mudd, 1969). Interesanti, ka ar sabalansētu uzturu cilvēki uzņem karnitīnu līdz pat 12 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ķermeņa masas dienā (līdz pat 135 mg dienā uzņem pieaudzis, 70 kg smags cilvēks), bet izteikti veģetārieši uzņem karnitīnu

pat mazāk kā 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ ķermeņa masas (Cederblad, 1987; Khan-Siddiqui un Bamji, 1980; Lombard *et.al.*, 1989).

Papildus uzņemšanai ar uzturu, karnitīns tiek sintezēts organismā no aminoskābēm lizīna un metionīna. Karnitīna oglekļa ķēdi veido lizīns, bet 4-*N*-metilgrupa tiek pievienota no metionīna molekulas (Vaz un Wanders, 2002). Karnitīna biosintēze, kurā kā starpprodukts veidojas γ -butirobetaīns (GBB), pārsvarā notiek aknās, nierēs, smadzenēs un vīriešiem arī sēkliniekos (Bieber, 1988; Rebouche, 1992). Tādu proteīnu kā, piemēram, miozīna, aktīna, citohroma c degradēšanas rezultātā atbrīvojas *N*⁶-trimetil-lizīns (TML), kas ir pirmais metabolīts karnitīna biosintēzē. TML hidroksilēšanu veic trimetillizīna hidroksilāze (TMLOH) (EC 1.14.11.8), tā iegūstot 3-hidroksi-*N*⁶-trimetillizīnu (HTML, 1. attēls, (Vaz un Wanders, 2002)).

Lai notiktu šī reakcija, papildus kā kofaktori ir nepieciešami 2-oksoglutarāts, Fe^{2+} joni un skābeklis. Reakcijas rezultātā papildus veidojas sukcināts un tiek atbrīvots oglekļa dioksīds. Lai nodrošinātu TMLOH enzimatisko aktivitāti, ir nepieciešama askorbātjonu (C vitamīna) klātbūtne. TMLOH ir lokalizēta mitohondriālajā matricā, bet pārējie trīs enzīmi, kas nepieciešami karnitīna biosintēzei, atrodas citosolā (1. attēls, (Vaz un Wanders, 2002)). TMLOH enzīms ir atrodams gan cilvēku, gan žurku audos, tā aktivitāte ir novērota aknās, skeleta muskuļos, sirdī un smadzenēs, bet visaugstākā aktivitāte ir atrasta nierēs (Vaz un Wanders, 2002).



1. attēls. **Karnitīna biosintēzes shēma.** Karnitīna biosintēze no TML. Lizosomās proteīnu degradēšanas rezultātā tiek atbrīvots TML, ko hidroksilē TMLOH. Šīs reakcijas rezultātā tiek iegūts HTML, kas tiek aldolītiski sašķelts, izmantojot piridoksāl 5'-fosfātu (PLP) kā kofaktoru, iegūstot 4-*N*-trimetilaminobutiraldehīdu (TMABA) un glicīnu. Pēc tam TMABA oksidē 4-*N*-trimetilaminobutiraldehīda dehidrogenāze (TMABA-DH) un veidojas 4-*N*-trimetilaminobutirāts jeb γ -butirobetaīns (GBB). GBB hidroksilē γ -butirobetaīna hidroksilāze (GBBOH), iegūstot L-karnitīnu. (Attēls ar izmaiņām no Vaz un Wanders, 2002)

3-hidroksitrimetillizīna aldolāze (HTMLA; EC 4.1.2.'X') katalizē 3-hidroksitrimetillizīna (HTML) aldolītisko šķelšanu, kā rezultātā veidojas 4-*N*-trimetilaminobutiraldehīds (TMABA) un glicīns. Lai gan par HTMLA ir maz datu, ir zināms, ka šī enzīma visaugstākā aktivitāte konstatēta aknās, tomēr tā ir ļoti mainīga (Vaz un Wanders, 2002). TMABA dehidrogenē 4-*N*-trimetilaminobutiraldehīda dehidrogenāze (TMABA-DH; EC 1.2.1.47), un rezultātā veidojas γ -butirobetaīns (GBB). TMABA-DH aktivitātei noteikti ir nepieciešama NAD⁺ klātbūtne, un reakcijas gaitā veidojas nikotīnamīda adenīna dinukleotīds (NADH). Visaugstākā TMABA-DH koncentrācija ir aknās, būtiski daudz enzīma ir nierēs, bet maz ir smadzenēs, sirdī un muskuļos. Pēdējā karnitīna biosintēzes posmā GBB hidroksilāze (GBBOH; EC 2.1.2.1.) hidroksilē GBB, iegūstot L-karnitīnu. GBBOH aktivitāti ievērojami stimulē 2-oksoglutarāts, tāpat šī enzīma aktivitātei nepieciešama Fe²⁺ jonu, skābekļa un askorbātjonu klātbūtne.

1.1.2. Karnitīna transports smadzeņu audos

Pēdējās desmitgadēs ir atklāti vairāki karnitīna transportproteīni dažādos perifērajos audos. Ir novērots, ka smadzenēs, izņemot hipotalāmu, karnitīna saturs ir zemāks nekā perifērajos audos (Bresolin *et.al.*, 1982). Organisko katjonu/karnitīna otrā tipa transportproteīns (OKTN2) ir viens no galvenajiem transportieriem karnitīna transporta nodrošināšanai smadzenēs (Kido *et.al.*, 2001). Ir zināmi arī citi karnitīna transportproteīni no šīs saimes, piemēram, OKTN1 (Tamai *et.al.*, 2000), bet šī transportproteīna spēja transportēt karnitīnu ir ievērojami zemāka nekā OKTN2 (Yabuuchi *et.al.*, 1999), bez tam abi transportproteīni ir Na⁺ jonu atkarīgi. Savukārt OKTN3 ir augstas afinitātes karnitīna transportproteīns, kas ir Na⁺ jonu neatkarīgs un pārsvarā ir atrodamas sēkliniekos (Tamai *et.al.*, 2000).

Karnitīns var tikt transportēts caur ATB^{0,+}, kas ir Na⁺, Cl⁻ jonu atkarīgais zemas afinitātes (karnitīna Km ~1 mM) aminoskābju transportproteīns (Nakanishi *et.al.*, 2001). ATB^{0,+} ir ekspresēts zarnu traktā, trahejā, plaušās, piena dziedzeros un hipokampā (Sloan un Mager, 1999). Uzskata, ka ATB^{0,+} kombinācijā ar OKTN2 regulē karnitīna uzņemšanu caur hematoencefālisko barjeru (Ganapathy *et.al.*, 2000).

Karnitīns uzkrājas smadzeņu asinsvadu endotēlija šūnās, sasniedzot līdz pat 46% no kopējā uzkrātā karnitīna daudzuma (Mroczkowska *et.al.*, 2000). Ir nedaudz informācijas par karnitīna uzkrāšanos astrocītos un nervu šūnās. Sākotnējos pētījumos parādīts, ka karnitīna uzkrāšanos smadzenēs varētu ierobežot strukturāli līdzīgs neiromediators γ -aminosviestskābe (GASS), jo tas kavēja karnitīna uzkrāšanos sinaptosomu paraugos no jūras cūciņām (Zoccarato *et.al.*, 1987) un žurku smadzeņu griezumu paraugos (Fariello un Shug, 1981). Tomēr vēlāk veiktajā pētījumā tika noskaidrots, ka GASS uzkrāšanās neietekmē karnitīna sintēzi un akumulāciju smadzeņu garozas neironos (Wawrzencyk *et.al.*, 2001).

1.1.3. Karnitīns šūnu enerģijas metabolisma reakcijās

Karnitīnam ir ļoti nozīmīga loma muskuļu audu enerģijas metabolisma sabalansēšanā, tāpat arī garo ķēžu taukskābju transportēšanā (Calvani *et.al.*, 2000). Ar karnitīna palīdzību aktivētās acil-grupas tiek transportētas caur mitohondrija iekšējo membrānu, kas ir nepieciešams posms garo ķēžu taukskābju oksidēšanai mitohondrijos visās šūnās (Foster, 2004). Citas karnitīna funkcijas ir acil-koenzīma A un koenzīma A (acil-KoA/KoA) attiecības regulācija, enerģijas uzkrāšana

acetilkarnitīna veidā un acil-grupu toksiskā efekta samazināšana, veidojot karnitīna acil esterus (Vaz un Wanders, 2002).

Lai šūnas, it īpaši muskuļu šūnas, iegūtu enerģiju, tās izmanto gan taukskābes, gan ogļhidrātus, kas pēc to uzņemšanas tiek iesaistīti specifiskos katabolisma procesos, kā rezultātā veidojas kopīgs metabolīts acetil-KoA. Šis metabolīts oksidējas mitohondrijos Krebsa ciklā, kas piegādā elektotransportķēdei nepieciešamos reducētos ekvivalentus (reducēto nikotīnamīdadenīdinukleotīdu (NADH^+) un flavīna adenīna dinukleotīdu (FADH_2)). Pateicoties NADH^+ un FADH_2 oksidācijai elektrontransportķēdē var notikt adenozinā trifosfāta (ATF) sintēze, kas tālāk šūnas nodrošina ar enerģiju. Parasti muskuļu šūna pamatā iegūst enerģiju taukskābju oksidācijas rezultātā, taču skābekļa trūkuma apstākļos šūnai ir izdevīgāka glikozes oksidēšana nekā taukskābju izmantošana, jo šis process ir spējīgs noritēt pie mazāka skābekļa daudzuma (Schofield un Hill, 2001; Taegtmeyer *et.al.*, 1998). Viens no faktoriem, kas nosaka garo ķēžu taukskābju izmantošanas intensitāti, kā arī šo taukskābju patēriņu šūnu enerģētiskajā metabolismā ir karnitīna biopieejamība.

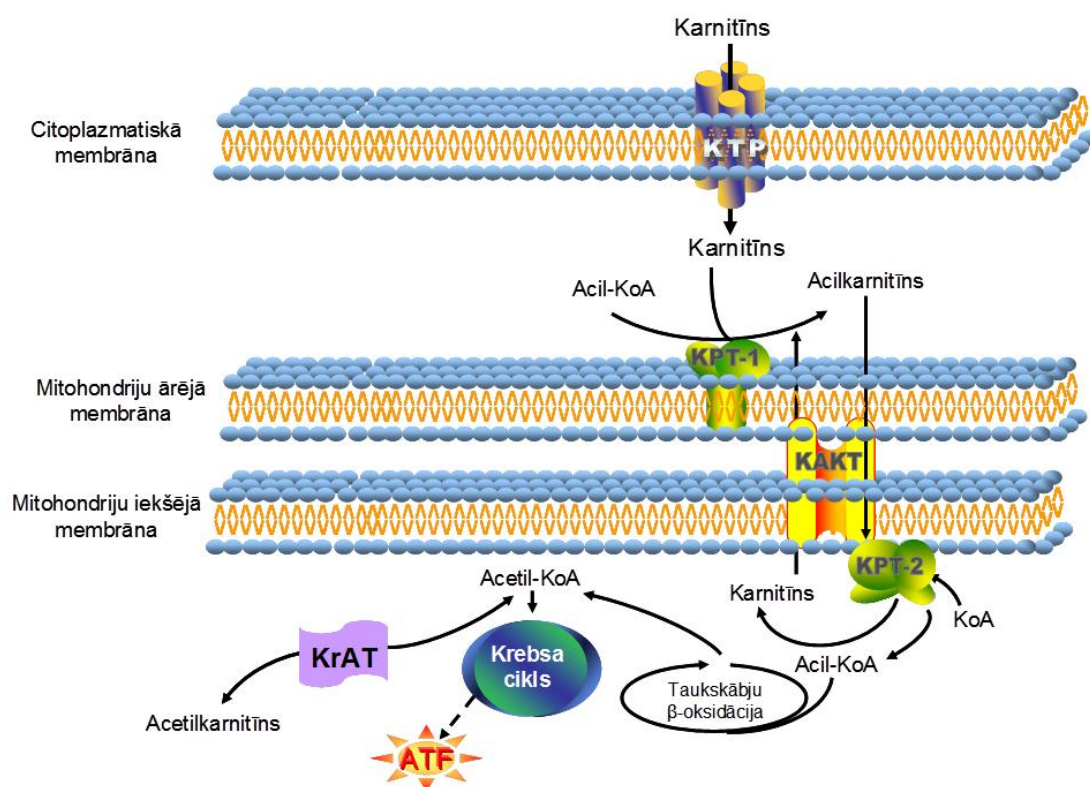
Ir zināmas trīs karnitīna palmitoiltransferāzes proteīna izoformas – aknu – KPT-1A (Esser *et.al.*, 1993), muskuļu KPT-1B (Yamazaki *et.al.*, 1995) un smadzeņu specifiskā izoforma KPT-1C (Price *et.al.*, 2002). KPT-1A un KPT-1B atrodas mitohondrija ārējā membrānā. Smadzeņu izoforma KPT-1C ir atšķirīga no pārējām divām izoformām. Tās c-termināls ir garāks nekā pārējām KPT izoformām (Price *et.al.*, 2002), un tā atrodas šūnas endoplazmatiskajā tīklā nevis mitohondriju membrānā. KPT-1C aktivitāte ir zema (Sierra *et.al.*, 2008), bet tas saistās ar KPT-1 fizioloģisko inhibitoru malonil-KoA ar tādu pašu afinitāti kā KPT-1A (Wolfgang *et.al.*, 2006). Interesanti, ka KPT-1C ir atrasti tikai zīdītāju smadzeņu audos (Price *et.al.*, 2002), savukārt pārējās izoformas ir ekspresētas arī zivīs, rāpuļos un kukaiņos. Tas varētu norādīt uz KPT-1C specifisko nozīmi zīdītāju smadzenēs.

KPT-1C fizioloģiskā nozīme tiek saistīta ar uztura uzņemšanas kontrolēšanu un enerģijas homeostāzi (Sierra *et.al.*, 2008; Wolfgang *et.al.*, 2006). Ir parādīts, ka ģenētiski modificētās pelēs, kurām bija izslēgts KPT-1C enzīms, novēroja pārtikas uzņemšanas samazinājumu, salīdzinot ar veselām pelēm. Toties, kad šādi modificētās peles baroja ar augsta tauku satura diētu, tām novēroja aptaukošanos un diabētu (Dai *et.al.*, 2007). Savukārt pētījumā ar pelēm, kurām bija pāraktivēts KPT-1C, novēroja samazinātu svaru vai anorektisku efektu (Gao *et.al.*, 2011). Nesen ir parādīts, ka KPT-

1C ir iesaistīts mācīšanās procesā un pelēm, kurām bija samazināta KPT-1C aktivitāte, novēroja pasliktinātu iemācīšanās procesu (Carrasco *et.al.*, 2012).

Arī KPT-1A ir ekspresēts smadzenēs, īpaši hipotalamā. KPT-1A ir galvenais enzīms, kas taukskābes transportē mitohondrijā β-oksīdācijai, pārveidojot tās no acil-KoA uz acilkarnitīnu (Mera *et.al.*, 2009; Robinson un Zammit, 1982). Ir zināms, ka hipotalāma KPT-1 ir svarīga nozīme ikdienas pārtikas uzņemšanā (Obici *et.al.*, 2003). Iepriekšējos pētījumos ir parādīts, ka, ievadot selektīvu KPT-1A inhibitoru, novēro samazinātu uztura uzņemšanu (Obici *et.al.*, 2003). Līdz ar to varētu domāt, ka KPT-1 modulācija varētu kontrolēt pārtikas uzņemšanu un ķermeņa masu (Gao *et.al.*, 2011).

Brīvās taukskābes tiek aktivētas taukskābju katabolisma sākuma posmā, kur acil-KoA-ligāžu ietekmē tiek veidots acil-KoA. Nākamajā posmā no karnitīna un acil-KoA ar mitohondriju ārējās membrānas enzīma KPT-1 palīdzību tiek sintezēts attiecīgais acilkarnitīns (2. attēls).



2. attēls. **Karnitīna loma garo ķēžu taukskābju metabolismā.** KPT – karnitīna transportproteīns, AKoAL – acil-koenzīma A ligāze, KPT-1 – karnitīna palmitoiltransferāze 1, KPT-2 – karnitīna palmitoiltransferāze 2, KAKT – karnitīna-acilkarnitīna translokāze, ATF – adenozīntrifosfāts, KoA – koenzīms A, KrAT – karnitīna acetiltransferāze.

Pēc tam acilkarnitīns tiek virzīts cauri mitohondrija iekšējai membrānai ar karnitīna-acilkarnitīna translokāzes (KAKT) palīdzību. Nākamais enzīms, KPT-2 (EC. 2.3.1.21) mitohondriju iekšienē no acilkarnitīna atkārtoti izveido acil-KoA, ko pēc tam β -oksidācijas reakcijās sašķeļ līdz acetil-KoA, un šī reakcija ir pretēja tai, ko iepriekš veica KPT-1.

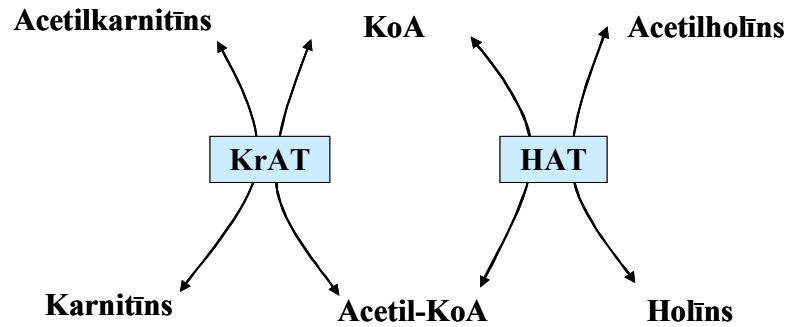
Nozīmīgi atcerēties, ka KPT-1 reakcija ir viens no garo ķēžu taukskābju oksidācijas ātrumu noteicošajiem posmiem, un karnitīna koncentrācijas samazināšanās rezultātā tiek palēnināts garo ķēžu taukskābju transports mitohondrijos un to tālākā oksidācija. Taču īso ķēžu taukskābes (C1–C8) cauri mitohondriju membrānām difundē bez karnitīna palīdzības (acil-KoA veidā). Aktivētu garo ķēžu taukskābju molekulu (acilkarnitīns, acil-KoA) uzkrāšanās šūnās kavē vairāku enzīmu aktivitāti, kā arī ATF transportu no mitohondrijiem uz citosolu, un līdzīgi kā deterģenti tieši bojā membrānas (Morin *et.al.*, 2001). Šāda veida situācija audos veidojas nepietiekama skābekļa apgādes gadījumā.

Vēl viens no karnitīna aciltransferāžu sistēmas veidojošajiem enzīmiem ir karnitīna acetiltransferāze (KrAT EC 2.3.1.7.). KrAT ir plaši izplatīts zīdītāju audos, tai skaitā arī smadzenēs, visaugstāko koncentrāciju sasniedzot hipotalāmā (Bresolin *et.al.*, 1982). KrAT atgriezeniski pārvērš acetilkarnitīnu un KoA par karnitīnu un acetil-KoA, kas tiek izmantots tālākajās reakcijās (White un Scates, 1990). Vēl viena no KrAT būtiskām funkcijām ir KoA līmeņa atjaunošana, kas ļauj notikt peroksisomālajai β -oksidācijai, atvieglojot acetil-daļas transportēšanu uz mitohondriju tālākai oksidācijai (Zammit, 1999). Izmainīta KrAT aktivitāte ir konstatēta dažādu neirotiskā slimību gadījumā, piemēram, Alcheimera slimības rezultātā šī enzīma aktivitāte ir samazināta dažādos smadzeņu reģionos (Bailey un Lahiri, 2012; Makar *et.al.*, 1995). Ir zināms, ka KrAT aktivitātes samazināšanās ir saistīta arī ar novecošanos (Liu *et.al.*, 2002), tāpēc ir svarīgi regulēt karnitīna aciltransferāžu enzīmus, lai novērstu vai samazinātu mitohondriju disfunkciju dažādu slimību gadījumā. Turklāt karnitīns ne tikai regulē garo ķēžu taukskābju transportu mitohondrijos, bet arī acetil-KoA/KoA attiecību, tādējādi ietekmējot arī piruvāta dehidrogenāzes (PDH) kompleksa aktivitāti un glikozes metabolismu (Lopaschuk, 2001). Acetil-KoA/KoA attiecības palielināšanās izsauc PDH aktivitātes kavēšanu. Savukārt acetil-KoA/KoA attiecības samazināšanās mitohondrijā var palielināt PDH kompleksa aktivitāti, tādējādi ietekmējot glikozes oksidēšanu.

Jāsecina, ka līdzšinējie pētījumi ir pierādījuši, ka karnitīnam ir ne tikai svarīga loma garo ķēžu taukskābju oksidācijā, bet arī ogļhidrātu metabolismā. Līdz ar to karnitīna koncentrācijas izmaiņas ļauj tieši regulēt enerģijas metabolisma procesus audos, ietekmējot taukskābju un ogļhidrātu īpatsvaru ATF sintēzes nodrošināšanā.

1.1.4. Karnitīna ietekme uz CNS signālu pārnesei molekulām

Karnitīna ietekmi uz CNS signālu pārnesei molekulām saista ar efektiem uz to sintēzi un funkciju nodrošināšanu. Vairākos pētījumos ir parādīts, ka karnitīns ietekmē nervu augšanas faktora veidošanos, kā arī uzlabo nervu reģenerāciju, palielinot mielīna šķiedru blīvumu un aksonu diametru (De Angelis *et.al.*, 1994). Hroniska noguruma pacientiem konstatēta samazināta neurotransmiteru biosintēze karnitīna deficīta apstākļos (Kuratsune *et.al.*, 2002). Savukārt karnitīna terapija samazina fizisko un mentālo nogurumu vecāka gadagājuma cilvēkiem un uzlabo kognitīvo stāvokli (Malaguarnera *et.al.*, 2007). Daži pētnieki domā, ka karnitīna neiroprotektīvā darbība neironos var būt saistīta ar ietekmi uz endogēnā acetilholīna (ACh) koncentrāciju. Visticamāk, ka tas ir saistīts ar potenciālu donēt acetil-grupu (White un Scates, 1990), ietekmējot vairākus ACh metabolisma aspektus (skatīt 3. attēlu). Acetilkarnitīna ievadīšana palielina holīna līmeni un ACh sintēzi *striatum* un hipokampusā žurkām (Imperato *et.al.*, 1989). Karnitīna un holīna ievadīšana izraisa ACh sintēzes stimulāciju smadzeņu garozas šūnās pieaugušām žurkām (Wawrzencyk *et.al.*, 1995). Neironu funkcionālā aktivitāte pēc hipoksijas un glikozes trūkuma labāk atjaunojas pēc karnitīna ievadīšanas, bet holīna transportiera inhibitora pievienošana pārtauc karnitīna aizsargājošo efektu (Picconi *et.al.*, 2006). Kādā pētījumā izteikta doma, ka karnitīna terapija var uzlabot holīnerģisko neironu signālu pārnesei, palielinot acetil-KoA koncentrāciju citoplazmā (Szutowicz *et.al.*, 2005).

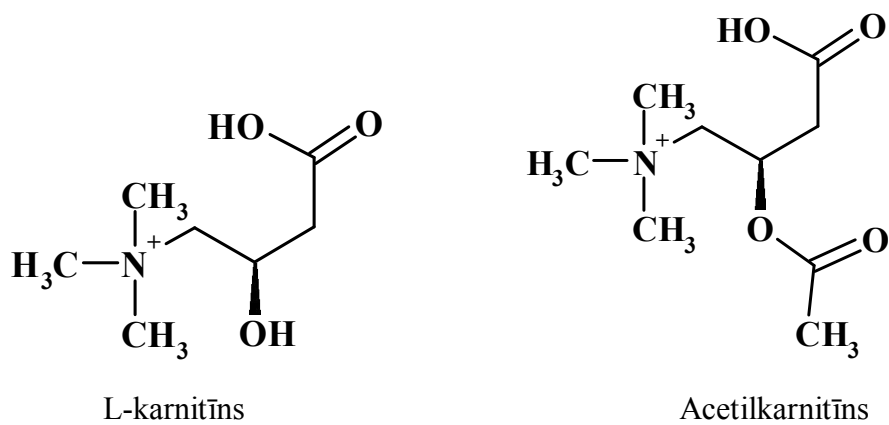


3. attēls. **Acetilholīna sintēze no acetil-KoA un holīna.** Acetil-KoA veidojas, acetilkarnitīnam donējot acetil grupu, ko pārnes KrAT. KrAT – karnitīna acetiltransferāze, HAT – holīna acetiltransferāze. (Attēls ar izmaiņām no White un Scates, 1990)

Jaunās pieaugušās pelēs ir parādīts, ka piecu dienu karnitīna terapija palielina GASS koncentrāciju smadzenēs (Fariello *et.al.*, 1988). Līdz ar to varētu secināt, ka karnitīna biopieejamības regulācija smadzeņu audos ietekmē CNS signālu pārnese procesus.

1.2. Karnitīna sistēmas nozīme un farmakoloģiskā regulācija dažādu CNS slimību gadījumā

Neirodeģeneratīvo slimību ārstēšanas iespēju pētījumiem izmanto karnitīnu un karnitīna atvasinājumu acetilkarnitīnu (skatīt 4. attēlu). Vairāk pētījumu ir veikts ar acetilkarnitīnu, jo tas vieglāk spēj šķērsot hematoencefālisko barjeru (Parnetti *et.al.*, 1992). Acetilkarnitīna un brīvā karnitīna attiecība visaugstākā ir smadzenēs, kur tā sasniedz attiecību 1:2, bet sirds audos 1:4, nierēs 1:10 (Virmani un Binienda, 2004).



4. attēls. **Karnitīna un acetilkarnitīna struktūrformulas.**

1.2.1. Karnitīns eksperimentālajos modeļos un klīnikā

Karnitīna terapijas ietekmi pēta dažādu neiroloģisko slimību gadījumos gan dzīvnieku eksperimentālajos modeļos, gan klīniskajos pētījumos. Karnitīna efekti tiek pētīti tādos saslimšanu gadījumos kā autisms (Filipek *et.al.*, 2004), ar vecumu saistītie mentālie traucējumi (Malaguarnera *et.al.*, 2007), insults (Zhang *et.al.*, 2012), hipoksija (Maresova *et.al.*, 2001), kā arī epilepsija (Yu *et.al.*, 1997) (5. attēls). Ir parādīts, ka karnitīna terapija aizsargā pret etanola izraisīto oksidatīvo stresu (Augustyniak un Skrzydlewska, 2009), kā arī ilgstoša karnitīna lietošana kopā ar etanola diētu žurkām samazina aknu iekaisuma un patoloģiju attīstību (Bykov *et.al.*, 2003).

Dažādos eksperimentos ir pētīta karnitīna terapijas ietekme insulta gadījumā, un karnitīna terapijai ir parādīts aizsargājošs efekts pēc hipoksijas-īšēmijas radītajiem bojājumiem (Wainwright *et.al.*, 2006). Eksperimentā ar pelēm ir parādīts, ka karnitīnu ievadot pirms īšēmijas, tiek saglabāta enerģijas metabolītu (ATF, piruvāta, fosfokreatīna) koncentrācija smadzenēs (Matsuoka un Igisu, 1992). Turklāt karnitīns samazina nervu šūnu mirstību un deģenerāciju mitohondriju disfunkcijas eksperimentālajā žurku modelī (Binienda *et.al.*, 2005). Tāpat vēl citi efekti novēroti hipoglikēmijas izraisītajā nervu bojājumu modelī hipokampā, karnitīnam saglabājot mitohondriju funkcijas (Binienda, 2003). Tomēr karnitīna neiroprotektīvie efekti nav viennozīmīgi, jo ir eksperimenti, kuros karnitīna terapija nedeva gaidītos uzlabojumus, ne samazinot bojāto audu daudzumu, ne uzlabojot fizioloģiskos parametrus (Slivka *et.al.*, 1990). Nesen ir veikts ļoti interesants eksperiments, kurā salīdzināti karnitīna un acetilkarnitīna terapijas efekti, ievadot tos žurkām 24 stundas pirms eksperimentālā insulta. Iegūtie rezultāti parādīja, ka acetilkarnitīna ievadīšana būtiski samazināja bojāto audu daudzumu, bet karnitīnam nebija tādas ietekmes, kas tiek skaidrots ar šo savienojumu atšķirīgo afinitāti pie transportproteīniem (Zhang *et.al.*, 2012).

Karnitīnam tiek piedēvēta nozīmīga loma arī cukura diabēta gadījumā un ar to saistīto komplikāciju neiropātiju attīstības novēršanā. Dažos pētījumos cukura diabēta pacientiem konstatēta samazināta karnitīna koncentrācija asinīs, tāpēc iesaka papildus ikdienas uzturam lietot karnitīnu (Capaldo *et.al.*, 1991; Mingrone, 2004). Pētījumā, kurā piedalījās 2. tipa cukura diabēta pacientes, darba autori ieteica papildus lietot karnitīnu, it īpaši diabēta komplikāciju novēršanai (Poorabbas *et.al.*, 2007). Tomēr

nesen veiktā pētījumā ir parādīta apgriezta karnitīna koncentrācijas un neiro-pātisko sāpju saistība, un novērots, ka pacientiem ar augstāku karnitīna koncentrāciju asins plazmā ir biežāk diagnosticētas neiro-pātiskās sāpes (Liepinsh *et.al.*, 2012).

Tā kā vīriešu sēkliniekos iespējama karnitīna biosintēze, kā arī, ņemot vērā karnitīnam ilglaicīgi piedēvētās antioksidanta un vitamīna funkcijas, ir pētīti tā iespējamie efekti uz vīriešu reproduktīvo sistēmu (Kumar *et.al.*, 2006). Viena no galvenajām karnitīna funkcijām ir nodrošināt enerģijas metabolisma procesus spermatozoīdos. Karnitīns veicina spermas kustīgumu un ietekmē spermatozoīdu nobriešanu. Tas ir īpaši svarīgi, jo spermā taukskābju oksidēšana ir galvenais enerģijas avots, tāpēc ir būtiski uzturēt augstu karnitīna koncentrāciju, lai tas nodrošinātu taukskābju transportu uz mitohondriju. Zems karnitīna līmenis samazina taukskābju koncentrāciju mitohondrijā, tādējādi samazinot gan enerģijas produkciju, gan potenci un samazinot spermatozoīdu kustīgumu (Sinclair, 2000). Ir zināms, ka sēklinieka piedēklī (*epididymis*) un tajā esošajos spermatozoīdos ir augsta karnitīna koncentrācija, lai nodrošinātu spermatozoīdu funkcionālo darbaspēju un kustīgumu.

Karnitīnu izmanto klīnikā, lai palielinātu spermas aktivitāti pacientiem ar spermatozoīdu disfunkciju (Ng *et.al.*, 2004). Ir dati, ka testosterona ietekmē palielinās karnitīna koncentrācija šūnās, savukārt gan vīriešu, gan sieviešu seksuālie hormoni palielina karnitīna koncentrāciju un karnitīna-acetil-transferāzes aktivitāti šūnās (Cavallini *et.al.*, 2004b). Karnitīns samazina arī erektilo disfunkciju un uzlabo orgasmu vīriešiem ar dzimumhormonu koncentrāciju asinīs normas robežās (Cavallini *et.al.*, 2004a).

Vairākās publikācijās ir aprakstīts, ka karnitīna lietošanas rezultātā klīnikā pacientiem uzlabojusies spermas kvalitāte (Costa *et.al.*, 1994; Ng *et.al.*, 2004). Savukārt citi dati norāda, ka karnitīna koncentrāciju spermas plazmā varētu izmantot kā bioķīmisku auglības marķieri (Li *et.al.*, 2007). Šādi iegūtie rezultāti būtu daudz ticamāki par testosterona noteikšanu asinīs vai mitohondriālās aktivitātes mērīšanu spermatozoīdos (Ruiz-Pesini *et.al.*, 2001). Lai gan vairākos eksperimentos un klīniskajos pētījumos ir parādīts karnitīna un tā esteru iedarbība uz erektilās disfunkcijas un neauglības ārstēšanu, iegūtie rezultāti nav pārliecinoši un novērotais efekts nekorelē ar spermatozoīdu kustīguma rādītājiem un citiem klīnikā izmantotajiem novērtēšanas parametriem (testosterona un lipīdu koncentrācija, grūtniecības iestāšanās) (Agarwal un Said, 2004; Kumar *et.al.*, 2006; Morano *et.al.*, 2007). Karnitīna lietošanas efekts uz vīriešu seksuālās kvalitātes parametriem varētu

būt maskēts ar tā komplicēto uzņemšanas regulāciju un homeostāzi, kas uztur vienmērīgu karnitīna koncentrāciju *in vivo*. Vairākos pētījumos konstatēts, ka, lai gan karnitīns lietots klīnikā devā 2 g dienā, karnitīna koncentrācijas palielināšanos spermas paraugos nekonstatēja (Lenzi *et.al.*, 2003; Lenzi *et.al.*, 2004).

Gan cilvēkiem, gan žurkām karnitīna koncentrācija plazmā ir atkarīga no vecuma un dzimuma. Cilvēkiem karnitīna koncentrācija pieaug pirmā dzīves gada laikā no ≈ 15 līdz ≈ 40 μM un nemainās abiem dzimumiem līdz sākās pubertāte. Vīriešiem karnitīna koncentrācija paaugstinās un nostabilizējas augstākā līmenī nekā sievietēm (50 μM vīriešiem un 40 μM sievietēm). Tas liek domāt, ka dzimumhormoniem ir ietekme uz karnitīna koncentrāciju plazmā. Starp žurku dzimumiem ir vēl izteiktākas atšķirības. Žurku tēviņiem karnitīna koncentrācija asins plazmā ir divreiz lielāka nekā žurku mātītēm (50 μM tēviņiem un 20 μM mātītēm) (Vaz un Wanders, 2002). Savos pētījumos Marson ar kolēģiem (Marson *et.al.*, 1991) ir parādījis, ka šimpanzu tēviņiem palielinās karnitīna koncentrācija sēklas šķidrumā, tai nobriestot reproduktīvajos orgānos. Sēklinieku audos ekspresējas GBBOH (Bieber, 1988; Rebouche *et.al.*, 1984), kuras aktivitāte žurku audos pieaug līdz ar seksualitātes nobriešanu, to pierāda veiktie mērījumi sēklvados (Carter *et.al.*, 1987). Šie veiktie eksperimenti ļauj domāt, ka karnitīna produkcija varētu būt saistīta ar spermatogēnēzes un spermas nobriešanas procesiem (Carter *et.al.*, 1987).

Kopumā var teikt, ka, lai gan karnitīns tiek plaši pētīts un izmantots klīnikā kā papildus terapija dažādu neiroloģisko slimību gadījumā, tomēr pētnieku viedokļi par karnitīna darbības mehānismiem un klīniskajiem ieguvumiem atšķiras vai pat ir pretēji.

1.2.2. Acetilkarnitīns eksperimentālajos modeļos un klīnikā

Acetilkarnitīna efekti ir pētīti dažādos neiroloģisko slimību gadījumos, piemēram, Pārkinsona sindromā (Beal, 2003), Dauna sindromā (Pueschel, 2006), Hantingtona slimībā (Goety *et.al.*, 1990), ar vecumu saistītajos mentālajos traucējumos (Herrmann *et.al.*, 1990), aknu encefalopātijās (Malaguarnera *et.al.*, 2008), kā arī amonija neirotoksiskuma gadījumā (Malaguarnera *et.al.*, 2009; Matsuoka un Igisu, 1992) (5. attēls).

Gan karnitīna, gan acetilkarnitīna terapijas pozitīvo ietekmi neurodeģenerācijas slimību simptomu mazināšanā galvenokārt saista ar mitohondriju elpošanas stimulāciju. Ar karnitīna un acetilkarnitīna palīdzību neironos pastarpināti tiek nodrošināts mitohondriju membrānas potenciāls un tādējādi uzturēts nepieciešamais

ATF ražošanas līmenis (McDaniel *et.al.*, 2003). Eksperimentālajā žurku modelī acetilkarnitīna terapija uzlaboja izziņas funkciju un uzlaboja ilglaicīgo atmiņu, kas tiek skaidrots ar sinaptisko plastiskumu, novēršot NMDA receptoru zudumu un palielinot neirotrofina veidošanos, dzīvniekiem novecojot (McDaniel *et.al.*, 2003).

Dažādas neurodeģeneratīvās slimības, piemēram, Alzheimeras saslimšana, ir saistītas ar mitohondriju disfunkciju un paaugstinātu oksidatīvo stresu, kā arī samazinātu sinaptisko pārvadi (Keating, 2008). Neironu funkcionēšanai nepieciešami ievērojami enerģijas resursi, tāpēc to sinapšu presinaptiskajā daļā koncentrēts īpaši daudz mitohondriju (Palay, 1956). Mitohondriji ražo gan ATF, gan aktīvās skābekļa formas (ROS), un iespējams, ka tam ir būtiska nozīme sinapšu darbības regulācijā (Keating, 2008). Tā kā acetilkarnitīns un brīvais karnitīns paaugstina mitohondriju funkcionalitāti un enerģētisko iznākumu, sagaidāms, ka šīs pašas molekulas varētu darboties arī kā neurodeģeneratīvo slimību kavētājas un neurotransmisijas regulatori. Par Alzheimeras slimības galveno iemeslu uzskata beta amiloīdu (A β peptīdi) uzkrāšanos. Šūnu kultūrā A β peptīda uzkrāšanās var samazināt acetyl-CoA līmeni un holīna acetiltransferāzes aktivitāti (Szutowicz *et.al.*, 2005). Acetilkarnitīna papildus pievienošana novērš šos efektus, taču nesamazināja nediferencēto šūnu mirstību. Acetilkarnitīna pievienošana diferencētu neiroblastu šūnām samazināja gan oksidatīvo stresu, gan ATF patēriņu, gan šūnu mirstību (Dhitavat *et.al.*, 2002).

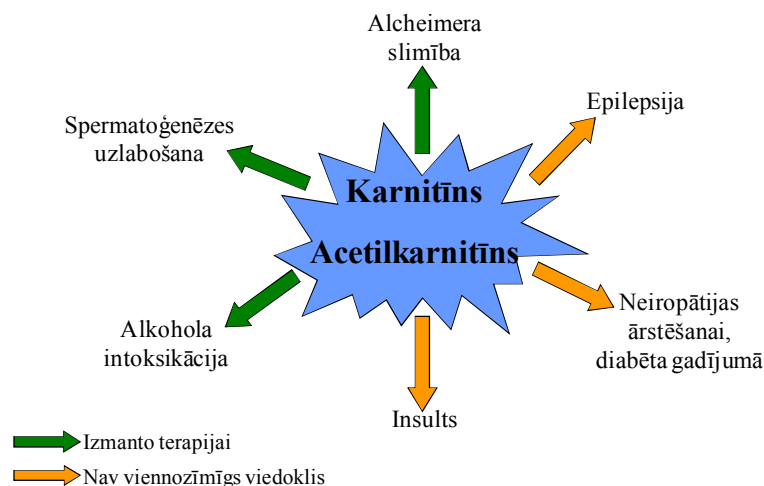
Veicot meta analīzi, kurā iekļāva 21 pētījumu par acetilkarnitīna terapijas ietekmi pacientiem ar viegliem Alzheimeras slimības simptomiem uz izziņas procesiem, tika novēroti uzlabojumi pacientiem ar viegliem kognitīvajiem traucējumiem. Šajos pētījumos tika izmantota no 1,5 līdz 2 g liela deva (Montgomery *et.al.*, 2003). Alzheimeras slimības gadījumā novērotais pozitīvais efekts tika saistīts ar oksidatīvā stresa un nervu šūnu bojāejas samazinājumu (Mancuso *et.al.*, 2007). Valda viedoklis, ka acetilkarnitīns varētu būt kā alternatīva terapija pacientiem ar acetilholīnesterāzes inhibitoru nepanesību. Interesanti, ka acetilkarnitīna terapija uzlaboja kognitīvo darbību arī pētījumā ar alkoholiķiem (Tempesta *et.al.*, 1990).

Arī depresijas gadījumā iesaka acetilkarnitīna terapiju. Ir vairāki pētījumi, kuros parādīts, ka acetilkarnitīna terapija samazina depresijas simptomus (Garzya *et.al.*, 1990; Tempesta *et.al.*, 1987). Malaguarnera ar kolēģiem veicis pētījumu, kurā acetilkarnitīna terapija (2 g divreiz dienā) samazina pacientiem depresiju, kā arī baiļu un trauksmes sajūtu (Malaguarnera *et.al.*, 2011).

Acetilkarnitīnam vairākos pētījumos ir parādīta aizsargājoša darbība pārejošas lokālas (Lolic *et.al.*, 1997; Shuaib *et.al.*, 1995) un vispārējas smadzeņu išēmijas gadījumā (Rosenthal *et.al.*, 1992). Žurkām, pirms insulta operācijas vienreizēji ievadot acetilkarnitīnu, aizsargājošus efektus nenovēroja: bojāto smadzeņu audu daudzums bija līdzīgs vai pat lielāks nekā kontroles dzīvniekiem (Jalal *et.al.*, 2010). Savukārt tajā pašā eksperimentālajā modelī demonstrēts, ka, ievadot acetilkarnitīnu piecas dienas 400 mg/kg lielā devā pēc pārejošā un ilgstošā insulta, novēro uz pusi samazinātu bojāto smadzeņu audu daudzumu, salīdzinot ar kontroles grupu (Jalal *et.al.*, 2010). Klīniskajā pētījumā (randomizēts, placebo kontrolēts, dubultaklajā manierē) insulta pacientiem, kuriem varēja nodalīt normoksijas un hipoksijas zonas, salīdzināja dažādu enzīmu aktivitāti oksidatīvā stresa apstākļos (Corbucci *et.al.*, 1992). Šajā pētījumā atkarībā no smadzeņu bojājuma novēroja būtiskus vairāku mitohondrija enzīmu (laktāta, piruvāta un sukciāta dehidrogenāzes, citohroma oksidāzes) aktivitāšu samazinājumus hipoksijas zonas audos. Acetilkarnitīna terapija daļēji samazināja hipoksijas radītos bojājumus un pat veicināja šūnu izdzīvošanu hipoksijas zonā (Corbucci *et.al.*, 1992). Tomēr nepieciešami papildu pētījumi, lai saprastu, kādas acetilkarnitīna devas un terapijas veidu izvēlēties sekmīgāku terapeitisko rezultātu sasniegšanai.

Pastāv uzskats, ka acetilkarnitīna darbības mehānisms varētu būt saistīts ar antioksidatīvo darbību un uzlabotu mitohondriju enerģētiku, kas pasargāja tos no neiropātijas radītās sāpju sajūtas (Vivoli *et.al.*, 2010). Vairākos pētījumos ir parādīts, ka acetilkarnitīna terapija samazina sāpīgās neiropātijas (Abdul Muneer *et.al.*, 2011; Binienda *et.al.*, 2010), antiretrovīrusu toksiskās neiropātijas (Herzmann *et.al.*, 2005) un ķīmijterapijas izraisītās neiropātijas (Ido *et.al.*, 1994). Polineiropātiju gadījumā acetilkarnitīns uzlabo nervu signālu pārvadīšanu un nervu šķiedru atjaunošanos (Sima, 2007).

Interesanti, ka vairākos pētījumos ir parādīts, ka acetilkarnitīna terapija palielina spermatozoīdu kustīgumu neauglīgiem vīriešiem ar spermas attīstības problēmām (Balercia *et.al.*, 2005; Lenzi *et.al.*, 2004).



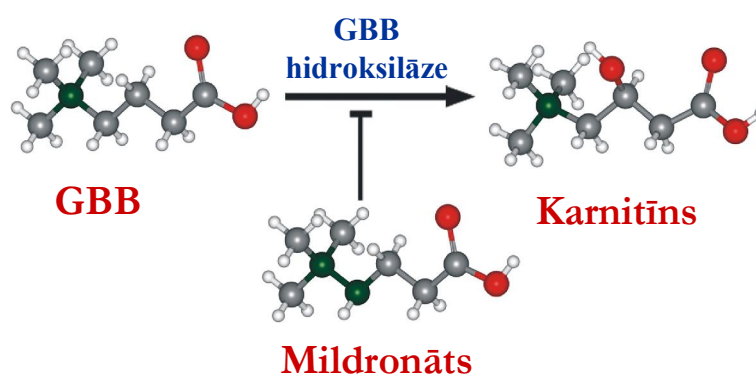
5. attēls. Karnitīna un acetilkarnitīna izmantošanas iespējas klīnikā.

Smadzenes enerģijas ieguvē izmanto galvenokārt glikozi, taču tās trūkuma apstākļos lieto alternatīvus enerģijas avotus. Ir zināms, ka bada stāvoklī pieaug lēkmju biežums epilepsijas pacientiem (Badawy *et.al.*, 2013), tāpēc enerģijas patēriņu vajag regulēt. Šī iemesla dēļ epilepsijas pacientiem iesaka ketogēno diētu, kas ir bagātīga ar taukiem, bet ar zemu ogļhidrātu saturu. Ir zināms, ka ketogēnā diēta var efektīvi samazināt krampju lēkmes dažādu epilepsiju gadījumos (Ma *et.al.*, 2007). Ketonu diēta un acetilkarnitīna lietošana dod līdzīgus rezultātus. Tādā veidā tiek palielināta beta-oksidācija, mitohondriju bioģenēze un enerģijas rezerves. Abos gadījumos novēro iekaisuma citokīnu (TNF- α un IL-1 β) līmeņu samazināšanos. Daudzas no iepriekš aprakstītajām acetilkarnitīna neiroprotektīvajām īpašībām var tikt izmantotas epilepsijas pacientu ārstēšanā, piemēram, ietekmējot neurotransmiteru sintēzi. Tā kā stimulētas tauku vielmaiņas gadījumā biežāk novēro apoptozi un paaugstinātu brīvo radikāļu līmeni (Li *et.al.*, 2005), acetilkarnitīns saista brīvos radikāļus un darbojas kā anti-apoptotisks aģents. Lai gan nesen veiktā eksperimentā acetilkarnitīns neparādīja pretkrampju darbību, tomēr autori iesaka turpināt pētījumus (Smeland *et.al.*, 2012).

Kopumā var secināt, ka gan karnitīns, gan acetilkarnitīns ir farmakoloģiski aktīvas vielas, tomēr to efektivitāte ne vienmēr ir klīniski pierādīta. Piemēram, acetilkarnitīna pētījumos ir ziņots par būtiskiem bioķīmisko un psihisko rādītāju uzlabojumiem (Montgomery *et.al.*, 2003), taču eksistē arī pētījumi, kuros būtiskas izmaiņas klīnikā nav novērotas (Thal *et.al.*, 2000).

1.2.3. Mildronāts kā karnitīna signālceļus inhibējošs aģents

Organisma līmenī karnitīna homeostāze tiek strikti regulēta, un papildus palielināt tā koncentrāciju audos ir samērā sarežģīti, tāpēc šādi iegūtie rezultāti nav pārlicinoši, un karnitīna sistēmas pētījumiem ieteicamāk izmantot citu stratēģiju – karnitīna koncentrācijas samazināšanu audos. Līdz šim zināmākais farmakoloģiskais aģents karnitīna koncentrācijas samazināšanai ir mildronāts. Kā mildronāta primārais bioķīmiskais iedarbības mehānisms sākotnēji tika pētīta karnitīna biosintēzes inhibēšana, jo atklāja, ka mildronāts ir karnitīna priekšteča, GBB, sintēzes nekonkurents inhibitors (6. attēls, Simkhovich *et.al.*, 1988). Vēlākie pētījumi apstiprināja, ka mildronāta ievadīšanas rezultātā tiek samazināta karnitīna koncentrācija audos, jo mildronāts ne tikai ir GBBOH inhibitors, bet arī kavē karnitīna atpakaļsūkšanos nierēs kā OKTN2 konkurējošais inhibitors (Hayashi *et.al.*, 2000; Kuwajima *et.al.*, 1999; Spaniol *et.al.*, 2001).



6. attēls. Mildronāts kavē GBB hidroksilāzes aktivitāti un karnitīna sintēzi no GBB.

Šis mehānisms nodrošina ātru karnitīna koncentrācijas samazināšanos asins plazmā, kamēr tā koncentrācija audos mainās lēnām. Mildronāta ietekmei uz karnitīna transportu nierēs varētu būt nozīmīga loma kopējās karnitīna koncentrācijas regulācijā.

Iepriekš veiktie pētījumi neapšaubāmi pierāda, ka mildronāts samazina gan kopējo, gan brīvo karnitīna daudzumu audos, veicot eksperimentus ar žurkām (Hayashi *et.al.*, 2000; Kuwajima *et.al.*, 1999; Tsoko *et.al.*, 1995) un jūrascūciņām (Dhar *et.al.*, 1996). Ir aprakstīts, ka mildronāts samazina karnitīna koncentrāciju žurku asins plazmā, sirds un aknu audos (Liepinsh *et.al.*, 2006; Spaniol *et.al.*, 2001). Mildronāts par 20% samazina arī karnitīna koncentrāciju cilvēka asins plazmā (Liepinsh *et.al.*, 2011). Tā kā karnitīna koncentrācija audos ir 20–50 reizes augstāka

nekā serumā, kavējot karnitīna transportu caur plazmatisko membrānu, tiek kontrolēta šūnās pieejamā karnitīna koncentrācija.

Ir parādīts, ka, samazinot karnitīna koncentrāciju, mildronāts kavē KPT-1 enzīma aktivitāti, kā rezultātā samazinās brīvo taukskābju daudzums, kas pārprodukcijas rezultātā bojā mitohondriju membrānu (Kuka *et.al.*, 2012). Mildronāts aizsargā no išēmijas radītajiem bojājumiem sirds audus, samazinot infarkta izmēru (Liepinsh *et.al.*, 2006), kā arī samazina aterosklerozes attīstīšanos (Vilskersts *et.al.*, 2009). Mildronāta terapija arī samazina hemodinamikas traucējumus un optimizē skābekļa līdzsvaru smadzenēs (Beketov *et.al.*, 2000), tādējādi uzlabojot neiropsiholoģiskos parametrus, neiroloģisko funkciju atjaunošanos un hemodinamiku išēmisku patoloģiju gadījumā (Dziak un Golik, 2003; Suslina *et.al.*, 2003; Vinichuk, 1991). Nesen veiktā randomizētā, dubultklā, paralēlu grupu pētījumā ir parādīts, ka mildronāts samazināja invalidātes iznākumu un uzlaboja neiroloģisko funkciju akūta išēmiska insulta gadījumā (Zhu *et.al.*, 2013).

Vēl viens mildronāta pielietojums neiroloģijā ietver vispārēju stāvokļa uzlabošanu pēc alkohola intoksikācijas (Sakvarelidze, 2006). Mildronāts tiek izmantots arī papildus terapijai diabēta pacientiem sensorimotoro neiropātiju ārstēšanai (Statsenko *et.al.*, 2008), kā arī ir parādīts, ka mildronāta terapija aizsargā no sāpju jutīguma zuduma 2. tipa cukura diabēta eksperimentālajā modelī Goto-Kakizaki žurkās (Liepinsh *et.al.*, 2009b). Arī citu autoru darbos ir parādīts, ka mildronāts samazina neiropātijas attīstību streptozotocīna eksperimentālajā modelī (Sokolovska *et.al.*, 2011). Bez tam 2. tipa cukura diabēta pacientiem, lietojot mildronātu 1 g dienā papildus pamatterapijai, novēroja neiropātisko simptomu un neiropātisko traucējumu samazinājumu (Statsenko *et.al.*, 2008).

Vairākos pētījumos ir skaidroti mildronāta neiroprotektīvās darbības mehānismi (Klusa *et.al.*, 2013; Klusa *et.al.*, 2010). Žurku eksperimentālajā Pārkinsona slimības modelī hroniska mildronāta ievadīšanas rezultātā tiek samazināti 6-hidroksidopamīna izraisītie bojājumi smadzeņu audos (Klusa *et.al.*, 2010). Jaunākie pētījumi rāda, ka mildronāta neiroprotektīvās darbības mehānismi varētu būt saistīti ar holīnērgisko un glutamāterģisko vielmaiņu ceļiem (Klusa *et.al.*, 2013), un arī ar pretiekaisuma darbību (Liepinsh *et.al.*, 2013; Rumaks *et.al.*, 2012).

Lai gan vairāki pētījumi ir veltīti mildronāta aktivitātes izpētei neiroloģisko saslimšanu gadījumā, tomēr līdz šim mildronāta efekti ir maz pētīti išēmijas radītu

smadzeņu bojājumu un neiroloģisko funkciju traucējumu gadījumā. Līdz ar to būtu nozīmīgi tālākie pētījumi un iespējamo darbības mehānismu skaidrošana.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Eksperimentālie dzīvnieki

Eksperimentiem izmantoja pieaugušus *Wistar* līnijas žurku tēviņus un mātītes ar ķermeņa sākuma masu 250–330 g un *ICR* līnijas peļu tēviņus ar ķermeņa sākuma masu 20–25 g. Žurku tēviņi un mātītes un peļu tēviņi tika nopirkti no Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas vivārijā Latvijā. Eksperimenta laikā dzīvniekus izvietoja Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas vivārijā telpās, kas atrodas Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centra (BMC) telpās Rīgā, Rātsupītes ielā 1. Pēc dzīvnieku attransportēšanas ievēroja adaptācijas periodu (vismaz 7 dienas) līdz eksperimentu sākumam un tika veikta dzīvnieku ņemšana rokās (*handling*), lai pieradinātu dzīvniekus pie eksperimentētājiem. Eksperimenta laikā žurkas un peles tika turētas standarta sprostos. Tika nodrošināti eksperimentālo dzīvnieku uzturēšanas standarta apstākļi (gaisa temperatūra 21–23°C, relatīvais gaisa mitrums $65 \pm 10\%$, 12 stundu gaismas/tumsas cikls). Barībai izmantoja standartizētu diētu no firmas LABFOR (Lactamin AB, Zviedrija), dzeramais ūdens bija pieejams bez ierobežojuma. Visas eksperimentālās procedūras ar laboratorijas dzīvniekiem tika veiktas saskaņā ar 2010. gada 22. septembrī pieņemto Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU un saskaņotas ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi (skatīt 1. pielikumu).

Izvērtējot akūtas mildronāta ievadīšanas efektus, mildronātu injicēja intraperitoneāli (*i.p.*) devās 100 un 200 mg/kg pieaugušiem *ICR* līnijas peļu tēviņiem ($n = 7-10$) un *Wistar* līnijas žurku tēviņiem ($n = 8$).

Lai izvērtētu ilgstoši samazinātas L-karnitīna koncentrācijas ietekmi uz seksuālo uzvedību, seksuāli nepieredzējušiem *Wistar* līnijas žurku tēviņiem 14 dienas perorāli (*p.o.*) ievadīja mildronātu koncentrācijā 30, 100 un 300 mg/kg ($n = 10$). Seksuālās uzvedības testā tika izmantotas nepieredzējušas *Wistar* līnijas žurku mātītes ($n = 10$).

Lai novērtētu vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas (VCAO) ilguma ietekmi uz sensori-motorajām funkcijām un atmiņas darbību, *Wistar* līnijas žurku tēviņiem tika

veikta VCAO operācija ar 90 (n = 8) vai 120 (n = 12) min. ilgu oklūziju, vai bez oklūzijas – viltus operētie (n = 21).

Lai izvērtētu L-karnitīna nozīmi insulta gadījumā, tika veikta 90 min. VCAO, pēc kuras tika ievadīts mildronāts. Pieaugušiem *Wistar* līnijas žurku tēviņiem pēc VCAO intraperitoneāli (*i.p.*) tika injicēts mildronāts devās 100 (n = 6) un 200 (n = 8) mg/kg 120 min. pēc reperfūzijas, pēc tam vienu reizi dienā 14 dienas. Kontroles un viltus operētās grupas dzīvnieki saņēma fizioloģiskā šķīduma (0,9% NaCl) injekcijas (ml/kg).

Lai izvērtētu ilgstoši samazinātas L-karnitīna koncentrācijas ietekmi uz smadzeņu audu enerģētisko vielmaiņu normoksijas un hipoksijas apstākļos, *Wistar* līnijas žurku tēviņiem 14 dienas *p.o.* ievadīja ūdeni (n = 12) vai mildronātu koncentrācijā 100 mg/kg (n = 12).

2.2. Materiāli

Izmantotās ķīmikālijas un reaģenti: nātrija hlorīds (NaCl), kālija hlorīds (KCl), nātrija hidroģēna fosfāts ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), kālija dihidroģēna fosfāts (KH_2PO_4), formaldehīds, acetons, etiķskābe, hloroforms, nātrija fluorīds (NaF), Triton X-100, kalcija hlorīds (CaCl_2), nātrija dodecilsulfāts (SDS), amonija persulfāts, L-karnitīns, magnija hlorīda heksahidrāts ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), trihloretiķskābe, saharoze, α -ketoglutarāts, oksalacetāts, Igepal CA 630 un amonija acetāts tika iepirkts no Acros Organics (Beļģija). Meldonijs (3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija) propionāta dihidrāts (tekstā lietots ražotāja izmantotais nosaukums – mildronāts)) tika saņemts no AS „Grindeks” (Latvija). Etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA), TRI reaģents, pepstatīns, leipeptīns, aprotinīns, β -estradiola 3-benzoāts, progesterons, GBB, vērša seruma albumīns (BSA), pepstatīns, aprotinīns, Folin-Ciocalteu reaģents, *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilēndiamīna dihidrohlorīds (TMPD) un Tris[hidroksimetil]aminometāns (Tris-HCl), antimicīna A, rotenons, etilēnglikola tetraetiķskābes (EGTA), nikotīnamīda adenīdinukleotīds (NAD), ATF, adenoīna difosfāts (ADF), sukcināts, 5,5'-dītio-bis-(2-nitrobenzoscābe) (DTNB), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazīnetānsulfonskābe (HEPES), pentilēntetrazols (PTZ), (+)-bikukulīns (BIK), johimbīns, NG-nitro-L-arginīns (L-NAME), tiamīna pirofosfāts, glutamāts, askorbāts un karboksitraktilozīds tika iepirkts no Sigma-Aldrich (Vācija). Etanols tika iepirkts no SIA Enola (Latvija). Fenilmetilsulfonilfluorīds, *N,N,N',N'*-tetrametiletīlēndiamīns

(TEMED), akrilamīds tika iepirkts no Fluka Chemical (Šveice). Ketamīnu iepirka no Bremer Pharma GMBH (Vācija), un ksilazīnu iepirka no Laboratorios Calier (Spānija). Acil-KoA un acil-karnitīns tika iegādāts no Larodan (Zviedrija). Fizioloģiskais šķīdums – 0,9% nātrija hlorīds (NaCl 0,9%) – tika iepirkts no Fresenius Kabi (Polija). Metanols un acetoniitrils tika pirkti no Merc (Vācija). Atropīnu iepirka no Nycomed Pharma AS (Norvēģija), penicilīns G tika iepirkts no Sandoz GmbH (Austrija), tramadolu iegādājās no Novo mesto (Slovēnija), 2,3,5-trifeniltetrazolija hlorīdu (TFT) iepirka no Alfa Aesar (Vācija), izoflurānu iepirka no ABOTT (Lielbritānija), skābekļa un slāpekļa dioksīda inhalējamās gāzes tika iepirktas no AGA (Latvija).

Paraugi tika centrifugēti ar Biofuge^{stratos} centrifūgu (Thermo Electron Corporation, ASV). Optiskais blīvums tika noteikts ar μ Quant platīšu spektrometru (BioTec, Lielbritānija). Platīšu maisīšanai izmantojām Thermo Shaker PST-60HL-4 kratītāju (Biosan, Latvija). Spermas kvalitātes noteikšanai tika izmantots Ergoval mikroskops (Carl Zeiss, Vīne).

Anestēziju nodrošināja ar inhalējamās narkozes aparātu Porter (ASV). Manipulācijām izmantoja operācijas galdu Scanbur (Dānija). Audi tika fotografēti ar digitālo spoguļkameru Sony A700 (Japāna), apstrādāti un analizēti ar programmu Image-Pro Plus 4.5. (ASV). Asinsvadus koagulēja ar koagulatoru SMT BM (Čehija). Smadzeņu griešanai izmantoja smadzeņu matricu Alto 1mm (ASV).

2.3. Metodes

2.3.1. Uzvedības testi akūto efektu novērtēšanai pēc mildronāta ievadīšanas

2.3.1.1. Mildronāta pretkrampju darbības mehānismu noskaidrošana

Lai pētītu mildronāta pretkrampju darbību, tika izmantota ķīmisko konvulsantu: pentilēn-tetrazola (PTZ) (Loscher *et.al.*, 1991; Mandhane *et.al.*, 2007) un GASS_A receptora konkurējošā inhibitora bikukulīna (BIK) (Meldrum, 1975) intravenozā (*i.v.*) ievadīšanas metode. Konvulsanti – 1% PTZ un 0,01% BIK – tika injicēti peļu astes vēnā ar konstantu ātrumu 20 μ l/2 sek. Tika reģistrēti kloniskie un toniskie krampji. Kā jutības sliekšņa rādītājs tika noteikts ķīmisko konvulsantu

(mg/kg) minimālā deva, kas nepieciešama, lai izraisītu kloniskos un toniskos krampjus.

Mildronāts tika injicēts *i.p.* devās 100 un 200 mg/kg. Darbības mehānismu noskaidrošanai eksperimentā tika izmantots α_2 -adrenoreceptoru antagonists johimbīns un NO sintāzes inhibitors NG-nitro-L-arginīns (L-NAME). Johimbīnu injicēja 2 mg/kg *i.p.* 30 min. pirms mildronāta vai fizioloģiskā šķīduma. L-NAME 10 mg/kg tika injicēts 5 min. pirms mildronāta vai fizioloģiskā šķīduma. Eksperimentu veica 30 min. pēc mildronāta vai fizioloģiskā šķīduma injekcijas.

2.3.1.2. Hipnotiskās darbības tests

Mildronāta ietekme uz hipnotisko stāvokli tika noteikta etanola hipnotiskās darbības testā. Hipnotiskās darbības ilgumu noteica pēc „sānu guļas” no brīža, kad dzīvniekam konstatēja „pārvelšanās” refleksa zudumu (PRZ) pēc etanola injekcijas, līdz brīdim, kad reflekss atjaunojās. Hipnotiskās darbības izraisīšanai etanols tika injicēts *i.p.* devā 3,5 g/kg.

Mildronāts tika injicēts *i.p.* devās 50, 100 un 200 mg/kg 30 min. pirms etanola injekcijas. Darbības mehānismu noskaidrošanai eksperimentā tika izmantots α_2 -adrenoreceptoru antagonists johimbīns un NO sintāzes inhibitors L-NAME. Johimbīnu devā 1 mg/kg ievadīja *i.p.* 30 min. pirms mildronāta vai fizioloģiskā šķīduma. L-NAME 10 mg/kg tika ievadīts 5 min. pirms mildronāta vai fizioloģiskā šķīduma.

2.3.1.3. Smadzeņu garozas asins plūsmas mērījumi žurkām

Eksperimentam tika izmantoti pieauguši, 310 ± 20 g smagi *Wistar* līnijas žurku tēviņi. Žurkas tika anestezētas *i.p.*, ievadot anestēzijas maisījumu, kas sastāvēja no ketamīna (100 mg/kg) un ksilazīna (10 mg/kg). Anestēzijas dziļums tika regulāri kontrolēts, pārbaudot acs un ķepas refleksus. Ķermeņa temperatūra tika uzturēta nemainīga – $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, mērot ar termometru (HSE, Harvard Apparatus, Vācija) visu operācijas laiku. Dzīvnieka galva tika ievietota stereotakses aparātā (Steolting, ASV), pa skalpa viduslīniju tika veikts iegriezums, tika atsegts galvaskauss, atbīdot ādu. Smadzeņu asins plūsmas mērījumiem tika izveidots caurums kreisajā pieres kaula daļā. Šis caurums atradās 5 mm uz sāniem un 2 mm uz mugurpusi no Bregmas. Smadzeņu garozas asins plūsma tika reģistrēta ar lāzera Doplera plūsmas mērītāju (Model: OxyFlo 2000, Oksforda Optronix, Lielbritānija) caur izurbto caurumu

galvaskausā (Takada *et.al.*, 2001). Asins plūsmas vērtība tika izteikta procentuāli no kontroles līmeņa.

Mildronāts tika injicēts *i.p.* devā 200 mg/kg 10 min. pirms anestēzijas. Etanols tika injicēts *i.p.* 600 mg/kg (30%, 2 ml/kg) 30 min. pirms mildronāta vai fizioloģiskā šķīduma injekcijām.

2.3.1.4. Asins plūsmas un skābekļa daudzuma izmaiņas žurku smadzenēs pēc īslaicīgas *a.carotis communis* oklūzijas

Žurkas tika anestezētas kā iepriekš aprakstīts. Ķermeņa temperatūra tika uzturēta nemainīga $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, mērot ar termometru (HSE, Harvard Apparatus, Vācija) visu operācijas laiku, oklūzijas un 30 min. reperfūzijas laikā.

Kreisā *a.carotis communis* (CCA) tika rūpīgi izolēta un atdalīta no *n.vagus*, tādējādi padarot CCA viegli pieejamu.

Smadzeņu asins plūsma tika mērīta ar lāzera Doplera plūsmas zondi (zondes gala diametrs 1 mm), kas tika piestiprināta pie plūsmas mērītāja (Oxford Optronix, Lielbritānija) un ievietota 1 mm diametra apļveida caurumā galvaskausā (5 mm uz sāniem un 2 mm uz mugurpusi no Bregmas). Skābekļa piesātinājums tika mērīts caur kreisā sāna ventrikulu (0,9 mm uz aizmuguri un 1,3 mm sānis no Bregmas un 3,5–4,0 mm dziļumā no galvaskausa virsmas), izmantojot skābekļa zondi (zondes gala diametrs 280 μm). Datu reģistrēšanai izmantoja oksigēnācijas monitoru (OxylabpO2, Oksforda Optronix, Lielbritānija). Kreisā CCA tika nosieta ar diegu, pēc 5 min. diegu atsēja un veica reperfūziju. Asins plūsma un skābekļa piesātinājums tika mērīts pirms oklūzijas, oklūzijas laikā un 30 min. pēc reperfūzijas.

Mildronāts tika injicēts *i.p.* 10 min. pirms oklūzijas devās 100 un 200 mg/kg.

2.3.1.5. Kustību aktivitātes tests

Kustību aktivitātes noteikšanai izmantoja melnu astoņstūru arēnu (36 cm diametrā), kuras pamats sadalīts ar baltu līniju astoņās trīsstūra formās. Arēnas sienās bija sešpadsmit caurumi, katra cauruma diametrs 2 cm. Peles tika saudzīgi novietotas arēnas centrā, un tika reģistrēta horizontālā (pele pārgājusi pāri horizontālajai līnijai ar visām četrām ķepām), vertikālā (pacelšanās uz divām ķepām) un izpētes (pele purnu iebāž sienā izvietotajos caurumos) aktivitāte. Testēšana notika četrās secīgās 4 min. sesijās, kas uzsāktas 30, 60 un 120 min. pēc *i.p.* mildronāta ievadīšanas devās 30, 100 un 300 mg/kg.

2.3.4. Seksuālās uzvedības novērošana

Eksperimentā izmantotie dzīvnieki tika izvietoti nodalītās vivārijā telpās, tēviņi un mātītes atsevišķi, lai tie savstarpēji nesatiktos pirms eksperimenta sākuma. Papildus tam dzīvnieku adaptācijas periodā (7 dienas) tie tika pieradināti pie nobīdītā gaismas-tumsas režīma vivārijā (gaisma no 02:00 līdz 14:00). Tas tika darīts, lai testa eksperimentālās daļas uzsākšanas laikā žurku tēviņiem būtu salīdzinoši lielāka aktivitāte (Agmo, 1997). Katrā testa dienā pārbaude tika veikta līdzīgam žurku tēviņu skaitam no visām pētījuma grupām.

Seksuālās uzvedības tests tika izpildīts dienas/nakts cikla (15:00–20:00) tumšajā fāzē, sarkanā apgaismojumā, izmantojot iepriekš seksuāli nepieredzējušas žurkas. Katru žurku ievietoja atsevišķā caurspīdīgā novērošanas būrītī (36 x 24 x 33 cm) 30 min. adaptācijas periodam. Pēc adaptācijas perioda pie tēviņiem tika ievietotas mātītes un tika novērotas un reģistrētas šādas tēviņu darbības.

Uzkāpšana uz mātītes (7.A attēls), kas parasti tika veikta no aizmugures, izdarot strauju iegurņa grūdienu. Nepieredzējuši tēviņi un dažreiz arī pieredzējuši tēviņi var uzkāpt mātītei nekorekti – uz galvas, no sāna. Šāda veida uzkāpšana netika reģistrēta.

Intromisija jeb vaginālā iedziļināšanās (7.B attēls), kas sākas ar uzkāpšanu, tad tēviņš izdara dziļu grūdienu uz priekšu un neizdara iegurņa grūdienu. Viņš enerģiski atkāpjas un vienmēr aplaiza savu dzimumlocekli. Pēc intromisijas tēviņš nekad uzreiz neuzkāpj atkal (7.C attēls).

Ejakulācija (7.D attēls), kas sākas ar intromisiju, bet pēc vaginālās iedziļināšanās (dziļš grūdiens uz priekšu) tēviņš paliek uz mātītes 1–3 sek. Tēviņš lēni paceļas kājās, un priekškājas ir paceltas augšā un atvērtas. Tēviņš aplaiza savu dzimumlocekli un tā apkārtni un kļūst neaktīvs 4–7 min. Pēc ejakulācijas mātīte dodas prom no tēviņa (Agmo, 1997).



7. attēls. Žurku seksuālās uzvedības izvērtēšanas parametri: A - uzkāpšana, B – intromisija, C – pēc intromisijas, D - ejakulācija.

Žurku seksuālās aktivitātes tests tika pārtraukts, ja konstatēja kādu no šiem kritērijiem:

- nav intromisijas vai uzkāpšanas 30 minūšu laikā pēc mātītes ievietošanas būrī,
- žurkas nav seksuāli aktīvas 30 minūtes pēc pēdējās ejakulācijas,
- nav notikusi ejakulācija 60 minūšu laikā pēc kopošanās cikla sākuma.

Žurku tēviņu seksuālās uzvedības testā reģistrēja un aprēķināja šādus aktivitātes rādītājus:

- ❖ latentais periods līdz pirmajai uzkāpšanai (ML),
- ❖ latentais periods līdz pirmajai intromisijai (IL),
- ❖ pārošanās cikla vidējais ilgums (EL),
- ❖ uzkāpšanu skaits cikla laikā (MF),
- ❖ intromisiju skaits cikla laikā (IF),
- ❖ latentais periods starp pēdējo ejakulāciju un nākamo pirmo intromisiju (PEI),
- ❖ pārošanās efektivitāte (intromisiju skaits ciklu laikā/(intromisiju skaits+uzkāpšanu skaits)) (CE),

❖ starpintromisiju intervāls (pārošanās cikla vidējais ilgums/intromisiju skaits cikla laikā) (III).

Pēc šo parametru novērtēšanas eksperimentālās grupas žurku seksuālo aktivitāti salīdzināja ar kontroles grupas dzīvniekiem un tika izdarīti secinājumi par vielas ietekmi uz seksuālās uzvedības aktivitāti (Ottani *et.al.*, 2002).

Žurku mātītes tika sagatavotas pirms seksuālās uzvedības testa. Žurku mātītēm 48 stundas pirms eksperimenta subkutāni (*s.c.*) injicēja estradiola benzoātu (12 µg/žurku/0,1 ml), kas nodrošina mātīšu gatavību seksuālai aktivitātei, atrodoties estrus-fāzē, un 4,5 stundas pirms eksperimenta – progesteronu (500 µg/žurku/0,1 ml), kas palīdz novērst grūtniecības iestāšanos. Seksuālās uzvedības tests tika veikts 24 stundas pēc pēdējās ievadīšanas, pēcpusdienā ap plkst.15:00.

Katrā eksperimentālajā grupā tika iekļauti 10 tēviņi un 10 mātītes, jo iepriekšējos eksperimentos iegūtie rezultāti liecināja, ka mazākas dzīvnieku grupas gadījumā nav iespējams korekti izvērtēt vielas efektu, sasniedzot ticamus rezultātus vērtējamajos parametros.

2.3.5. Spermas kvalitātes novērtēšanas analīze un reproduktīvo orgānu svars

Spermas kustīgumu novērtēja kontroles un mildronāta (100 mg/kg) žurku tēviņu grupām. Pēc seksuālās uzvedības testa žurku tēviņi tika dekapitēti un veiktas turpmāk aprakstītās procedūras. Spermas paraugs tika ņemts no viena sēklinieka piedēkļa (*cauda epididymis*). Piedēkļa saturs tika izspiests uz priekšmeta stikliņa un atšķaidīts pēc nepieciešamības ar fizioloģisko šķīdumu (0,9% NaCl), pēc tam tas tika samaisīts, līdz tika iegūts viendabīgs maisījums. Iegūto preparātu pārvietoja uz iepriekš sildītas hemocitometra (Gorjajeva) kameras 20–25°C un noteica aglutināciju un spermas blīvumu, skaitot spermatozoīdus 25 kameras laukumos gaismas *Ergoval* mikroskopā pie palielinājuma 10x16. Tāpat tika arī saskaitīti:

- kustīgie spermatozoīdi ar salīdzinoši lielu pārvietošanās ātrumu;
- vibrējošie spermatozoīdi, kuri kustas uz vietas bez pārvietošanās;
- nekustīgie spermatozoīdi;
- aglutinācija – kustīgo spermatozoīdu salīpināšanās savā starpā ar galviņām, astēm vai abām (WHO, 1999).

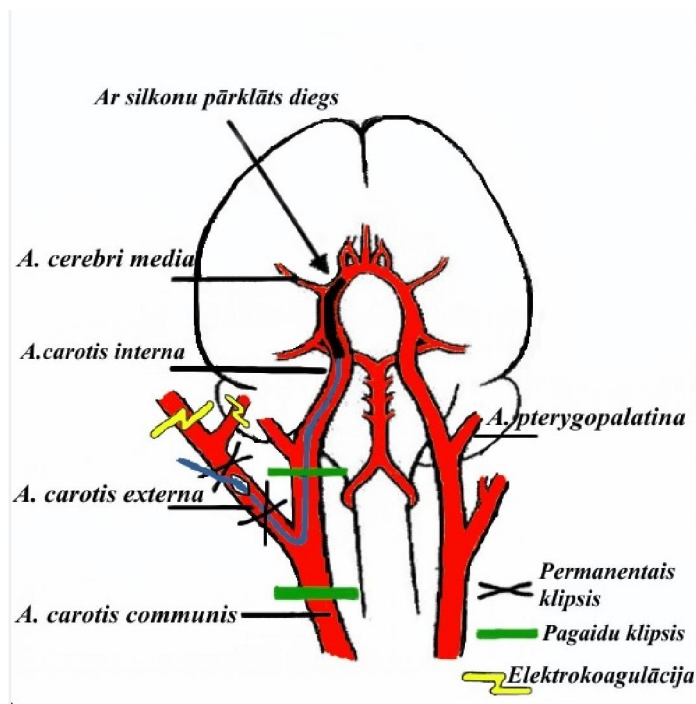
Rezultāti tika izteikti procentuāli no summārā spermatozoīdu skaita.

Reproduktīvo orgānu svaru noteica kontroles un mildronāta (100 mg/kg) žurku tēviņu grupām pēc seksuālās uzvedības testa. Orgāni tika attīrīti no liekiem audiem. Pēc tam tos mazgāja fizioloģiskajā šķīdumā (0,9% NaCl) un nosvēra. Orgānu svars tika izteikts relatīvi – vidējais pāru orgānu svars pret 100 g žurkas ķermeņa svara (g/100g).

2.3.6. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzija

Žurkas operācijas sākumā saņēma 5% inhalējamo izoflurāna ievadnarkozi (maisījumā ar NO₂:O₂; 50:50), anestēzijas uzturēšanai izmantoja 2–3% izoflurāna narkozi. Pirms operācijas uzsākšanas tika veikta narkozes dziļuma kontrole, pārbaudot astes un acs refleksus. Pirms operācijas visiem dzīvniekiem *s.c.* tika injicēts tramadola šķīdums 5 mg/kg atsāpināšanai, penicilīna šķīdums 150 mg/kg, lai pasargātu dzīvniekus no infekcijas riska, un atropīna šķīdums 0,05 mg/kg, lai samazinātu sekrēciju.

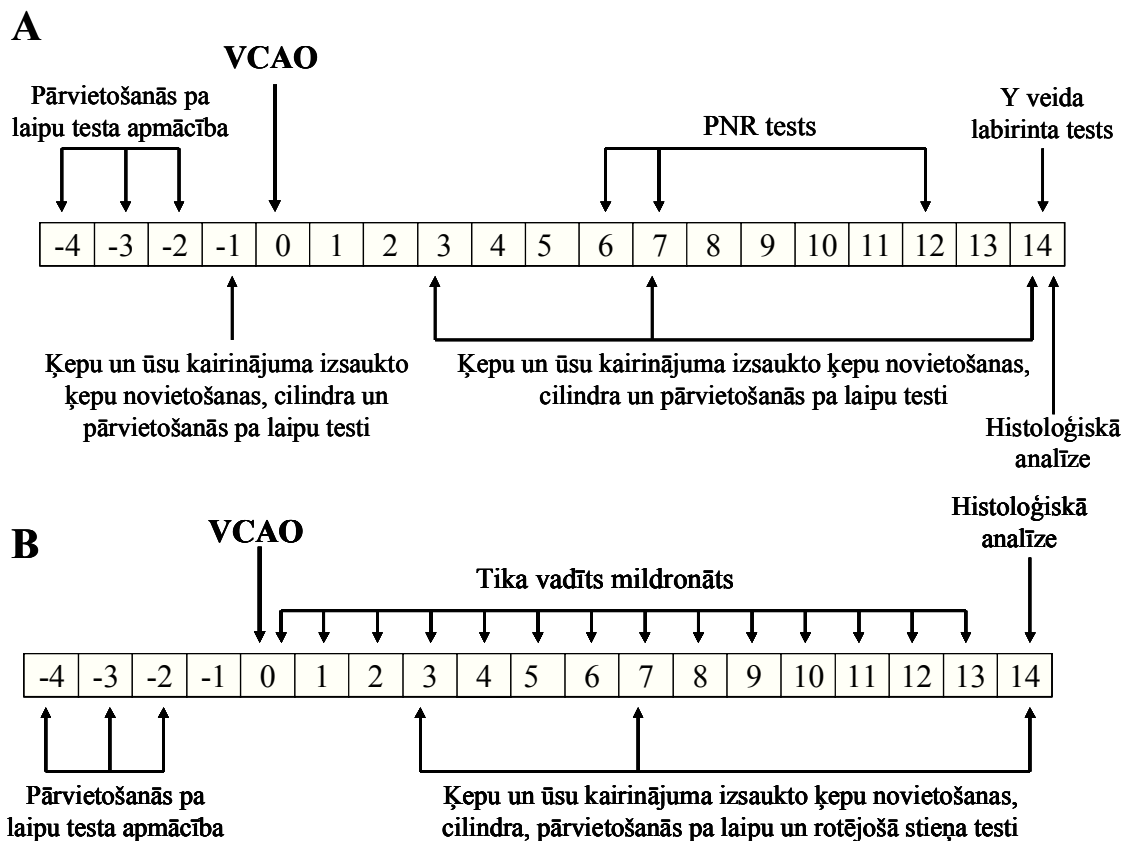
Išēmiskā insulta izraisīšanai smadzeņu audos tika izdarīta pārejošā vidējās cerebrālās artērijas (90 vai 120 min.) oklūzija, ievietojot artērijā nosprostojošo diegu (Jolkkonen *et.al.*, 2003; Longa *et.al.*, 1989). Nosprostojošā diega gals bija pārklāts ar 5 mm garu silikona kārtu, kā aprakstīts Sprata pētījumā (Spratt *et.al.*, 2006). Žurkai operācijas vietu noskuva un dezinficēja ar 96% etilspirtu. Veica garenisku griezumu kakla rajona priekšpusē, atbrīvojot *a.carotis communis* no muskuļaudiem, fascijām un nerviem. Nosēja *a.carotis externa* un *a.pterygopalatine*, pēc tam secēja un koagulēja *a.superior thyroidea* un *a.ascending pharyngeale*. Uz *a.carotis communis* un *a.coarotis interna* uzlika pagaidu klipsi un caur 1 mm lielu griezumu *a.carotis externa* ar nosprostojošo diegu palīdzību bloķēja *a.carotis interna* un *a.middle cerebrale*, ievadot to 19 mm dziļi (skat. 8. attēlu.). Diegu pēc 90 vai 120 min. izvilka ārā un griezuma vietu kakla priekšpusē aizšuva. Pēc operācijas katra žurka saņēma 3 ml 0,9% NaCl injekciju *s.c.*



8. attēls. Vidējās cerebrālās artērijas (VCA) oklūzijas modelis žurkā.

2.3.7. Uzvedības testi pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas

Eksperimentētāji, kuri veica operācijas, dzīvnieku uzvedības testus un analizēja smadzeņu griezumus, nebija informēti par izmēģinājuma dzīvnieku sadalījumu pa grupām līdz individuālo dzīvnieku datu analīzes pilnīgai pabeigšanai. Dzīvnieki uzvedības testos tika apmācīti pirms operācijas. VCA oklūzijas ilguma ietekme uz žurku sensori-motoro funkciju tika pārbaudīta 3., 7. un 14. dienā pēc operācijas. Atmiņas testi tika veikti 6., 7., 12. un 14. dienā pēc operācijas (9.A attēls). Mildronāta ietekmes novērtēšanai uz VCAO izraisītiem bojājumiem dzīvnieki uzvedības testos tika apmācīti pirms operācijas. Sensori-motoro funkciju testi tika veikti 3., 7. un 14. dienā pēc VCAO, diennakts cikla gaišajā daļā (9.B attēls). Metodes, kas tika izmantotas uzvedības testu veikšanai, ir aprakstītas zemāk.



9. attēls. VCAO eksperimentu dizaini. (A) VCA oklūzijas 90 un 120 min. ietekme uz žurku sensori-motora un atmiņas funkciju. (B) Mildronāta ietekme uz VCAO izraisītiem bojājumiem. Mildronāts injicēts devās 100 un 200 mg/kg *i.p.* 120 min. pēc reperfūzijas, terapija tika turpināta 14 dienas.

2.3.7.1. Ķepu novietošanas tests

Ķepu novietošanas testu izmantoja, lai noteiktu pakalējo ķepu un priekšķepu taktilo un proprioceptīvo stimulu izmaiņas pēc operācijas, tādējādi secinot par sekmīgu VCAO. Tests sastāv no septiņiem ķepas novietošanas uzdevumiem ar novērtējuma skalu no 0 līdz 2, attiecīgi: 2 – žurka pareizi izpilda uzdevumu; 1 – žurka uzdevumu izpilda ar 2 un vairāk sekunžu nokavēšanos; 0 – žurka uzdevumu neveic vai arī izpilda nepareizi. Kopējais punktu skaits viltus operētajām žurkām bija 14 balles (Jolkkonen *et.al.*, 2000; Puurunen *et.al.*, 2001). Pirms testa veikšanas žurkas tika pieradinātas pie eksperimenta veicēja. Eksperimenta laikā žurkām tika pārbaudītas ķepas abās ķermeņa pusēs. Pirmajā uzdevumā žurka tika novietota uz galda virsmas un tās priekšķepa maigi atvilka atpakaļ, un novērota ķepas novietošana sākotnējā stāvoklī, otrajā uzdevumā tas pats tika veikts ar pakalķepu. Veicot trešo

uzdevumu, žurka tika novietota uz galda malas tā, lai abas pakalķepas atrodas uz galda virsmas, bet ķermenis pacelts 45° leņķī virs galda, ķepa tika maigi novilkta nost no galda virsmas, un novērtēta ķepas novietošana atpakaļ uz virsmas. Tāpat tika darīts ar priekšķepām (ceturtais uzdevums). Piektajā uzdevumā žurka tika novietota uz galda virsmas un uzmanīgi stumta uz priekšu, tādējādi pārbaudot priekšķepu pretestību. Sestajā uzdevumā dzīvnieks tika novietots uz galda virsmas un viņam viegli tika uzspiests krūšu rajonā, pēc tam priekšķepu atvilka uz mugurpusi, un tika novērota ķepas novietošana sākotnējā pozā. Veicot septīto uzdevumu, žurku pacēla 10 cm augstumā virs galda virsmas un novēroja priekšķepu novietojumu pret virsmu.

2.3.7.2. Ūsu kairinājuma izsauktais ķepu novietošanas tests

Ūsu kairinājuma izsaukto ķepu novietošanas testu izmantoja sensori-motora traucējumu noteikšanai (Lindner *et.al.*, 2003). Šo testu žurkām veica pirms un nākamajā dienā pēc operācijas. Veicot testu, dzīvnieka galva tika pietuvināta galda malai, lai tikai vienas puses ūsas pieskartos malai, tādējādi kairinot tās. Vesels dzīvnieks nekavējoties priekšķepu novietoja uz galda virsmas (atbildes reakcija), turpretim atkarībā no infarkta lieluma un lokalizācijas atbildes reakcija nenotika vai bija traucēta (Woodlee *et.al.*, 2008). Kļūdu skaits tika reģistrēts 10 mēģinājumos.

2.3.7.3. Cilindra tests

Cilindra tests tika izmantots, lai novērtētu žurku motorās darbības traucējumus priekšķepām (Schallert un Woodlee, 2005). Testā tika izmantots 26 cm augsts organiskā stikla cilindrs, kura diametrs bija 20 cm (10. attēls). Uzvedība tika reģistrēta ar videokameras palīdzību. Lai sekotu līdzi kustībām, kad dzīvnieks neatradās kameras pusē, aiz cilindra tika novietots spogulis. Žurku ievietojot cilindrā, tika reģistrēts priekšķepu soļu skaits (ar labo, ar kreiso vai ar abām ķepām), atspiežoties pret cilindra vertikālajām sienām, t.i., žurkai paceļoties uz pakalķepām. Eksperiments tika veikts pirms operācijas, kā arī 3., 7. un 14. dienā pēc operācijas. Pēc 20 soļu veikšanas žurka tika izņemta no cilindra; maksimālais laiks, ko dzīvnieks pavadīja cilindrā, bija 5 minūtes. Pēc eksperimenta video materiāls tika analizēts un rezultātus aprēķināja pēc formulas: asimetrijas % = (kreisās priekšķepas soļi + 1/2 bilaterālo soļu) / (kopējais soļu skaits) × 100% (Makinen *et.al.*, 2006).



10. attēls. Cilindrs tests, kas tika izmantots, lai novērtētu žurku priekšējo ķepu izmantošanu.

2.3.7.4. Pārvietošanās pa laipu tests

Testu pārvietošanās pa laipu (*beam-walking*) izmantojām, lai novērtētu žurku priekšējo un pakaļējo ķepu sensori-motoros traucējumus (Schallert and Woodlee, 2005; van Groen *et al.*, 2005). Eksperimentam tika izmantota 1,5 m gara, šaura, dubulta konusveidīga laipa, kuras galā izvietota melna kaste (20.5x25x25 cm), kā redzams 11. attēlā. Uzvedība tika reģistrēta ar videokameras palīdzību.



11. attēls. Pārvietošanās pa laipu tests tika izmantots, lai novērtētu žurku priekšējo un pakaļējo ķepu sensori-motoros traucējumus.

Uzsākot eksperimentu, dzīvnieks tika ievietots melnajā kastē, kurā tika adaptēts eksperimentam aptuveni 5 minūtes, pēc tam sekoja dzīvnieka novietošana laipas galā, un tas sāka pārvietoties pa laipu virzienā uz melno kasti. Pareizi veikts

solis tika reģistrēts tad, ja dzīvnieks novietoja ķepu tieši uz laipas paaugstinājuma, savukārt ja dzīvnieks ķepu novietoja uz laipas pazeminājuma, tas tika uzskatīts par nepareizi veiktu soli. Pirms VCAO operācijas dzīvnieki tika trenēti pārvietoties pa laipu. Pēc tam, analizējot video ierakstus, gan priekšķepām, gan pakalķepām tika skaitīti kļūdainie soļi, rezultātu aprēķinot kā procentus no kopējo soļu skaita (kļūdu skaits/kopējais soļu skaits). Eksperiments ar katru dzīvnieku tika atkārtots trīs reizes.

2.3.7.5. Rotējošā stieņa tests

Rotējošā stieņa tests (*rota-rod*) tika izmantots, lai novērtētu žurku kustību koordināciju. Pirms VCAO operācijas un hroniska etanola lietošanas eksperimentiem žurkas tika apmācītas uz rotējošā stieņa aparāta (Accelerating Rota road for rats mod. 7750 Ugo Basile, Itālija) trīs dienas, trīs reizes dienā, katru reizi trenējot 5 min. Apmācību sākumā katrs dzīvnieks tika trenēts noturēties uz rotējošā stieņa ar griešanās ātrumu 4 apgr./min. Kad žurka spēja noturēties un veikt uzdevumu uz rotējošā stieņa, tā tika apmācīta veikt uzdevumu ar paātrinājumu, kas sasniedza 35 apgr./min. Dzīvnieki, kas nespēja noturēties uz rotējošā stieņa pēdējā reizē vismaz 230 sekundes, tika izslēgti no eksperimenta.

Eksperimenta dienā žurkas novietoja uz rotējošā stieņa un reģistrēja laiku, cik ilgi viņas spēj noturēties uz rotējošā stieņa. Maksimālais laiks, ko skatījās, bija 300 sek., pirmās 100 sek. testu veica ar ātrumu 4 apgr./min., pēc tam tika ieslēgts paātrinājums, kas eksperimenta beigās sasniedza 35 apgr./min.

2.3.7.6. Pasīvā nosacījuma refleksa (PNR) tests

Pasīvā nosacījuma refleksa (PNR) testu izmantoja, lai novērtētu savienojumu ietekmi uz kontekstuālo atmiņu žurkām pēc insulta. Testa veikšanai izmantoja aparātu Passive avoidance Controller, modelis A775 (Ugo Basile, Itālija).

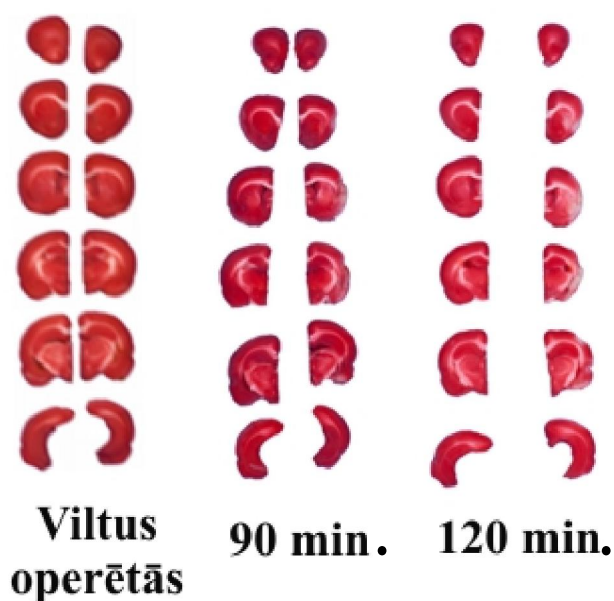
Pirmajā dienā žurka saņēma 0,5 mA/3 sek. stipru strāvu. Tika reģistrēts laiks, kad dzīvnieks no gaišās kameras iegāja tumšajā kamerā. Pēc 24 stundām pārbaudīja, vai dzīvnieks atceras (kontekstuālo atmiņu): dzīvnieku ievietoja kameras gaišajā pusē un reģistrēja, pēc cik ilga laika dzīvnieks iegāja tumšajā kameras pusē. Dzīvnieku novēroja 600 sek. Eksperiments tika veikts trīs dienās – 6. dienā pēc VCAO operācijas žurka saņēma strāvas šoku, pēc 24 stundām pārbaudīja viņas atbildes laiku, nosakot īslaicīgo atmiņu, savukārt lai noteiktu ilglaicīgo atmiņu, tests tika atkārtots pēc piecām dienām.

2.3.7.7. Darbības atmiņas novērtēšanas tests

Y veida labirinta tests tika izmantots, lai pēc insulta novērtētu darbības atmiņu žurkām (Nieradko-Iwanicka un Borzecki, 2008; Yamada *et.al.*, 1999). Tests tiek veikts, izmantojot melnu, krāsotu koka Y formas telpisku un simetriski izveidotu labirintu ar trim ejām (ejas garums: 40 cm, platums: 11 cm, augstums: 28 cm). Žurku ievietoja vienā no labirinta ejas sākuma daļām un novēroja 5 min., reģistrējot eja ieiešanas skaitu un secību. Pareizi izvēlēta ejas maiņa tika definēta un aprēķināta procentuāli kā secīga ieiešana visās trīs ejās bez atkārtotām: $(\text{pareizi izvēlētais eju skaits})/(\text{kopējais ieiešanas skaits ejās} - 2) * 100\%$.

2.3.8. Insulta bojājumu histoloģiskais novērtējums un izmēra noteikšana

14. dienā pēc operācijas tika veikta dekapitācija un uzmanīgi izņemtas smadzenes. Pēc tam smadzenes tika noskalotas PBS buferšķīdumā (136 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1,75 mM KH₂PO₄), nosusinātas un ievietotas 15 min. –18°C. Smadzenes sasalstot ieguva stingru un noturīgu formu, kas ir nozīmīga smadzeņu griešanas procesā. Smadzenes, ievietojot matricā, tika grieztas horizontālajā plaknē 2 mm biezumā, pēc tam audi tika ievietoti 2% trifeniltetrazolija hlorīda (TFT) šķīdumā un atstāti 20 min. inkubatorā (+37°C). TFT nokrāsoja dzīvos audus sarkanus, bet nekrotiskie audi palika balti. Nokrāsotos smadzeņu audus fiksēja 4% formaldehīda šķīdumā 24 st. Pēc tam smadzeņu griezumi tika fotografēti ar digitālo spoguļkameru Sony A700 un iegūtos attēlus analizēja ar attēlu apstrādes programmu Image-Pro Plus 4.5.1. Fotografējot smadzeņu audus, tos sakārtoja secībā, sākot ar smadzeņu priekšējās daivas griezumiem un beidzot ar pakauša daivu (12. attēls). Pēc attēlu apstrādes aprēķināja veselo audu daudzumu infarkta puslodē (ipsilaterālajā), salīdzinot ar veselo audu daudzumu kontralaterālajā puslodē, kā redzams 12. attēlā.



12. attēls. Smadzeņu audu griezumi viltus operētajā grupā un insulta grupās pēc 90 un 120 min. oklūzijas.

2.3.9. Karnitīna, γ -butirobetaīna un mildronāta daudzuma analīze

Asinis tika savāktas EDTA (etilēndiamīntetraetiķskābes dinātrijs sāls) saturošos stobriņos, centrifugētas 10 min. 3000 apgr./min. +4°C, iegūtā plazma tika sasaldēta un uzglabāta (-80°C) līdz turpmākām analīzēm. Sēklinieki tika izgriezti un homogenizēti aukstā destilētā ūdenī tilpuma attiecībā 1:5 ar *Teflona/stikla* homogenizētāju 1500 rpm. Iegūtais homogenāts tika centrifugēts 14000 g 10 min. +4°C. Virsnogulšņu šķīdums tika noņemts, bet nogulsnes homogenizētas aukstā ūdenī tādā pašā attiecībā kā iepriekš. Homogenātu centrifugēja 14000 g 10 min. +4°C. Virsnogulšņu šķīdumu apvienoja un uzglabāja -80°C saldētavā līdz tālākām analīzēm.

Smadzenīšu audi tika izņemti un homogenizēti aukstā destilētā Milli-Q ūdenī tilpuma attiecībā 1:5, izmantojot Cole Parmer 130-Watt ultraskaņas homogenizatoru 35 sek. pie 35 kHz. Iegūtais homogenāts tika centrifugēts 16500 apgr./min. 10 min. +4°C. Virsnogulšņu šķīdums tika noņemts, bet nogulsnes homogenizētas aukstā ūdenī tādā pašā attiecībā kā iepriekš. Homogenātu centrifugēja 16500 apgr./min. 10 min. +4°C. Virsnogulšņu šķīdumu apvienoja un uzglabāja -80°C saldētavā līdz analīzēm.

L-karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācijas noteikšanai asins plazmā, sēklinieku un smadzenīšu audu ekstraktos tika izmantota īpaši augstas efektivitātes

hromatogrāfijas sajūgta tandēmā ar masspektrometriju UPLC/MS/MS metode, kā iekšējo standartu kalibrācijai izmantoja 3-(2,2-dimeil-2-prop-1-il-hidrazīnija)propionātu. 50-200 µl ekstrakta vai plazmas tika samaisīti ar 1 ml iekšējās standartvielas šķīduma acetonitrila-metanola šķīdumā (3:1, tilpums/tilpums). Iegūtais šķīdums tika samaisīts un centrifugēts 20 min. 10000 apgr./min., lai atbrīvotos no iespējamām proteīnu nogulsniem. Supernatantu pārnesa UPLC flakonos, kurus pēc tam ievietoja UPLC/MS/MS paraugu turētājā. 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 acetāta šķīdumu (pH 4), plūsma: 0,2 ml/min. MS/MS analīzes tika veiktas, izmantojot Micromass Quattro MicroTM tandēmā ar masspektrometru, izmantojot pozitīvas uzlādēšanas elektroizsmidzināšanas jonizāciju ar izvēlētu jonu pāreju reģistrāciju m/z 162,4→m/z 103,0 karnitīnam, m/z 146,3→m/z 87,9 GBB; m/z 147,3 → m/z 58,4 mildronātam un m/z iekšējam standartam. MassLynx 4.1. programmatūra komplektā ar QuanLynx 4.1. moduli (Waters) tika izmantota datu iegūšanai un apstrādei.

Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana tika veikta sadarbībā ar *Dr. chem.* O. Pugoviču un *Dr. chem.* S. Grīnbergu (Latvijas Organiskās sintēzes institūts).

2.3.10. Acil-karnitīna profila un acil-KoA daudzuma noteikšana smadzeņu audos

Smadzeņu audu ekstrakti tika sagatavoti pēc Blachnio-Zabielska aprakstītās metodes (Blachnio-Zabielska *et.al.*, 2011) ar nelielām izmaiņām. Īsumā, 200 mg smadzeņu audu tika pievienoti 0,25 ml svaigi pagatavota kālija dihidrogēnfosfāta (KH₂PO₄, 100 mM, pH 4,9) un 0,25 ml acetonitrila/2-propanols/metanols 3:1:1 (tilpums/tilpums/tilpums). Paraugi tika sonificēti 30 sek. un pēc tam centrifugēti 16000 g 10 min. Supernatantu notvaicēja un liofilizēja. Liofilizētais paraugs tika resuspendēts 0,2 ml acetonitrila ūdens šķīdumā 3:2 (tilpums/tilpums), samaisīts un centrifugēts 13000 g 10 min. Iegūtais supernatants tika izmantots UPLC/MS/MS analīzēm. Acil-karnitīnu un acil-KoA koncentrācijas tika mērītas, izmantojot palmitoil-karnitīna un palmitoil-KoA septiņpunktu kalibrēšanas līknes koncentrāciju intervālā no 10 ng/ml līdz 1000 ng/ml.

Acil-karnitīnu un acil-KoA saturu smadzeņu audu paraugos noteica vienlaicīgi vienā UPLC/MS/MS analīzē. Palmitoil-karnitīns un palmitoil-KoA tika izmantoti kā

kalibrēšanas standarti acil-karnitīnu un acil-KoA kvantitatīvajai analīzei. Analīzes tika veiktas, izmantojot Micromass Quatro MicroTM tandēma masspektrometru kopā ar Waters Acquity UPLC hromatogrāfijas sistēmu. Hromatogrāfiskai atdalīšanai tika izmantota Acquity BEH C18 kolonna (2.1x50 mm, 1.7 μm), gradienta režīmā no 10% B līdz 98% B (mobilā fāze A – amonija bikarbonāts 2mM (pH 10,5), B – acetnitrils), plūsmas ātrums 0,3 ml/min. un injekcijas tilpums 5 μl. Masspektrometrs tika darbināts pozitīvās elektroizsmidzināšanas jonizācijas režīmā, jonu avota temperatūra 120°C un kapilāra spriegums 3,3 kV. Konusa spriegums un sadursmju enerģija tika individuāli noregulēta palmitoil-karnitīnam (35 V un 27eV) un palmitoil-KoA (45V un 33eV). Kvantificēšanu veica, integrējot multi reakciju monitoringa (MRM) hromatogrammas palmitoil-karnitīnam (m/z 400,6 >> 85,1) un palmitoil-KoA (m/z 1006,3 >> 499,4). Pieņemot, ka palmitoil-karnitīna un palmitoil-KoA analītiskais signāls (atkarībā no vielu molārās koncentrācijas) ir identisks attiecīgi acilkarnitīniem un acil-KoA esteriem. Literatūrā pieejamās MRM pārejas acilkarnitīniem un acil-koenzīmiem (Ghoshal *et.al.*, 2005;Haynes *et.al.*, 2008) tika izmantotas to puskvantitatīvajai noteikšanai.

Acil-karnitīnu un acil-KoA daudzuma noteikšana tika veikta sadarbībā ar *Dr. chem.* O. Pugoviču, *Dr. chem.* S. Grīnbergu un *MSc.* E. Sevostjanovu (Latvijas Organiskās sintēzes institūts).

2.3.11. Bioķīmisko parametru mērījumi

2.3.11.1. Testosterona koncentrācijas noteikšana

Pēc seksuālās uzvedības testa no žurku tēviņiem tika savāktas asinis EDTA saturošos stobriņos. Asinis tika centrifugētas 10 min. 3000 apgr./min. +4°C, un iegūtajā plazmā tika mērīta brīvā testosterona koncentrācija, izmantojot *Cayman Chemical Company* firmas reaktīvo komplektu Testosterone EIA Kit, ievērojot ražotāja instrukcijas.

2.3.11.2. Imunoblota (Western blot) analīze

Žurku sēklinieki tika homogenizēti 10 mM Tris-HCl buferšķīdumā pH 7,4 (1 mM EDTA, 0.25 M saharoze, 25 mM NaF un proteāžu inhibitori: 10 μM leupeptīns, 1 μM pepstatīns, 1 μM aprotinīns un 50 μM fenilmetilsulfonilfluorīds) tilpuma attiecībā 1:5 +4°C temperatūrā ar *teflona/stikla* homogenizētāju. Homogenāts

tika centrifugēts 10 min. pie 1000 g +4°C. Iegūtais virsnogulšņu šķīdums kopā ar 2x ielādes buferšķīdumu (EC-886, National Diagnostics, Atlanta, GA, ASV), atšķaidot tilpumu attiecībā 1:1, tika karsēts 3 min. +90°C. Tālāk 50 µg proteīnu sadalīšanai tika lietota gela elektroforēze (1st. 150 V), izmantojot denaturējošā 10% SDS (nātrija dodecilsulfāta) un poliakrilamīda gelu (10% akrilamīds, 1,5 M Tris-HCl, 0,1% SDS, 3% amonija persulfāts, 0,05% TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilēndiamīns)). Elektroforēzes buferšķīdums sastāvēja no 25 mM Tris bāzes, 192 mM glicīna un 0,1% SDS. Proteīnus pārnese no gela uz polivinilidēndifluorīda (PVDF) membrānu (Imobilon-P membrāna, Merck Millipore, ASV). Proteīnu pārnese tika veikta elektroforētiski, izmantojot pussauso pārnese metodi (elektroforēzes buferšķīdums 25 mM Tris bāzes, 192 mM glicīna un 10% metanola). Elektroforēzes apstākļi bija 180 mA, 20 min. Pēc pārnese membrāna tika noskalota PBS buferšķīdumā un nespecifiskās saistīšanās novēršanai membrāna tika inkubēta 1 st. 5% BSA šķīdinātu PBS buferšķīdumā. Pēc tam tā tika inkubēta 1 st. istabas temperatūrā ar vienu no šādām antivielām: trušu monoklonālām antivielām pret KPT-1B (muskuļu tips) vai α -tubulīnu (1 µg/ml, Millipore, Chemicon). Pēc tam membrāna tika skalota trīs reizes pa 10 min. PBS buferšķīdumā. Membrānu 30 min. inkubēja istabas temperatūrā sekundāro antivielu šķīdumā (ar peroksidāzi konjugētas kazas antivielas pret truša IgG 1:15000 (Chemicon, Millipore). Pēc tam membrāna tika skalota PBS buferšķīdumā tāpat kā iepriekš. Attīstīšanai tika izmantoti hemiluminescences reaģenti – šķīdums A (100mM Tris pH 8,5, 2,5 mM luminols, 0,4 mM p-Coumaric skābe) un šķīdums B (100mM Tris pH 8,5, 0,02% H₂O₂), kas sajaukti tilpuma attiecībā 1:1 tieši pirms attīstīšanas. Gaismas emisiju nosaka, eksponējot uz zilās gaismas jutīgas rentgenfilmas (Amersham HyperfilmTM ECL, GE Healthcare Limited, Lielbritānija). Ekspozīcijas laiks bija 1 min. Pēc tam filma tika attīstīta, izmantojot attīstītāju (X-Omat EX 4, Kodak, ASV) un fiksāžu (RPX-Omat LO, Kodak, ASV).

2.3.11.3. Ribonukleīnskābes izolēšana un kvantitatīva reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcijas analīze

Smadzeņu audus pēc savākšanas nekavējoties sasaldēja šķidrā slāpekļī un uzglabāja -80°C temperatūrā. Kopējo mRNS no smadzeņu audiem izolēja, izmantojot TRI reaģentu (Sigma, ASV), atbilstoši ražotāja instrukcijām. Izolētajai informācijas ribonukleīnskābei (mRNS) spektrometriski noteica daudzumu un kvalitāti. Paraugu atšķaidīja 1:20 (10 µl paraugs un 190 µl ūdens) un mērīja absorbciju pie 230 nm,

260 nm un 280 nm. Lai mRNS koncentrācija būtu 0,5 µg/ml, paraugi tika atšķaidīti ar ūdeni, un pēc tam tika sintezēta pirmās ķēdes komplementārā dezoksiribonukleīnskābe (kDNS), izmantojot High Capacity cDNA Reverse Transcription reaģentu komplektu (Applied BiosystemsTM, ASV). Mēģenē 10 µl paraugam pievienoja 10 µl reaģentu maisījuma, kas sastāvēja no 2 µl 10xRT buferšķīduma, 0,8 µl 25x dNTP MIX, 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl RNāzes inhibitora, 1 µl MultiScribeTM reversās transkriptāzes un 3,2 µl nukleāžu brīva ūdens. Paraugus inkubēja termostatā 10 minūtes +25°C temperatūrā, pēc tam 120 minūtes +37°C temperatūrā. kDNS sintēzes reakcija tika apstādināta, karsējot paraugus 5 minūtes +85°C temperatūrā. Paraugus atšķaidīja tilpumu attiecībā 1:10 (20 µl kDNS un 180 µl ūdens), samaisīja un šo maisījumu izmantoja gēnu ekspresijas izmaiņu noteikšanai.

Kvantitatīvā reālā laika reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcijas (RT-PĶR) analīze tika izmantota šādu gēnu ekspresijas noteikšanai: karnitīna palmitoiltransferāzes 1, aknu (KPT-1A) un smadzeņu (KPT-1C) izoformas, un β-aktīna kā kontrole. Reaģentu maisījums RT-PĶR analīzei sastāvēja no 10 µl SYBR Green master Mix, 6 µl nukleāžu brīva ūdens, 2 µl atbilstošu praimeru maisījuma (R+F) un 2 µl uzsintezētā kDNS parauga. RT-PĶR reakcijas veica Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System aparātā, atbilstoši ražotāju protokoliem un instrukcijām.

2.3.11.4. Smadzeņu mitohondriju izolēšana

Mitohondriji tika izolēti no smadzeņu audiem, kā iepriekš aprakstīts (Kudin *et.al.*, 2004), ar nelielām izmaiņām. Smadzeņu audi tika homogenizēti masas tilpuma attiecībā 1:10 buferī, kurā ietilpa 225 mM mannīts, 75 mM saharoze, 5 mM HEPES un 1 mM EGTA (pH 7,4 pie +4°C temperatūras). Homogenātu centrifugēja 2000 g 5 min. +4°C, pēc tam noņēma supernatnatu, ko tālāk centrifugēja 12000 g 10 min. +4°C. Iegūtās mitohondriju nogulsnes tika resuspendētas izolēšanas buferī. Proteīna koncentrācija paraugā tika noteikta ar *Lowry* metodi (Lowry *et al.*, 1951).

2.3.11.5. Adenozīna trifosfāta koncentrācijas noteikšana smadzeņu audos un izolētos mitohondrijos

Smadzeņu audi pēc izņemšanas tika sasaldēti šķidrā slāpekļī. Smadzeņu audus un izolētos mitohondrijus homogenizēja 5% trihloretikskābē, izmantojot Cole

Parmer 130-Watt ultraskaņas homogenizatoru 60 kHz vai 20 kHz režīmā, 30 vai 10 sek. attiecīgi. Paraugi tika inkubēti 15 min. +4°C un pēc tam centrifugēti 15000 g 10 min. +4°C temperatūrā. ATF koncentrāciju noteica supernatantā, izmantojot ATF bioluminiscences reaģentu komplektu pēc ražotāja protokola (ATP Bioluminescence Kit CLS II, Roche, Vācija), luminiscences mērījumus veica ar LKB Wallac 1251 luminometru.

2.3.11.6. Karnitīna acetiltransferāze un palmitoiltransferāzes 1 aktivitātes mērījumi

KrAT aktivitāti mērīja izolētos žurku smadzeņu mitohondrijos, kā aprakstīts Kūkas publikācijā (Kuka *et.al.*, 2012). Īsumā, mitohondriji tika izolēti, kā iepriekš aprakstīts (Kudin *et.al.*, 2004). Reakcijas norises apstākļi bija šādi: DTNB (0,675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2,5 mM), acetil-koenzīms A (0,1 mM), karnitīns (1 mM). Kopējais reakcijas tilpums bija 200 µl.

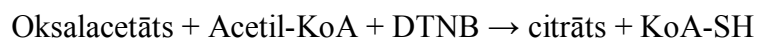
KPT-1 aktivitāte tika noteikta izolētos žurku smadzeņu mitohondrijos. Reakcijas norises apstākļi bija šādi: DTNB (0,675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2,5 mM), palmitoil-koenzīms A (0,05 mM), karnitīns (0,160 mM).

Reakcijas norisei tika sekots ar μ QuantTM platīšu spektrofotometru (BioTek Instruments, ASV), reģistrējot absorbcijas izmaiņas laikā, izmantojot 412 nm viļņa garumu. KrAT un KPT-1 aktivitāte mitohondrijos tika izteikta kā koenzīma A daudzums nmol, kas atbrīvojas 1 minūtē abu enzīmu katalizētās reakcijas laikā, rēķinot uz 1 mg mitohondriālā proteīna.

2.3.11.7. Krebsa ciklā iesaistīto enzīmu aktivitātes noteikšana

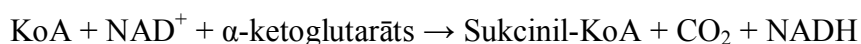
Krebsa ciklā iesaistīto enzīmu aktivitāti (citrātsintāze, α -ketoglutarāta dehidrogenāze, sukcinil-KoA sintetāze un malāta dehidrogenāze) noteica izolētos smadzeņu mitohondrijos. Absorbcijas izmaiņas noteikšanai izmantoja μ QuantTM daudzlauciņu platīšu spektrofotometru (BioTek Instruments, ASV).

Citrātsintāzes (CS, EC 2.3.3.1) aktivitāti noteica, mērot absorbcijas pieaugumu 3 minūšu laikā ik pa 10 sek. pie 412 nm viļņu garuma, saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Srere, 1963).



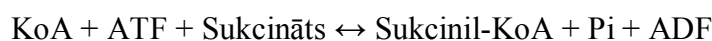
Reakcijas maisījuma sastāvs: 25 µl parauga, 25 µl H₂O, 50 µl DTNB, 50 µl 0,8 mM oksalacetāta (gala konc. >0.2mM), reakciju ierosina ar 50 µl 0,5 mM Acetil-KoA (gala konc. 150 µM). Kopējais reakcijas tilpums bija 200 µl.

α -ketoglutarātdehidrogenāzes (α KGDH, EC 1.2.4.2) aktivitāti noteica, mērot NADH koncentrācijas pieaugumu 10 minūšu laikā ik pa 30 sek. pie 340 nm viļņu garuma (Goncalves *et.al.*, 2010).



Reakcijas maisījuma sastāvs: 30 µl parauga, 20 µl 16 mM NAD, 20 µl 20 mM dithiothreitol (DTT), 20 µl kopā no 20 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂, 1mM EDTA, 20 µl 20 mM α -ketoglutarāts, 20 µl 1 mM tiamīna pirofosfāts, 20 µl 1% Triton X-100, 2 µl 0,1 mM rotenons, reakciju ierosina ar 50 µl 2 mM KoA. Kopējais reakcijas tilpums bija 202 µl.

Sukcinil-KoA sintetāzes (SKoAS, EC 6.2.1.4) aktivitāti noteica, mērot absorbcijas izmaiņu 10 min. laikā ik pa 15 sek. pie 240 nm viļņu garuma (Cha un Parks, 1964).



Reakcijas maisījuma sastāvs: 20 µl parauga, 20 µl 100 mM MgCl₂, 20 µl 0,5 M sukcināts, 20 µl 1 mM ATF, reakciju ierosina ar pirms tam kopā samaisītu 20 µl 1 mM KoA un 100 µl 100 mM TRIS-HCl. Kopējais reakcijas tilpums bija 200 µl.

Malātdehidrogenāzes (MDH, EC 1.1.1.37) aktivitāti noteica, mērot NADH koncentrācijas samazinājumu 5 minūšu laikā ik pa 15 sek. pie 340 nm viļņu garuma (Mullinax *et.al.*, 1982).

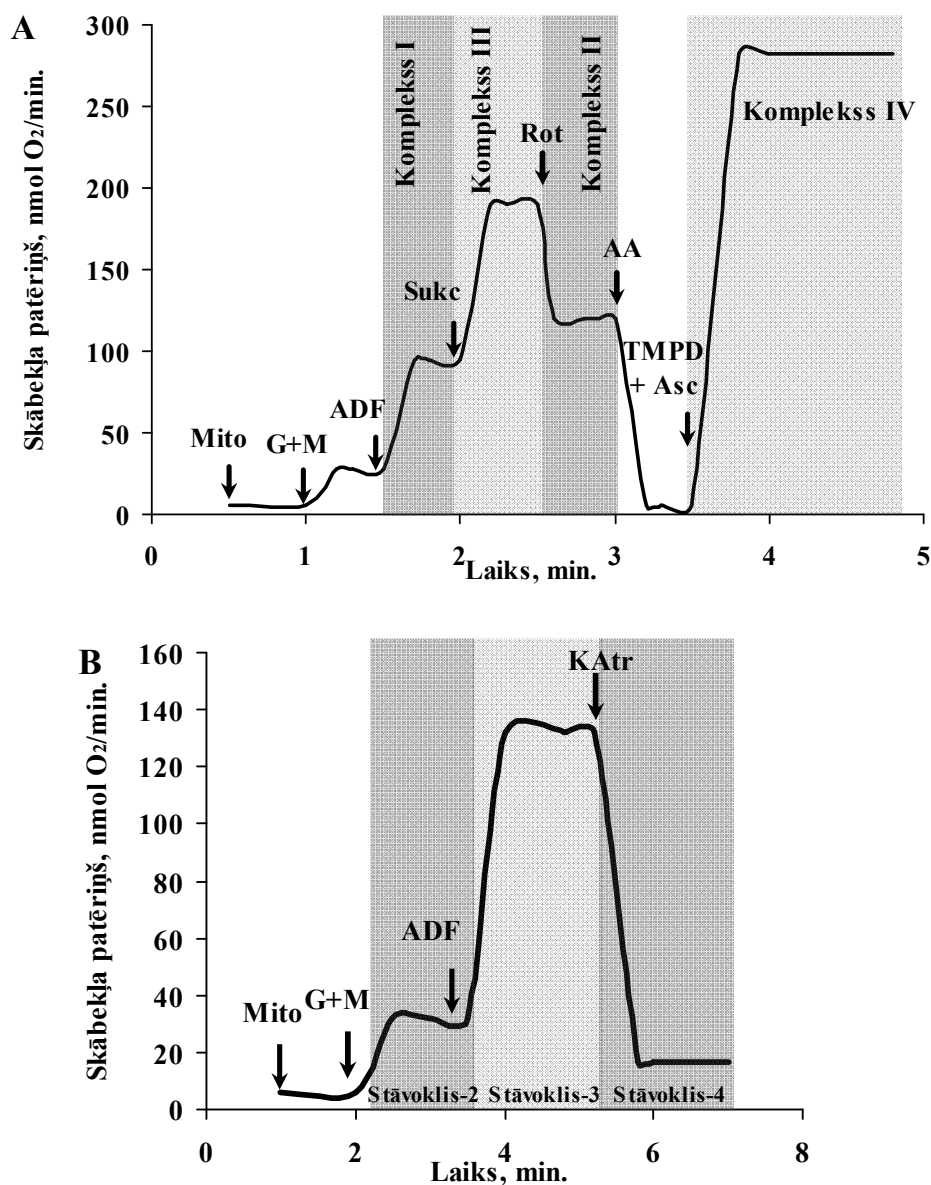


Reakcijas maisījuma sastāvs: 20 µl parauga, 30 µl 1 mM NADH, reakciju ierosina ar 50 µl 2 mM oksalacetāts. Kopējais reakcijas tilpums bija 200 µl.

2.3.11.8. Smadzeņu mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumi normoksijas apstākļos un pēc anoksijas-reoksigenācijas

Skābekļa patēriņa mērījumiem mitohondrijus izolēja no *Wistar* līnijas žurku smadzeņu audiem, kā aprakstīts augstāk esošajā metodē. Mitohondriju elpošanas mērījumi tika veikti elpošanas buferšķīdumā (150 mM KCl, 2,25 mM MgCl₂, 10 mM TRIS-hidrohlorīds, 5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) +37°C temperatūrā. Skābekļa patēriņu mērīja, izmantojot polarogrāfisko elektrodu (Microelectrodes Inc., Bedford, ASV) un datu reģistrēšanas sistēmu PowerLab 8/30 (ADInstruments). ADF stimulētā elpošana

(stāvoklis-3) tika mērīta, izmantojot 0,4 mM ADF un dažādus elpošanas ķēdes substrātus (13.A attēls). 10 mM glutamāts kopā ar 2 mM malātu tika izmantots, lai novērtētu elpošanas ķēdes I kompleksa skābekļa patēriņa ātrumu; lai mērītu elpošanas ķēdes III kompleksu, pēc tam tika pievienots 10 mM sukcināts. Elpošanas ķēdes II kompleksa skābekļa patēriņa ātruma noteikšanai tika pievienots I kompleksa inhibitors – 1 μ M rotenons. Pēc III kompleksa inhibitoru (1 μ M antimicīna A) pievienošanas, tika izmantots 0,5 mM TMPD kopā ar 10 mM askorbātu, lai novērtētu elpošanas ķēdes IV kompleksu stāvoklī 3.



13. attēls. A – Smadzeņu mitohondriju skābekļa patēriņa noteikšana dažādos elpošanas ķēdes kompleksos stāvokļa-3 apstākļos. B – Smadzeņu mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumi oksidatīvās fosforilēšanās un sajūgšanas novērtēšanai. Mito – mitohondriji, G+M – glutamāts un malāts, Succ – sukcināts, Rot – rotenons, AA – antimicīns

A, Asc – askorbāts, KAtr – karboksiatraktilozīds, TMPD – N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilēndiamīna dihidrochlorīds.

Anoksijas-reoksigenācijas (skābekļa atjaunošanas) bojājuma novērtēšanai izolētos smadzeņu mitohondrijos tika izmantots 10 mM glutamāts kopā ar 2mM malātu kā substrāti, un anaerobi apstākļi tika iegūti 2 min. laikā, pievienojot 0,4 mM ADF. Pilnīga anoksija tika novērota 5 min., kad skābekļa koncentrācija mitohondriju suspensijas eksperimentālajā kamerā bija nulles līmenī. Lai panāktu reoksigenāciju (atjaunotu skābekļa līmeni), mitohondriju suspensija tika centrifugēta 12000 g 5 min., pēc tam iegūtās nogulsnes tika resuspendētas un inkubētas 5 min. elpošanas buferšķīdumā. Pēc mitohondriju pakļaušanas anoksijas-reoksigenācijas apstākļiem tika noteikts skābekļa patēriņš elpošanas stāvoklī-2 (elpošana bez ADF), izmantojot 10 mM glutamātu kopā ar 2mM malātu kā substrātus. Stāvoklī-3 tika noteikta oksidatīvās fosforilēšanās kapacitāte, pievienojot 0,4 mM ADF. Lai noteiktu oksidatīvās fosforilēšanās sajūgšanu (elpošanas stāvoklī-4), pievienoja 5 μM karboksiatraktilozīdu (13.B attēls). Elpošanas kontroles koeficients (EKK) tika aprēķināts, izsakot tā vērtību kā attiecību starp skābekļa patēriņa ātrumu stāvokļos- 3 un 4, parādot elpošanas ķēdes procesu kvalitatīvu norisi. Paralēli izolēti mitohondriji tika apstrādāti tādos pašos apstākļos, bet bez 5 min. anoksijas, lai iegūtu kontroles (normoksijas) rādītājus

2.4. Statistiskā datu apstrāde

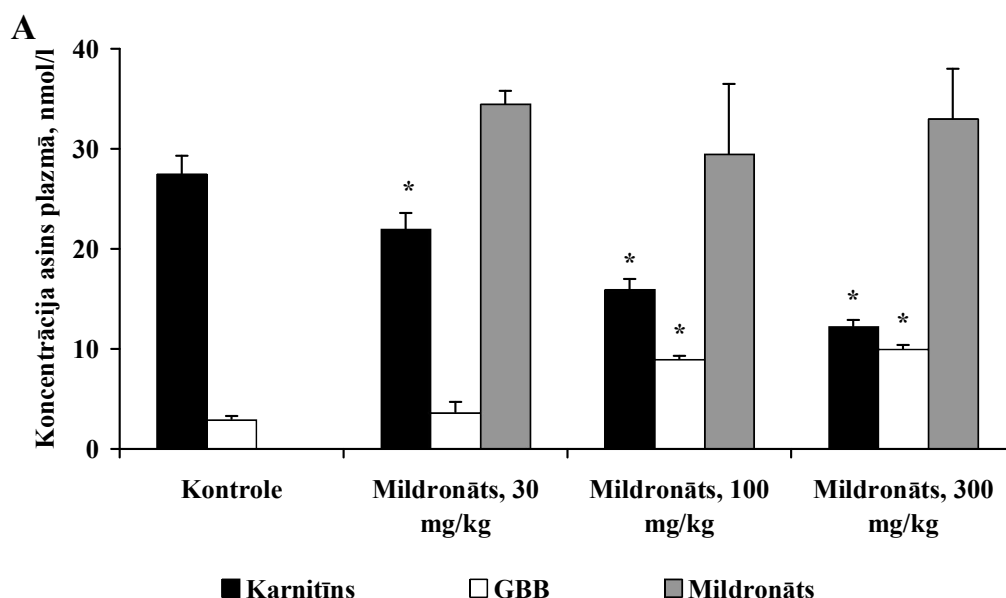
Kvalitatīvie mainīgie (skaits (n) un procentuālā proporcija (%)) attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda (S.E.M.). Grupu salīdzināšanai tika izmantota atbilstošā dispersijas analīze (ANOVA) ar sekojošu pēctestu (Manna-Vitnija, Newman-Keuls, Stjudenta *t*-tests, Dunnetta, Tukija, *Kruskal-Wallis* tests), kas norādīts pie attiecīgo rezultātu apkopojuma tabulās vai grafikos. Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja *p* vērtība bija mazāka par 0,05.

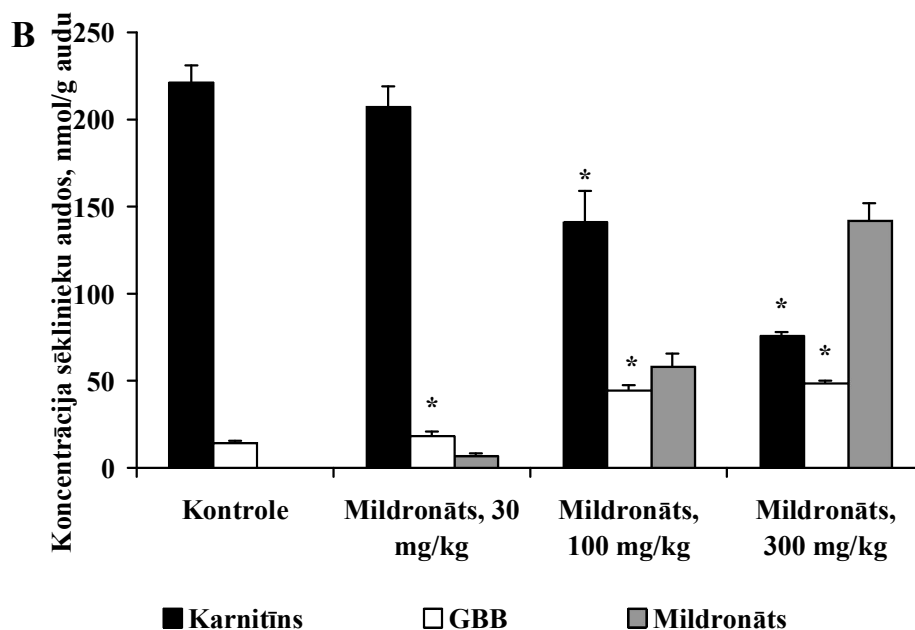
Uzvedības un bioķīmisko datu apkopošanai un statistiskajai analīzei izmantoja programmas Microsoft Excel 2003 un GraphPad Prism 3.0 (*GraphPad Software Inc.*, ASV). Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācijas reģistrācijai un apstrādei izmantota programmatūra MassLynx®, version 4.0 komplektā ar QuanLynx 4.1. moduli.

3. REZULTĀTI

3.1. Mildronāta ietekme uz karnitīna un γ -butirobetāna koncentrāciju asins plazmā un audos

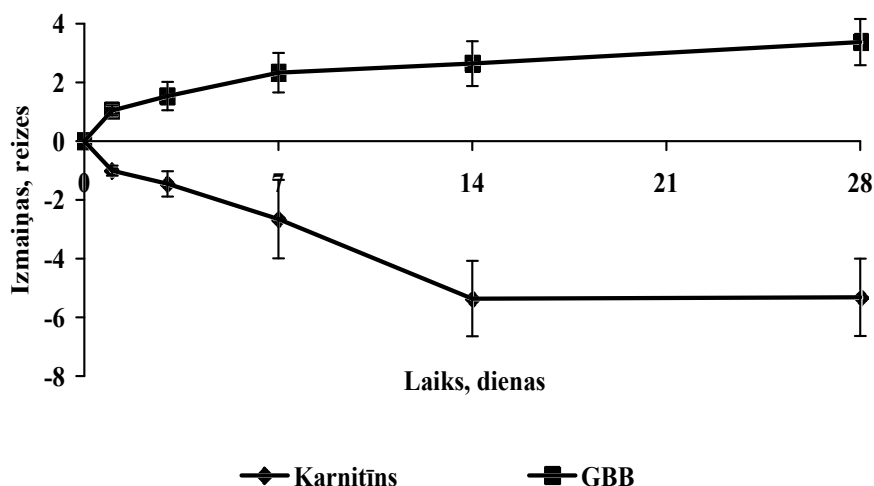
Pēc četrpadsmit dienu ilgas *p.o.* mildronāta ievadīšanas, iegūtajos žurku plazmas un sēklinieku homogenātu paraugos, tika izmērīta karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija, izmantojot UPLC/MS/MS analīzes. Kā redzams 14.A attēlā, kontroles grupas dzīvniekiem brīvā karnitīna un GBB koncentrācija asins plazmā bija attiecīgi 28 ± 2 un $3 \pm 0,3$ nmol/ml. Mildronāta ievadīšanas rezultātā, atkarībā no ievadītās devas, ievērojami bija izmainījusies gan karnitīna, gan GBB koncentrācija, kā to var redzēt 14.A attēlā. Jau mazākā mildronāta deva 30 mg/kg spēja izraisīt ticamu karnitīna koncentrācijas samazināšanos asins plazmā. Mildronāta grupas žurkām asins plazmā tika konstatēts GBB koncentrācijas pieaugums, un efekts bija ticams devās 100 un 300 mg/kg. Kā redzams 14.A attēlā, visu grupu žurku asins plazmā mildronāta koncentrācija bija ap 30 nmol/ml, lai gan tika lietotas dažādas devas.





14. attēls. Mildronāta ievadīšanas efekts uz karnitīna, GBB un mildronāta koncentrāciju žurku tēviņu asins plazmā (A) un sēklinieku audos (B). Mildronāts (30, 100, 300 mg/kg) tika ievadīts *p.o.* 14 dienas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem ± S.E.M. (n = 7–8); *p < 0,05 ticams, salīdzinot ar kontroli (Stjudenta *t*-testu).

Žurku sēklinieku audu ekstrakta analīzes atklāja, ka arī sēklinieku audos, līdzīgi kā plazmas paraugos, bija konstatējamas brīvā karnitīna un GBB koncentrācijas izmaiņas pēc dažādu mildronāta devu iedarbības (14.B attēls). Karnitīna un GBB koncentrācija kontroles grupas žurku sēkliniekos bija attiecīgi 221 ± 10 un $15 \pm 0,6$ nmol/g audu. 100 mg/kg devas mildronāta grupā karnitīna koncentrācija bija samazināta par 36%, un 300 mg/kg mildronāta grupai karnitīna koncentrācija bija gandrīz trīs reizes zemāka nekā kontroles dzīvniekiem, sasniedzot 76 ± 2 nmol/g (14.B attēls). Tajā pašā laikā GBB koncentrācija ticami pieauga, atkarībā no devas, līdz 49 ± 1 nmol/g audu (pieaugums trīs reizes, salīdzinot ar kontroles paraugiem) 300 mg/kg mildronāta grupas žurku sēkliniekos. Kā redzams 14.B attēlā, arī mildronāta koncentrācija žurku sēklinieku ekstraktos pieauga, atkarībā no devas, pieaugums bija $7,4 \pm 1$, $58,6 \pm 7$ un 142 ± 10 nmol/g audu attiecīgi 30, 100 un 300 mg/kg devu mildronāta grupās.

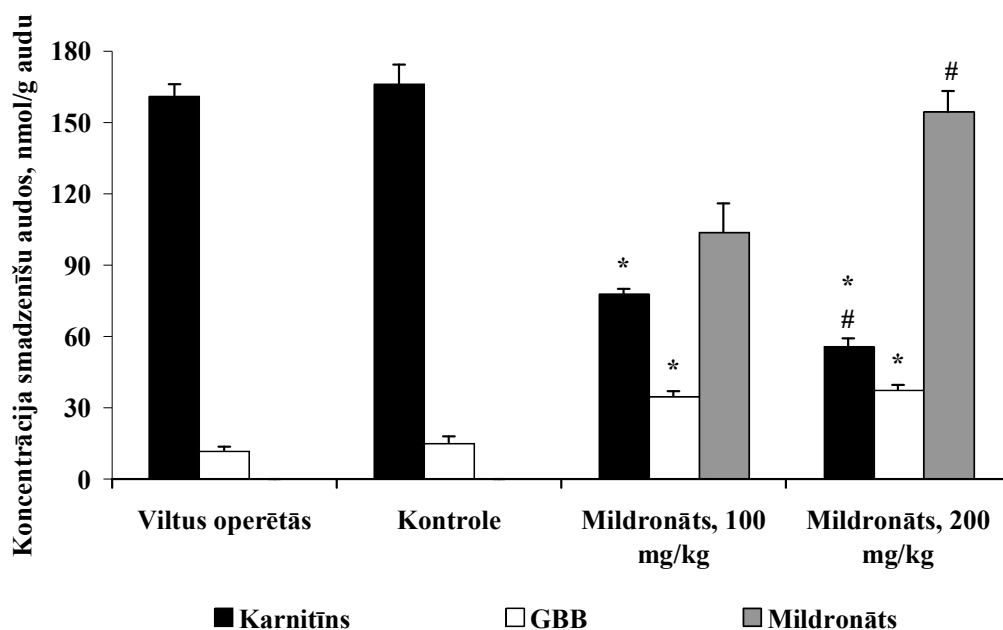


15. attēls. **Mildronāta ievadīšanas ietekme uz karnitīna un GBB daudzumu žurku smadzeņu audos.** Mildronāts tika injicēts *i.p.* devā 100 mg/kg. Vielu daudzumi izteikti kā izmaiņas reizēs no sākotnējā daudzuma. Rezultāti attēloti kā vidējās vērtības no mērījumiem \pm S.E.M. (n = 3).

Hroniska mildronāta ievadīšana devā 100 mg/kg *i.p.* 28 dienas izraisīja ievērojamu karnitīna koncentrācijas samazināšanos un GBB koncentrācijas palielināšanos smadzeņu audos, kā redzams 15. attēlā. Pēc vienreizējas mildronāta ievadīšana nebija izmainīta karnitīna un GBB koncentrācija smadzeņu audos, bet varēja noteikt mildronātu koncentrācijā $18,5 \pm 1,5$ nmol/g. Pēc trīs dienu mildronāta ievadīšanas karnitīna koncentrācija smadzeņu audos bija samazināta 1,5 reizes (no $114,5 \pm 6,1$ līdz $78,8 \pm 24,6$ nmol/g), un GBB koncentrācija smadzeņu audos bija paaugstinājusies līdzīgi 1,5 reizes (no $12,9 \pm 4,1$ līdz $20,1 \pm 6,2$ nmol/g), mildronāta koncentrācija bija $40,7 \pm 13,5$ nmol/g. Karnitīna koncentrācija smadzeņu audos bija $43,2 \pm 18$ nmol/g pēc 7 dienu mildronātu ievadīšanas, bet GBB koncentrācija smadzeņu audos bija $30,5 \pm 8,8$ nmol/g. Pēc 14 dienu mildronāta ievadīšanas devā 100 mg/kg karnitīna koncentrācija tika samazināta 5 reizes ($21,5 \pm 4,8$ nmol/g), bet GBB koncentrācija bija paaugstinājusies līdz pat 3 reizēm ($39,3 \pm 10,1$ nmol/g), sasniedzot *plato* koncentrāciju. Mildronāta koncentrācija paaugstinājās pamazām pirmās 14 ievadīšanas dienas, pēc tam sasniedzot *plato* koncentrāciju ($81,5 \pm 10,4$ nmol/g).

Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija žurku smadzeņu audos tika noteikta 14. dienā pēc VCAO, izmantojot UPLC/MS/MS analīzi. Kā redzams 16. attēlā, VCAO operācija neietekmēja karnitīna un GBB koncentrāciju žurku

smadzeņu audos kontroles grupai, salīdzinot ar viltus operēto grupu. Karnitīna koncentrācija viltus operēto un kontroles dzīvnieku smadzeņu audos bija attiecīgi 166 ± 8 un 161 ± 5 nmol/g audu, un GBB koncentrācija bija 15 ± 3 un 12 ± 2 nmol/g audu (skatīt 16. attēlu). Mildronāta hroniskas ievadīšanas rezultātā ticami un atkarībā no devas izmainījās gan karnitīna [$F(3,27) = 103,5, p < 0,0001$], gan GBB [$F(3,27) = 35,31, p < 0,0001$] koncentrācija. Mildronāts devā 100 mg/kg samazināja karnitīna koncentrāciju par 50%, bet 200 mg/kg devā rezultātā karnitīna koncentrācija samazinājās pat trīs reizes, līdz pat 56 ± 3 nmol/g audu.



16. attēls. Mildronāta ietekme devās 100 un 200 mg/kg uz karnitīna, GBB un mildronāta koncentrāciju žurku smadzeņu audos. Rezultāti attēloti kā vidējās vērtības no mērījumiem \pm S.E.M. ($n = 6-8$); * $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot mildronāta 100 mg/kg grupu (viena veida ANOVA un sekojošais Dunnetta tests).

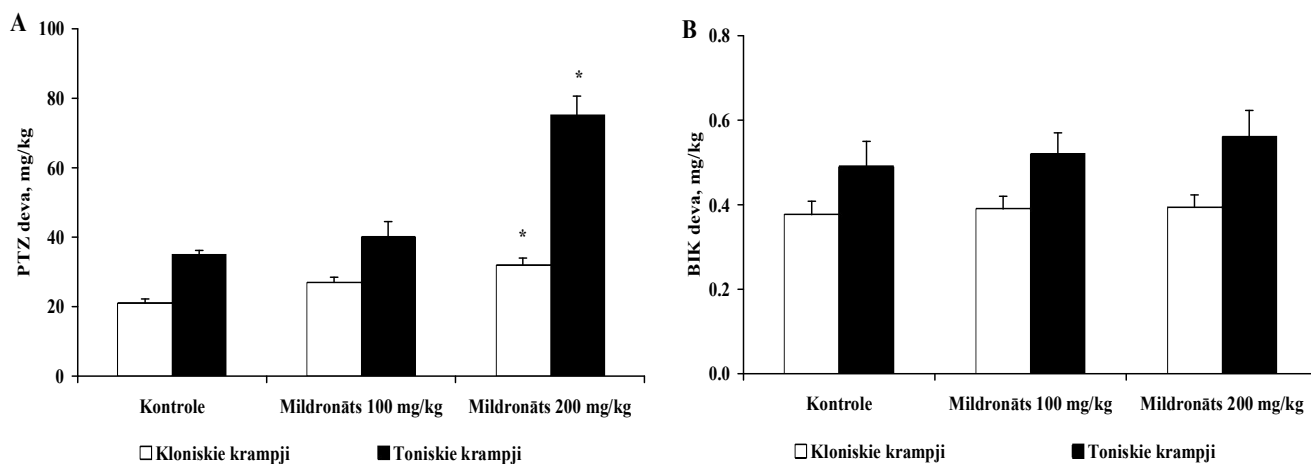
Mildronāts devās 100 un 200 mg/kg palielināja GBB koncentrāciju divas reizes, attiecīgi līdz 35 ± 2 un 38 ± 2 nmol/g audu. Kā redzams 16. attēlā, mildronāta koncentrācija žurku smadzeņu audos palielinājās atkarībā no devas, un tā bija 104 ± 12 nmol/g audu pēc mildronāta ievadīšanas devā 100 mg/kg un 154 ± 9 nmol/g audu pēc mildronāta ievadīšanas devā 200 mg/kg ($p < 0,05$).

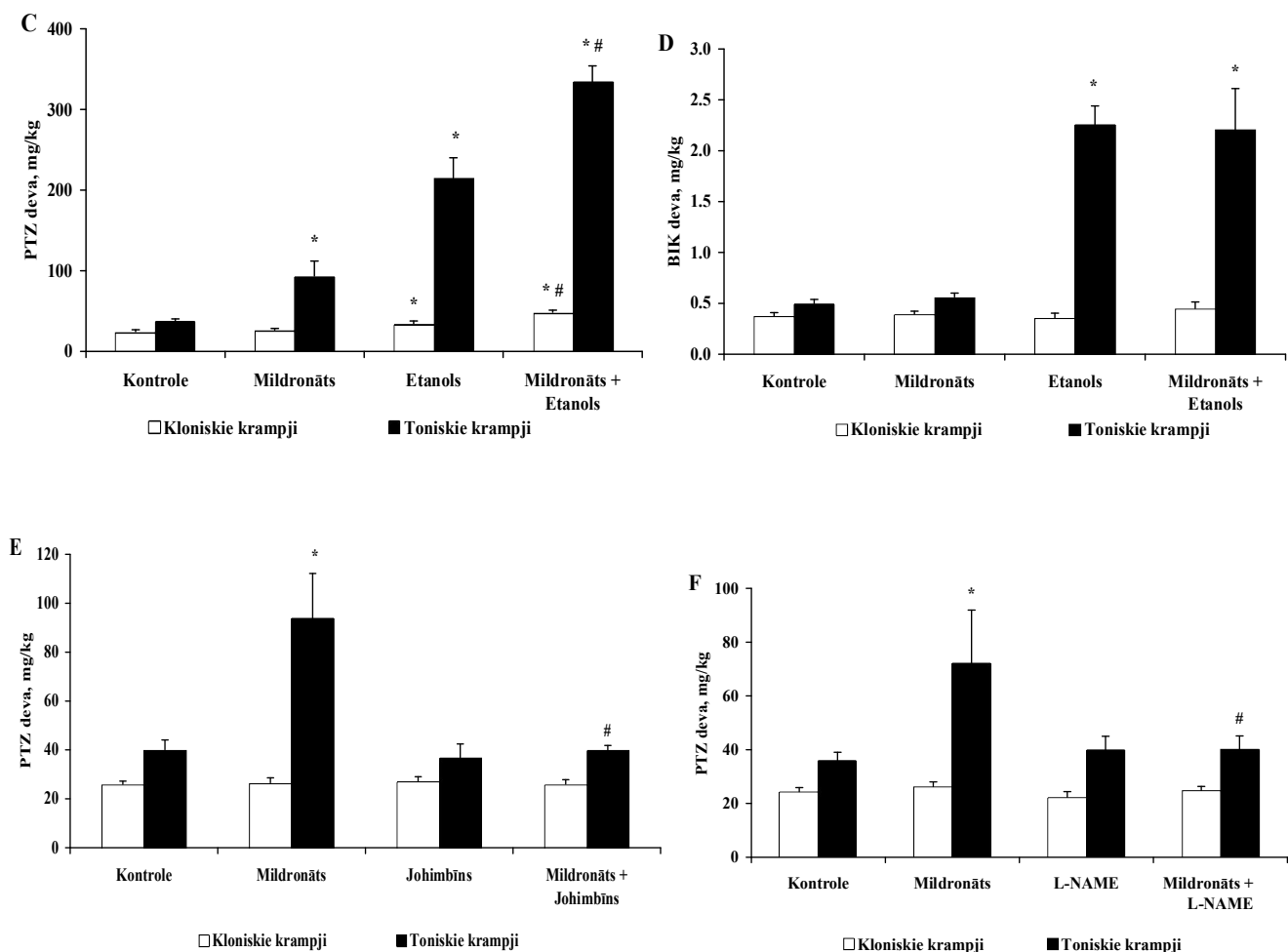
3.2. Mildronāta akūtā pretkrampju un antihipnotiskā darbība

3.2.1. Mildronāta ietekme uz pentilēn-tetrazola un bikukulīna radītajiem krampjiem

Mildronāta pretkrampju efekts tika pētīts PTZ un BIK izraisīto krampju testos. Mildronāts akūti tika ievadīts pelēm devās 100 un 200 mg/kg 30 min. pirms krampju izraisīto vielu injekcijas. Tika noteikta nepieciešamā minimālā PTZ un BIK deva, kas izsauc kloniskos un toniskos krampjus.

Kontroles dzīvniekiem nepieciešamā PTZ deva, kas izraisīja kloniskos un toniskos krampjus, bija 24 ± 2 un 38 ± 2 mg/kg (17.A attēls), bet BIK deva bija attiecīgi $0,38 \pm 0,03$ un $0,50 \pm 0,04$ mg/kg (17.B attēls). Pēc mildronāta ievadīšanas devā 200 mg/kg klonisko un tonisko krampju inducējošā savienojuma PTZ deva bija ievērojami jāpalielina, attiecīgi līdz 33 ± 2 mg/kg [$F(2,21) = 19,04, p < 0,001$] un 51 ± 5 mg/kg [$F(2,21) = 4,42, p < 0,05$] (17.A attēls). Mildronāts devā 100 mg/kg neietekmēja krampju izraisīto savienojumu PTZ vai BIK devas. Toties atšķirībā no novērotā PTZ krampju testa mildronāts devā 200 mg/kg bija neefektīvs BIK izraisītajā krampju testā (17.B attēls).





17. attēls. **Mildronāta ietekme uz PTZ un BIK ierosināto krampju sliekšņu devu vērtībām.** Mildronāts tika ievadīts *i.p.* devās 100 un 200 mg/kg 30 min. (A) pirms PTZ injekcijas un (B) pirms BIK injekcijas.

Mildronāta (200 mg/kg) ietekme uz etanola (2 g/kg) pretkrampju darbību. Mildronāts tika ievadīts 30 min. pirms etanola injekcijas. (C) PTZ injekcija 60 min. pēc etanola injekcijas (D) BIK injekcija 60 min. pēc etanola injekcijas.

Johimbīna (2 mg/kg) iedarbība uz mildronāta pretkrampju efektu. Johimbīns tika ievadīts 30 min. pirms mildronāta (200 mg/kg) injekcijas. (E) PTZ injekcija 60 min. pēc mildronāta injekcijas

(F) L-NAME (10 mg/kg) efekts uz mildronāta (200 mg/kg) pretkrampju darbību. L-NAME ievadīts 5 min. pirms mildronāta injekcijas.

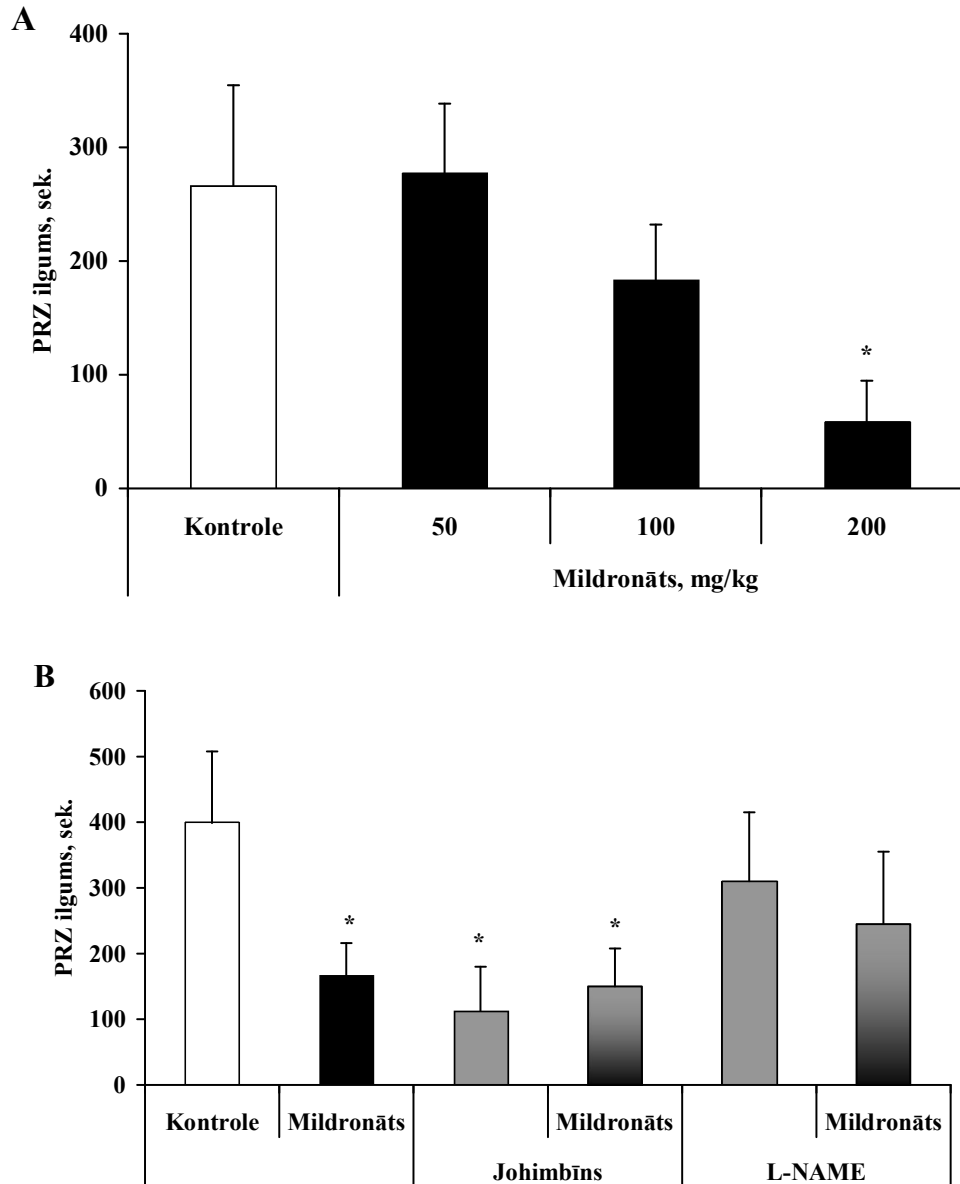
Vērtības attēlotas kā vidējie mērījumi \pm S.E.M. ($n = 10$); * $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar mildronāta grupu (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman-Keuls* tests).

Lai pēc etanola 2 g/kg injicēšanas novērotu PTZ efektu, bija ievērojami jāpaaugstina PTZ deva klonisko krampju [$F(3,28) = 15,75, p < 0,05$] un tonisko krampju [$F(3,28) = 55,87, p < 0,001$] izraisīšanai (17.C attēls). Pelēm, kurām iepriekš tika ievadīts etanols, bija arī nepieciešama lielāka BIK deva, lai izraisītu toniskos krampjus [$F(3,28) = 21,09, p < 0,001$] (17.D attēls). Kā redzams 17.C attēlā, mildronāts devā 200 mg/kg ievērojami veicināja etanola pretkrampju darbību PTZ testā pret kloniskajiem krampjiem [$F(3,28) = 15,75, p < 0,001$] un toniskajiem krampjiem [$F(3,28) = 55,87, p < 0,001$]. Tomēr mildronāts neietekmēja etanola efektu BIK izraisītajā krampju testā (17.D attēls).

Johimbīns (2 mg/kg) neietekmēja nepieciešamo PTZ devu, lai izraisītu kloniskos un toniskos krampjus (17.E attēls). Ja johimbīnu (2 mg/kg) ievadīja 30 min. pirms mildronāta, tad johimbīns bloķēja mildronāta pretkrampju efektu uz toniskajiem krampjiem [$F(3,28) = 8,16, p < 0,001$] (17.E attēls). Līdzīgu efektu novēroja, kad L-NAME (10 mg/kg) tika ievadīts 5 min. pirms mildronāta – L-NAME nomāca mildronāta pretkrampju darbību [$F(3,36) = 4,88, p < 0,01$] (17.F attēls).

3.2.2. Mildronāta ietekme uz etanola hipnotisko efektu

Etanols tika akūti ievadīts hipnotisko efektu izraisošā devā, un tika reģistrēts „pārvelšanās” refleksa zudums (PRZ). PRZ ilgums kontroles pelēm pēc akūtas etanola (3,5 g/kg, *i.p.*) injekcijas bija 266 ± 88 sek. (18.A attēls). Mildronāts devā 200 mg/kg ticami samazināja etanola efektu par aptuveni 50%, salīdzinot ar kontroles pelēm [$F(3,36) = 3,28, p < 0,05$] (18.A attēls). Mildronāts devās 100 un 50 mg/kg etanola hipnotisko efektu neietekmēja.



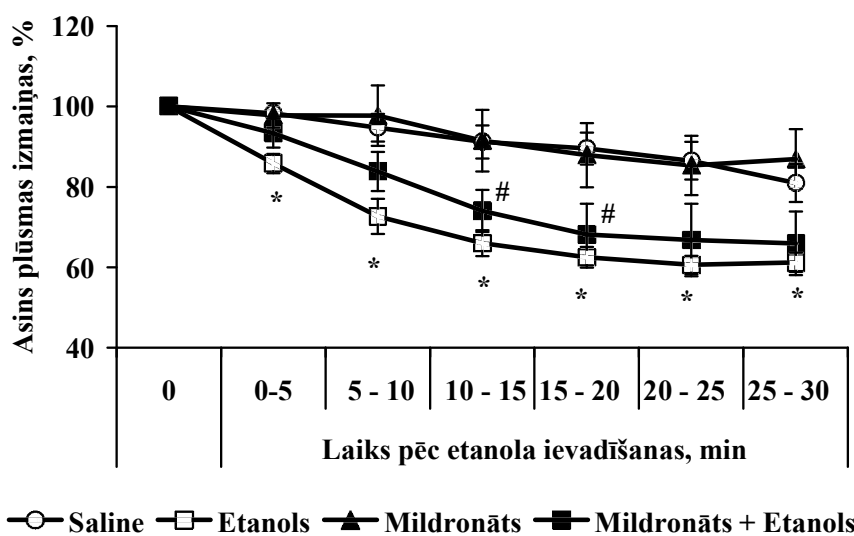
18. attēls. **Mildronāta efekts uz etanola radīto PRZ.** Etanols tika ievadīts *i.p.* devā 3,5 g/kg. (A) Mildronāts ievadīts *i.p.* devās 50, 100 un 200 mg/kg 30 min. pirms etanola. (B) Johimbīna devā 1 mg/kg (30 min. pirms mildronāta), L-NAME devā 10 mg/kg (5 min. pirms mildronāta) un mildronāta (200 mg/kg) antihipnotiskā darbība etanola modelī. Rezultāti tika izteikti kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 9-10$); * $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman-Keuls* tests).

Nākamajā eksperimentā, kurā tika ievadīts johimbīns (1 mg/kg) pirms etanola, tas ievērojami samazināja PRZ ilgumu. Johimbīnam antihipnotiskā aktivitāte tika novērota arī, ja tas tika ievadīts pirms mildronāta (200 mg/kg), [$F(3,40) = 3,23$, $p <$

0,05] (18.B attēls). L-NAME devā 10 mg/kg, ievadot 5 min. pirms mildronāta, neietekmēja mildronāta antihipnotisko iedarbību (18.B attēls).

3.2.3. Mildronāta ietekme uz žurku smadzeņu garozas asins plūsmu pēc etanola ievadīšanas

Kā redzams 19. attēlā, smadzeņu garozas asins plūsma kontroles grupā eksperimenta laikā (30 min.) bija stabila ($100 \pm 4\%$). Etanola injekcija ticami samazināja garozas asins plūsmu tūlīt pēc ievadīšanas par 15% ($85 \pm 2\%$) no sākotnējā līmeņa [$F(3,24) = 3,54, p < 0,05$]. Samazinātā smadzeņu garozas asins plūsma etanola grupā saglabājās 30 min. pēc etanola injekcijas, tā bija $67 \pm 2\%$ no sākotnējā līmeņa. Kā redzams 19. attēlā, mildronāts daļēji kavēja etanola darbību, neļaujot pazemināties asins plūsmai. Tajā pašā laikā mildronāta ievadīšana dzīvniekiem neizraisīja nekādas izmaiņas garozas asins plūsmā, salīdzinot ar kontroles grupu.

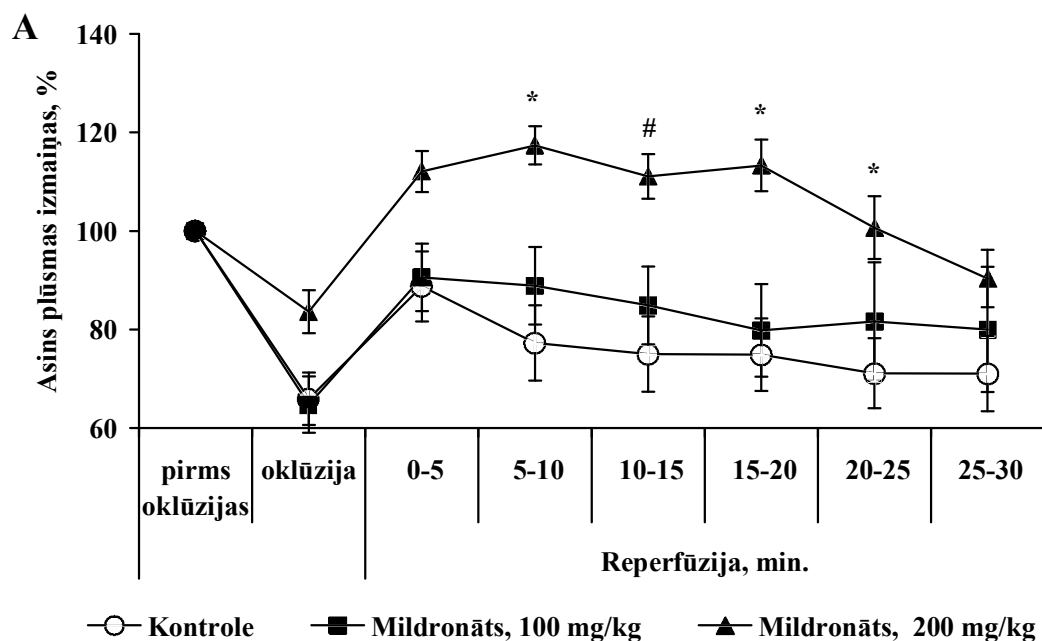


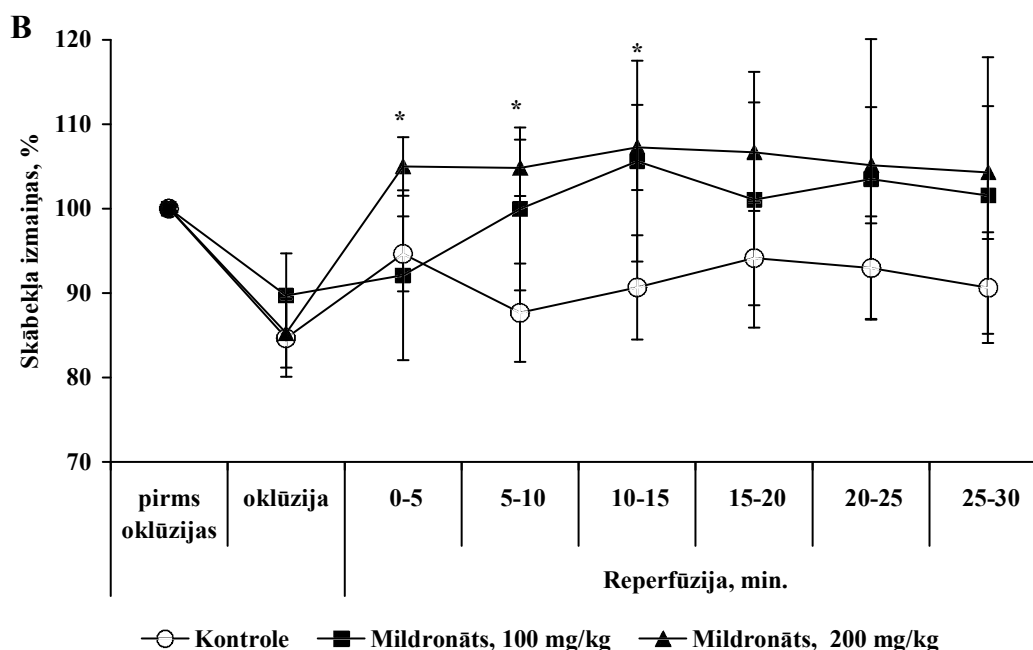
19. attēls. Mildronāta (200 mg/kg) efekts uz smadzeņu garozas asins plūsmu žurkām pēc etanola ievadīšanas. Rezultāti tika izteikti kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8$); * $p < 0,05$ un # $p < 0,06$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu (viena veida ANOVA un sekojošais Newman-Keuls tests).

3.2.4. Mildronāta ietekme uz asins plūsmas un skābekļa daudzumu žurku smadzenēs pēc īslaicīgas *a.carotis communis* oklūzijas

Kā redzams 20.A attēlā, pēc īslaicīgas (5 min.) kreisās CCA oklūzijas smadzeņu asins plūsma kontroles žurkām samazinājās līdz $65 \pm 5\%$ oklūzijas laikā un

82 ± 3% reperfūzijas laikā, salīdzinot ar sākotnējiem asins plūsmas mērījumiem. Savukārt pirms oklūzijas, ievadot mildronātu devā 200 mg/kg, netika novērots straujš asins plūsmas kritums oklūzijas laikā un reperfūzijas 30 min. periodā, tas attiecīgi bija par 15% un 20% mazāks, salīdzinot ar sākotnējo līmeni. Reperfūzijas periodā 5–25 min. mildronāta (200 mg/kg) dzīvnieku grupā bija ticami atjaunojusies asins plūsma [$F(2,105) = 12,83, p < 0,001$], salīdzinot ar kontroles grupu (20.A attēls). Līdzīgas izmaiņas tika novērotas skābekļa piesātinājuma mērījumiem. Mildronāts devā 200 mg/kg novērsa skābekļa piesātinājuma kritumu, šī tendence bija nozīmīga tūlīt pēc oklūzijas līdz 15 min. [$F(2,72) = 4,09, p < 0,05$] (20.B attēls). Mildronāts 100 mg/kg samazināja skābekļa piesātinājuma krituma svārstības pēc oklūzijas, bet efekts nebija ticams (20. attēls).





20. attēls. Mildronāta (100 un 200 mg/kg) ietekme uz asins plūsmas (A) un skābekļa piesātinājuma (B) izmaiņām žurku smadzenēs pēc īslaicīgas CCA oklūzijas. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8$); * $p < 0,05$ un # $p < 0,06$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman–Keuls* tests).

3.2.5. Mildronāta ietekme uz peļu kustību un izpētes aktivitāti

Peļu, kuras saņēma mildronāta *i.p.* injekcijas devās 30, 100 un 300 mg/kg, motorā, vertikālā un izpētes aktivitāte pēc 30, 60 un 120 min. kopš mildronāta ievadīšanas neatšķīrās no kontroles pelēm, kurām injicēja fizioloģisko šķīdumu (1. tabula).

1. tabula. Mildronāta iedarbība uz peļu uzvedību atvērtā lauka testā

Laiks (min.)	Horizontālā aktivitāte				Vertikālā aktivitāte				Izpētes aktivitāte			
	Kontr	Mildronāts (mg/kg)			Kontr	Mildronāts (mg/kg)			Kontr	Mildronāts (mg/kg)		300
		30	100	300		30	100	300		30	100	
30	52 \pm 4	49 \pm 5	63 \pm 4	52 \pm 3	10 \pm 3	10 \pm 2	9 \pm 1	12 \pm 2	26 \pm 3	20 \pm 4	24 \pm 3	31 \pm 3
60	31 \pm 3	28 \pm 6	29 \pm 4	27 \pm 3	8 \pm 2	7 \pm 2	7 \pm 3	8 \pm 2	16 \pm 2	18 \pm 4	14 \pm 2	17 \pm 4
120	25 \pm 4	20 \pm 3	21 \pm 3	21 \pm 4	5 \pm 2	3 \pm 2	3 \pm 1	3 \pm 1	17 \pm 3	14 \pm 3	14 \pm 3	15 \pm 3

Mildronāts tika ievadīts devās 30, 100 un 300 mg/kg. Peļu horizontālā, vertikālā un izpētes aktivitāte tika novērota 30, 60 un 120 min. pēc mildronāta *i.p.* ievadīšanas. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8-9$).

3.3. Karnitīna biosintēzes inhibitora ietekme uz žurku tēviņu seksuālo aktivitāti

3.3.1. Mildronāta ietekme uz žurku tēviņu seksuālo uzvedību

Novērojot žurku seksuālo uzvedību pēc mildronāta ievadīšanas četrpadsmit dienas *p.o.* 30 mg/kg, 100 mg/kg un 300 mg/kg devās, jāsecina, ka mildronāts būtiski nesamazināja žurku tēviņu seksuālo aktivitāti uzvedības testā, bet atsevišķos rādītājos to pat uzlaboja. Mildronāts visās devās ticami samazināja latentu periodu starp pēdējo ejakulāciju un nākamo pirmo intromisiju (PEI) (2.tabula).

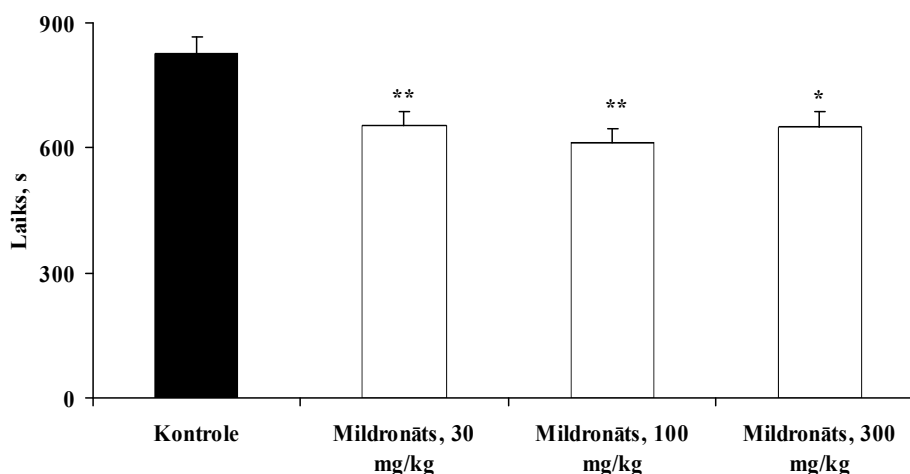
2. tabula. Mildronāta ietekme uz žurku tēviņu seksuālo uzvedību

Uzvedības parametri	Eksperimentālās grupas			
	Kontrole	Mildronāts, 30 mg/kg	Mildronāts, 100 mg/kg	Mildronāts, 300 mg/kg
ML (sek.)	251 ± 173	392 ± 198	710 ± 259	273 ± 171
IL (sek.)	251 ± 173	397 ± 197	711 ± 259	281 ± 170
EL (sek.)	858 ± 87	722 ± 87	836 ± 109	857 ± 139
PEI (sek.)	825 ± 43	653 ± 34**	613 ± 32**	651 ± 35*
MF	1,6 ± 0,3	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,5
IF	11,7 ± 1,5	12,3 ± 0,9	13,6 ± 1,1	13,3 ± 2,1
III (sek.)	87,0 ± 16,7	58,2 ± 7,0	57,5 ± 3,4	63,8 ± 6,2
CE (%)	88,9 ± 2,8	89,7 ± 2,4	90,2 ± 2,0	87,9 ± 1,6

Seksuāli aktīvu žurku tēviņu seksuālās uzvedības parametri pēc mildronāta ievadīšanas (30, 100, 300 mg/kg). ML = latentais periods līdz pirmajai uzkāpšanai, IL = latentais periods līdz pirmajai intromisijai, EL = pārošanās cikla vidējais ilgums, PEI = latentais periods starp pēdējo ejakulāciju un nākamo pirmo intromisiju, MF = uzkāpšanu skaits cikla laikā, IF = intromisiju skaits cikla laikā, III = starpintromisiju intervāls, CE = pārošanās efektivitāte. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 10). *p < 0,05 un **p < 0,01 statistiski ticami atšķiras, salīdzinot ar kontroles grupu (viena veida ANOVA un ar sekojošu Manna-Vitnija testu).

Mildronāts pozitīvi ietekmēja kopējo intromisiju skaitu (IF), jo mildronāts devā 30 mg/kg to palielināja par 5%, 100 mg/kg tas bija par 16% augstāks, bet 14% liels pieaugums tika novērots 300 mg/kg devā. Novērojums liecina par žurku tēviņu nedaudz palielinātu seksuālo aktivitāti.

Starpintromisiju intervāls (III) kontroles grupai ilga 87 sek., bet pēc 30 mg/kg mildronāta ievadīšanas – tikai 58,5 sek. Līdzīgs efekts bija novērojams arī žurkām, kurām ievadīja mildronātu devās 100 un 300 mg/kg.



21. attēls. **Mildronāta (30, 100, 300 mg/kg) ietekme uz latento periodu starp cikliem pēc četrpadsmit dienu ilgas ievadīšanas.** Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 10$). * $p < 0,05$ un ** $p < 0,01$ ticami atšķiras, salīdzinot ar kontroles grupu (viena veida ANOVA un ar sekojošu Manna-Vitnija testu).

Kā redzams 21. attēlā, mildronāta ievadīšanas rezultātā novēro ticami samazinātu latento periodu starp cikliem (PEI). Iegūtie rezultāti liecina, ka kontroles grupai latentais periods ilga 825 sek., taču visās mildronāta ievadīšanas grupās (30, 100 un 300 mg/kg) tika novērots salīdzinoši īsāks latentā perioda laiks, attiecīgi – 653, 613 un 651 sek. (2. tabula un 21. attēls). Jāatzīmē, ka netika novērota no mildronāta devas atkarīga latentā perioda samazināšanās, un novērotais efekts bija aptuveni vienāds visiem mildronāta grupu dzīvniekiem.

3.3.2. Mildronāta ietekme uz reproduktīvo orgānu svaru un spermas kvalitāti

Vidējais dzīvnieku ķermeņa svars starp eksperimenta žurku grupām neatšķīrās. Mildronāta ietekme uz spermas kvalitāti tika pārbaudīta devā 100 mg/kg, kas ir visbiežāk lietotā mildronāta deva, kura izraisa kardioprotektīvu efektu gan eksperimentālajā farmakoloģijā, gan atbilst klīniski izmantotajam devu diapazonam. Kā to var redzēt 3. tabulā, mildronāta ievadīšana neietekmēja žurku tēviņu

reproduktīvo orgānu svaru, izņemot sēklas pūslīti, kuram tika atrasts ticams masas pieaugums, salīdzinot ar kontroles žurku tēviņu sēklas pūslīšu svaru.

3. tabula. Mildronāta efekts uz dzimumorgāna svaru (g)

Eksperimentālās grupas	Sēklinieki	Sēklas pūslītis	Prostata	Sēklinieka piedēklis
Kontrole	1,1 ± 2,7	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,03 ± 0,004
Mildronāts 100 mg/kg	1,1 ± 3,2	0,4 ± 0,03**	0,2 ± 0,01	0,04 ± 0,004

Vērtības ir vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 10). **p < 0,02, statistiski ticams salīdzinot ar kontroli (Stjudenta *t*-tests).

Kā redzams 4. tabulā, spermatozoīdiem, kuri tika ņemti no sēklinieka piedēkļa astes daļas (*cauda epididymis*), nenovēroja atšķirības ne kustīguma, ne blīvuma rādītāju ziņā, salīdzinot kontroles un 100 mg/kg mildronāta grupas žurkas. Tajā pašā laikā aglutinācija bija retāk novērojama 100 mg/kg mildronāta grupas žurku spermatozoīdu paraugos (tikai 5 no 10 paraugiem), salīdzinot ar kontroles paraugiem (9 no 10).

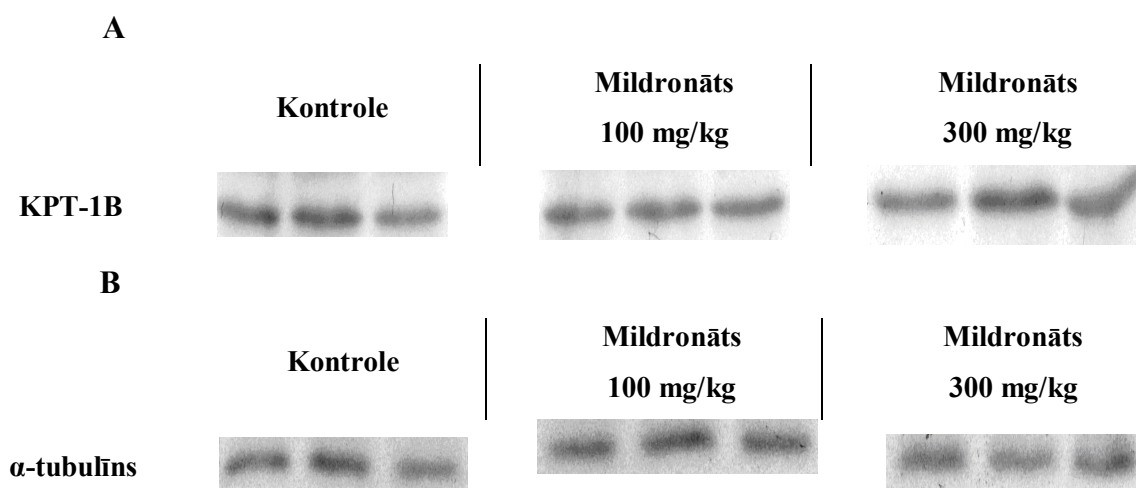
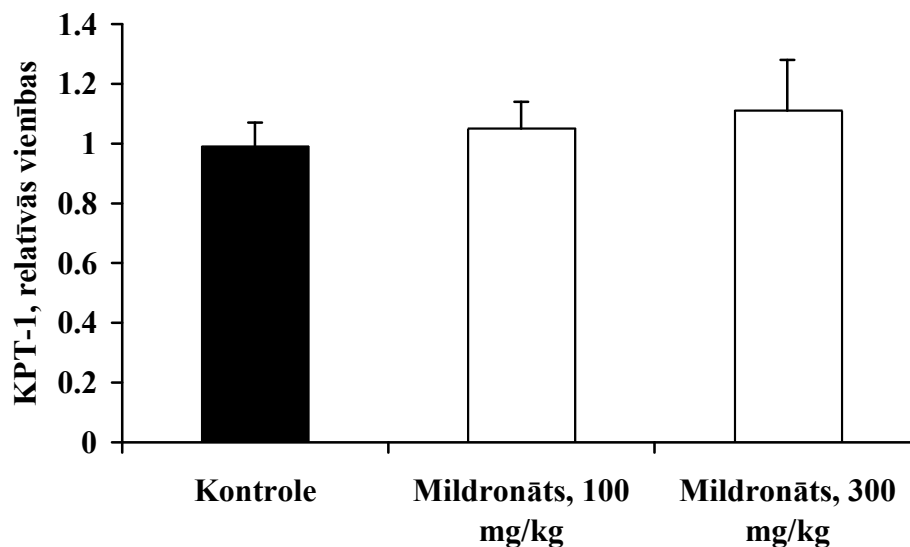
4. tabula. Mildronāta efekts uz žurku tēviņu spermatozoīdiem (*cauda epididymis*)

Eksperimentālās grupas	Spermas blīvums, %	Kustīgie spermatozoīdi, %	Nekustīgie spermatozoīdi, %	Vibrējušie spermatozoīdi, %	Aglutinācija, sastopamība
Kontrole	67,0 ± 5,9	28,0 ± 5,9	47,0 ± 6,8	25,0 ± 1,8	9/10
Mildronāts 100 mg/kg	54,8 ± 7,2	24,0 ± 5,0	53,0 ± 6,3	23,0 ± 2,0	5/10

Vērtības ir vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 10).

3.3.3. Mildronāta ietekme uz karnitīna palmitoiltransferāzes 1B gēnu ekspresiju žurku sēkliniekos

Mildronāta ievadīšanas rezultātā samazinātās karnitīna koncentrācijas ietekme uz KPT-1B proteīnu ekspresiju žurku tēviņu sēkliniekos tika pētīta pēc četrpadsmit dienu ilgas mildronāta ievadīšanas devās 100 un 300 mg/kg, KPT-1B proteīna noteikšanai izmantojot imunoblota analīzi. Kā to var redzēt 22. attēlā, mildronāta ievadīšanas rezultātā KPT-1B ekspresija žurku tēviņu sēklinieku audos ievērojami nemainījās.

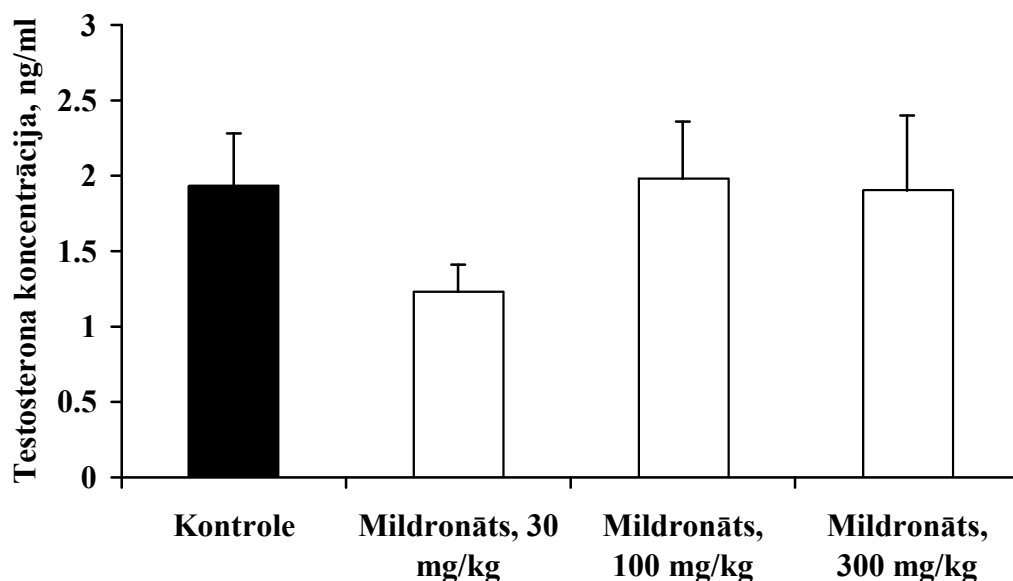


22. attēls. KPT-1B (muskulu tips) (A) un α -tubulīns (B) kontroles un mildronāta (100 un 300 mg/kg) grupu žurku sēkliniekos. Vērtības ir vidējie lielumi \pm S.E.M. un rezultāti izteikti relatīvās vienībās atbilstoši α -tubulīna koncentrācijai. Grafikā attēlotas KPT-1B ekspresijas vidējās relatīvās vērtības no triju kontroļu un sešu mildronāta grupu žurku sēklinieku ekstraktiem.

3.3.4. Mildronāta ietekme uz testosterona koncentrāciju žurku asins plazmā

Pēc četrpadsmit dienu ilgas *p.o.* mildronāta ievadīšanas devās 30 mg/kg, 100 mg/kg un 300 mg/kg un seksuālās uzvedības novērošanas, žurku tēviņi tika dekapitēti, un savākta kopējā asinis plazma tālākajām analīzēm. Turpmākajā eksperimentu gaitā tika analizēti iegūtie plazmas paraugi, tajos nosakot testosterona

koncentrāciju. Kā redzams 23. attēlā, mildronāta ievadīšana divu nedēļu garumā nav ietekmējusi testosterona koncentrāciju asinīs.



23. attēls. Testosterona koncentrācijas izmaiņas pēc 14 dienu ilgas mildronāta ievadīšanas. Vērtības ir vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 10$).

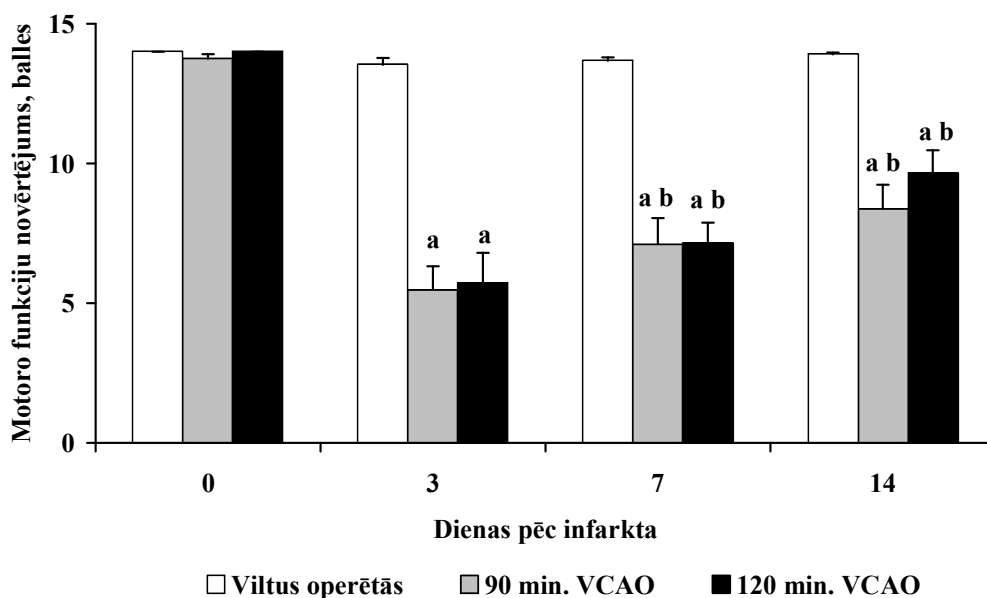
Jāatzīmē, ka mildronāts mazākajā devā 30 mg/kg uzrādīja tendenci samazināt testosterona koncentrāciju. Savukārt žurku tēviņiem pēc mildronāta ievadīšanas lielākās devās 100 mg/kg un 300 mg/kg testosterona līmenis neatšķīrās no kontroles grupas līmeņa (23. attēls).

3.4. Pārejošās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku sensori-motoro un izzināšanas funkciju

3.4.1. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme ķepu novietošanas testā

Žurku priekšķepu un pakalķepu atbildes reakcija uz izsuktajiem taktilajiem un proprioceptīvajiem kairinājumiem bija būtiski izmainījusies ķepu novietošanas testā, un šī pasliktinātā atbilde tika novērota visos pārbaudītajos laika intervālos (3., 7. un 14. pēcooperācijas dienā) gan VCAO grupai ar 90 min., gan 120 min. oklūziju, salīdzinot ar viltus operēto grupu (24. attēls, divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA apstiprināja galveno grupas efektu [$F(2,38) = 66,53, p < 0,0001$], dienas [$F(3,114) = 127, p < 0,0001$] un grupas un dienas savstarpējo mijiedarbību [$F(6,114) = 35,69, p > 0,0001$]). Pēc abiem oklūzijas laikiem žurku grupām tika novēroti atveseļošanās

procesi, ko ilustrē par 20% uzlabojušās taktilās un proprioceptīvās funkcijas, salīdzinot 3. un 7. pēcooperācijas dienu ($p < 0,01$), un pat uzlabošanās divas reizes starp 3. un 14. pēcooperācijas dienu ($p < 0,01$) (24. attēls). Netika atrastas atšķirības taustes un proprioceptīvo stimulu atbildes reakcijā priekšķepām un pakaļķepām starp 90 un 120 min. VCAO grupām jebkurā novērotajā pēcooperācijas dienā.

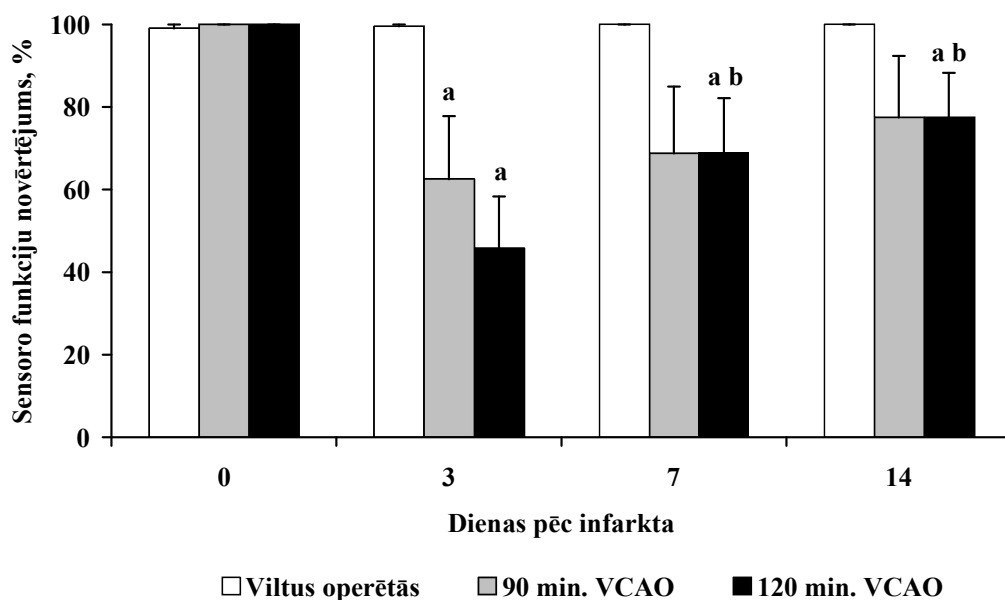


24. attēls. VCAO 90 un 120 min. ietekme uz pakaļējo un priekšējo ķepu novietošanu ķepu novietošanas testā žurkām. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8-21$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu, ^b $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar trešo pēcooperācijas dienu attiecīgajā grupā (viena veida un divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA, *Newman-Keuls* tests).

3.4.2. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku ūsu kairinājuma izraisīto ķepu novietošanas testu

Abās VCAO grupās, 90 un 120 min., novēroja samazinātu sensori-motoro funkciju 3., 7. un 14. pēcooperācijas dienā (25. attēls, divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA apstiprināja galveno grupas [$F(2,38) = 7,804, p < 0,001$], dienas [$F(3,114) = 17,71, p < 0,0001$], kā arī grupas un dienas savstarpējās mijiedarbības efektu [$F(6,114) = 6,937, p < 0,0001$]). Tomēr efekti VCAO 90 un 120 min. žurku grupām savā starpā neatšķīrās nevienā no pārbaudītajām dienām. Sensori-motorā funkcija bija būtiski samazināta 90 min. oklūzijas grupā 3. pēcooperācijas dienā ($p < 0,001$), tomēr šis efekts nesaglabājās un ticami neatšķīrās no viltus operētās grupas 7. un 14. dienā pēc insulta. Kā parādīts 25. attēlā, 120 min. VCAO grupai novēroja būtiski

pasliktinātu sensori-motoro funkciju visās pēcoperācijas dienās, taču šai grupai arī novēroja būtisku atveseļošanās procesu, uzlabojoties sensori-motorajai funkcijai [$F(2,35) = 5,335, p < 0,01$], salīdzinot 3. un 7. pēcoperācijas dienu ($p < 0,05$) un 3. un 14. pēcoperācijas dienu ($p < 0,05$).

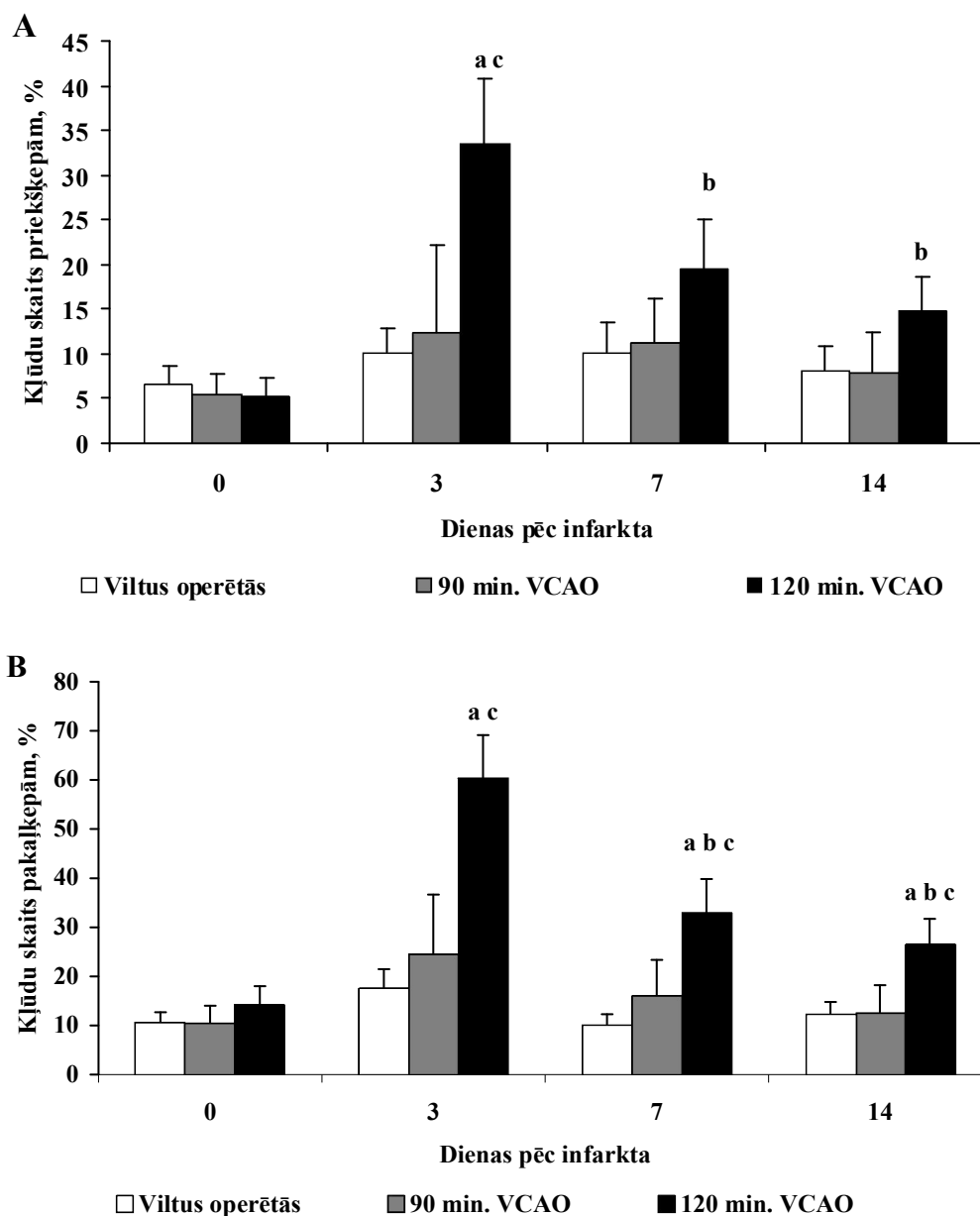


25. attēls. 90 un 120 min. VCAO ietekme uz sensori-motoro funkciju žurku ūsu kairinājuma izraisītajā ķepu novietošanas testā. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8-21$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu, ^b $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar trešo pēcoperācijas dienu attiecīgajā grupā (viena veida un divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA, *Newman-Keuls* tests).

3.4.3. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku pārvietošanās pa laipu testu

Pasliktināta sensori-motorā funkcija žurkām tika novērtēta 3., 7. un 14. pēcoperācijas dienā (26.A,B attēls). Pārvietošanās pa laipu testā iegūtie dati tika analizēti ar divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA testu. Apkopojot rezultātus, tika novērots ticami palielināts soļu kļūdu skaits pakalķepām, pārvietojoties pa laipu, salīdzinot 90 un 120 min. VCAO grupas un viltus operēto grupu (grupas [$F(1,18) = 8,964, p < 0,001$], dienas [$F(3,54) = 12,56, p < 0,0001$], grupas un dienas savstarpējās mijiedarbības efekts [$F(3,54) = 5,287, p < 0,001$]). Tomēr bojātai priekšķepai nebija būtiskas ietekmes uz soļu kļūdu skaitu, salīdzinot VCAO grupas dzīvniekus (26.A attēls, divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA, galvenais grupas efekts ($p > 0,05$); bija galvenais dienas efekts [$F(3,54) = 8,69, p < 0,0001$] un grupas un dienas

savstarpējās mijiedarbības efekts [$F(3,54) = 5,534, p < 0,05$]). Visos pārbaudītajos laika posmos tika konstatēta ticama atšķirība starp 90 un 120 min. VCAO grupām nepareizi noieto soļu skaitā ar bojātu pakalķepu. Turklāt ticama atšķirība noieto soļu skaitā ar bojātu priekšķepu ($p < 0,001$) starp 90 un 120 min. oklūzijas grupām tika novērota 3. pēcoperācijas dienā.

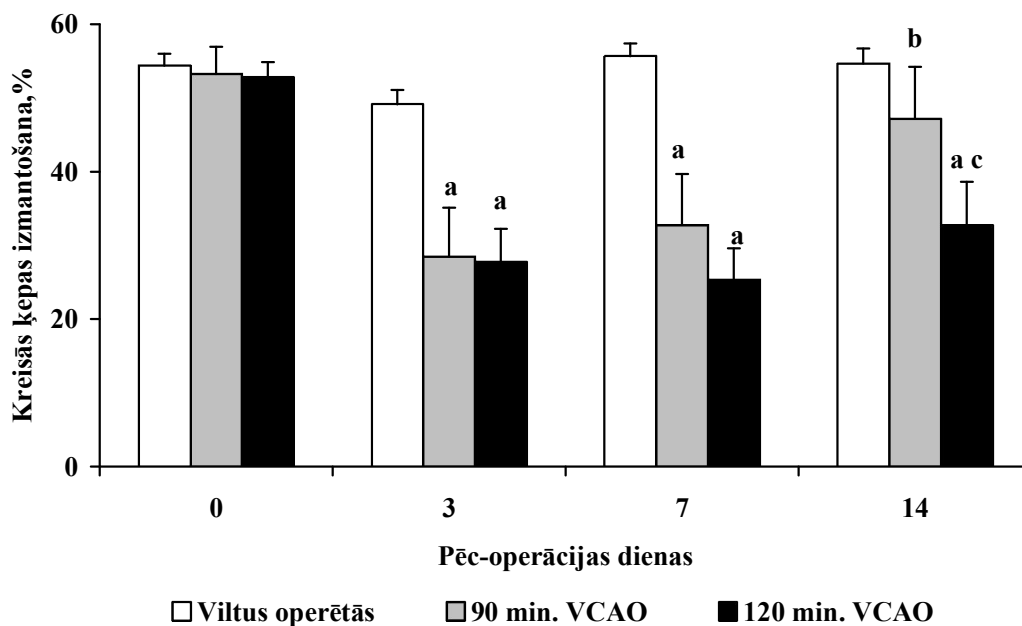


26. attēls. 90 un 120 min. VCAO ietekme uz žurku sensori-motoro funkciju priekšķepām (A) un pakalķepām (B) pārvietošanās pa laipu testā (kļūdu skaits, %). Kļūdu skaits izteikts kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8-21$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu, ^b $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar trešo pēcoperācijas dienu attiecīgajā grupā, ^c $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar 90 min. oklūzijas grupu grupā (viena veida un divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA, *Newman-Keuls* tests).

Pakaļķepu kļūdu skaits 120 min. VCAO grupai bija ticami pieaudzis, salīdzinot ar viltus operēto grupu katrā pārbaudītajā laika posmā ($p < 0,01$). Tomēr priekšķepu kļūdu skaits 120 min. oklūzijas grupai bija būtiski pieaudzis tikai 3. pēcoperācijas dienā, salīdzinot ar viltus operēto grupu [$F(2,35) = 5,16, p < 0,01$]. Sensori-motora funkciju atjaunošanās priekšķepām un pakaļķepām tika novērota 120 min. VCAO grupai starp 3. un 7. pēcoperācijas dienu un 3. un 14. pēcoperācijas dienu (26.A,B attēls, priekšķepām [$F(2,35) = 8,688, p < 0,001$] un pakaļķepām [$F(2,35) = 11,93, p < 0,0001$]). 90 min. oklūzijas žurku grupā ticami neatšķīrās kļūdu skaits bojātai priekšķepai un pakaļķepai no viltus operētās grupas.

3.4.4. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku uzvedību cilindra testā

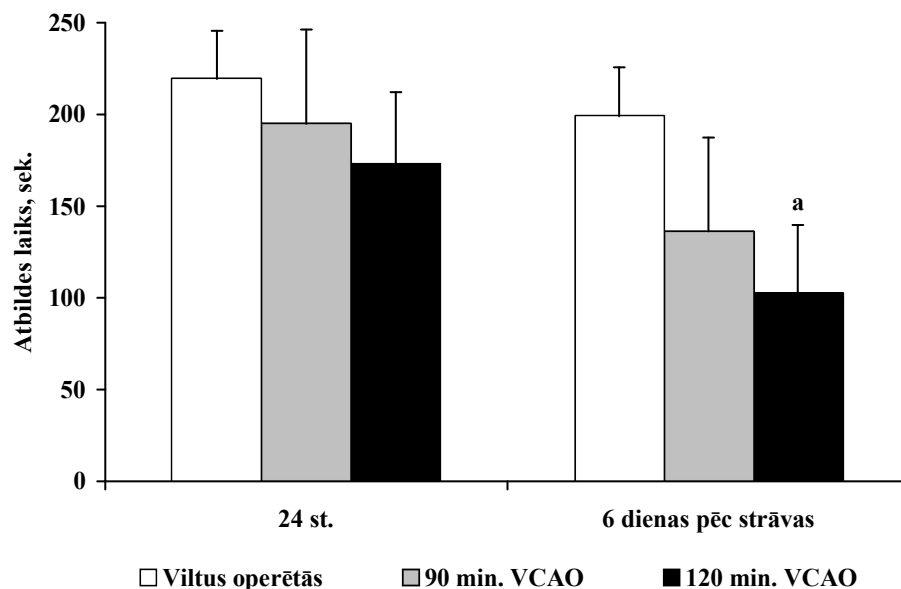
Izmantojot cilindra testā iegūtos datus (27. attēls), tika izvērtēta žurku priekšķepu asimetriska lietošana, kas bija ticami sliktāka gan pēc 90, gan pēc 120 min. VCAO (divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA apstiprināja galveno grupas [$F(2,38) = 16,70, p < 0,001$], dienas [$F(3,114) = 23,36, p < 0,001$], kā arī grupas un dienas savstarpējās mijiedarbības efektu [$F(3,114) = 7,125, p < 0,001$]). Kreisās priekšķepas izmantošana bija ticami samazināta 90 min. oklūzijas grupai 3. [$F(2,37) = 12,64, p < 0,0001$] un 7. [$F(2,37) = 23,35, p < 0,0001$] pēcoperācijas dienā, salīdzinot ar viltus operēto grupu. Savukārt 14. pēcoperācijas dienā kreisās priekšķepas izmantošana bija palielinājusies 90 min. VCAO grupā un būtiski neatšķīrās no viltus operētās grupas rādītājiem. Papildus tam dzīvnieki uzrādīja būtiskas atveseļošanās spējas bojātās kreisās priekšķepas izmantošanā [$F(2,24) = 11,05, p < 0,001$], salīdzinot 3. un 14. pēcoperācijas dienu. Kreisās bojātās priekšķepas izmantošana bija ticami samazinājusies 120 min. VCAO grupā gan 3. ($p < 0,0001$), gan 7. ($p < 0,0001$), gan arī 14. ($p < 0,001$) pēcoperācijas dienā, salīdzinot ar viltus operētās grupas žurkām. Netika novērots atveseļošanās process 120 min. oklūzijas grupai starp 3. un 7. un arī starp 3. un 14. pēcoperācijas dienu. Turklāt ticama atšķirība tika novērota starp 90 un 120 min. oklūzijas grupu kreisās priekšķepas izmantošanā ($p < 0,05$) 14. pēcoperācijas dienā.



27. attēls. **90 un 120 min. VCAO ietekme uz žurku priekšķepu izmantošanu cilindra testā.** Kreisās priekšķepas izmantošana cilindra testā tika aprēķināta, izmantojot formulu – (kreisā priekšķepe + 1/2 abas priekšķepas / visi soļi) × 100%. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 8–21); ^ap < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu, ^bp < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar trešo pēcoperācijas dienu attiecīgajā grupā, ^cp < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar 90 min. oklūzijas grupu grupā (viena veida un divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA, *Newman–Keuls* tests).

3.4.5. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme pasīvā nosacījuma refleksa testā

Pasīvā nosacījuma refleksa tests tika izmantots, lai pārbaudītu kontekstuālo atmiņu žurkām pēc insulta. Atbildes laiks PNR testā žurkām tika pārbaudīts 24 st. un 6 dienas pēc elektriskā kairinājuma saņemšanas dienas (6. pēcoperācijas dienā). 24 st. pēc kairinājuma saņemšanas atbildes laiks būtiski neatšķīrās starp viltus operēto (219 ± 26 sek.) un 90 min. (195 ± 51 sek.) un 120 min. (173 ± 39 sek.) VCAO grupu. Kā redzams 28. attēlā, atbildes laiks bija ticami samazinājies 120 min. oklūzijas grupas dzīvniekiem (103 ± 37 sek.) 6 dienas pēc kairinājuma saņemšanas, salīdzinot ar viltus operēto grupu (199 ± 27 sek.) [$F(2,37) = 2,801, p < 0,05$]. Atbildes laiks neatšķīrās starp viltus operēto, 90 un 120 min. VCAO grupu kairinājuma saņemšanas dienā (dati nav parādīti).



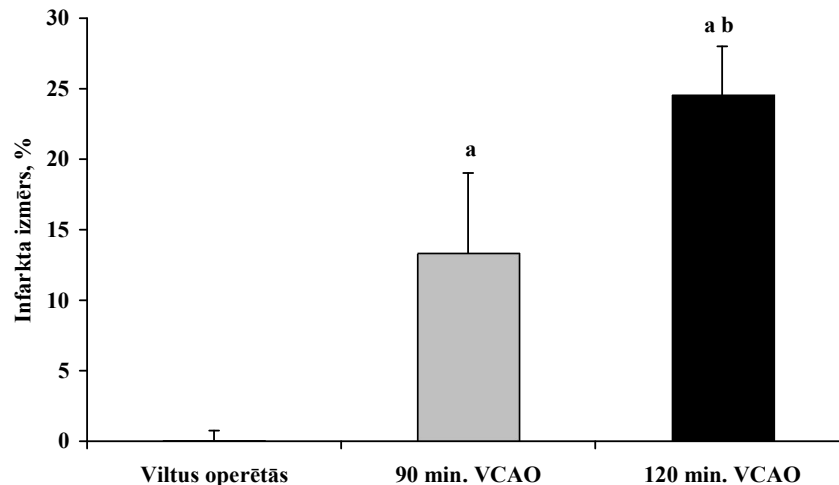
28. attēls. Atbildes laiks PNR testā pēc 90 un 120 min. VCAO žurkām. Atbildes laiks tika noteikts 24 stundas un 6 dienas pēc strāvas kairinājuma saņemšanas. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8-21$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman-Keuls* tests).

3.4.6. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz darbības atmiņas novērtēšanas testu

Darbības atmiņa un izpētes aktivitāte žurkām tika pārbaudīta Y veida labirintā. Viltus operētajai grupai pareizi veikta ejas izvēle bija 64% Y veida labirinta testā. Iegūtie rezultāti norādīja, ka pēc VCAO žurkām nenovēroja pasliktinātu darbības atmiņu 90 (73%) un 120 min. (63%) oklūzijas grupām, salīdzinājumā ar viltus operēto grupu (dati nav parādīti).

3.4.7. Infarkta izmērs

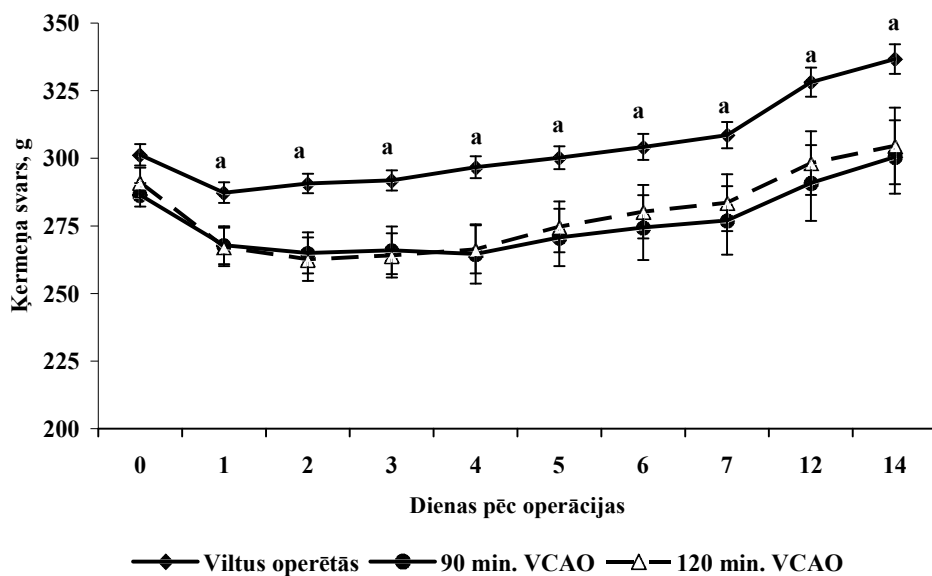
Bojāto audu izmērs tika noteikts visu VCAO operēto žurku smadzeņu audos. Smadzeņu bojājumi tika lokalizēti smadzeņu garozā un *striatum* 14. dienā pēc pārejošās 90 un 120 min. VCAO. 90 min. oklūzijas grupai infarkta izmērs bija 13%, 120 min. infarkta grupas dzīvniekiem infarkta izmērs bija 25%. Tika atrasta ticama atšķirība infarkta izmēram, salīdzinot VCAO grupas un viltus operēto grupu [$F(3,27) = 3,887$, $p < 0,02$]. Turklāt novēroja būtisku atšķirību infarkta izmēram ($p < 0,05$) starp 120 min. un 90 min. oklūzijas grupām (29. attēls).



29. attēls. **Infarkta izmērs pēc 90 un 120 min. VCAO žurkām.** Infarkta izmērs (%) attēlots kā veselo audu daudzums infarkta smadzeņu puslodē (ipsilaterālajā), salīdzinot ar veselo audu daudzumu kontralaterālajā puslodē. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8-21$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu, ^b $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar 90 min. oklūzijas grupu (viena veida ANOVA un sekojošais Dunetta tests).

3.4.8. Vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas ilguma ietekme uz žurku ķermeņa svaru

Žurku ķermeņa svars eksperimenta laikā būtiski samazinājās VCAO grupām salīdzinājumā ar viltus operēto grupu (divvirziena atkārtotu mērījumu ANOVA, galvenais grupas efekts [$F(2,38) = 6,55, p < 0,001$] un dienas efekts [$F(9,342) = 41,15, p < 0,0001$]; grupas un dienas savstarpējā mijiedarbība nav būtiska). Nebija nekādas būtiskas atšķirības ķermeņa svaram starp 90 un 120 min. (30. attēls). VCAO grupām. Šajā eksperimentā ķermeņa svara zudums tika novērots 1–3 pēcoperācijas dienai, pēc kurām svars sāka palielināties.

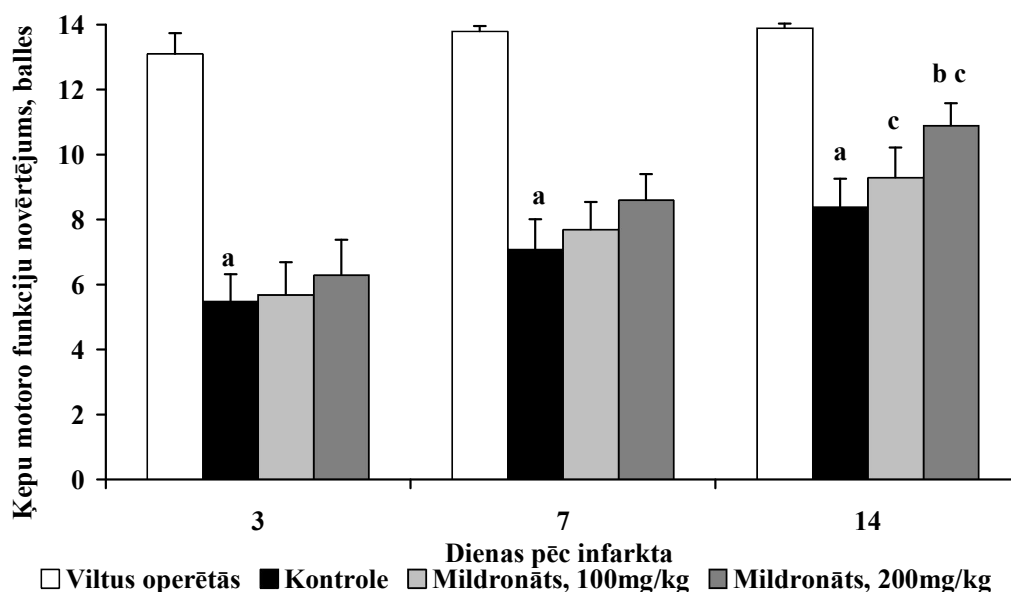


30. attēls. **Ķermeņa svars pēc 90 un 120 min. VCAO žurkām.** Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 8-21$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman-Keuls* tests).

3.5. Mildronāta ietekme uz vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas izraisītiem bojājumiem žurkām

3.5.1. Mildronāta ietekme uz žurku ķepu taktilo funkciju

Ķepu novietošanas tests tika izmantots pakalējo un priekšējo ķepu taktilo un proprioceptīvo stimulu izmaiņu izvērtēšanai pēc infarkta. Kā redzams 31. attēlā, kontroles dzīvniekiem novēro ievērojamu ķepu taktilo un proprioceptīvo stimulu traucējumus 3., 7. un 14. dienā pēc operācijas salīdzinājumā ar viltus operēto grupu [$F(5,42) = 30,72, p < 0,0001$]. Kontroles grupā ir šādi rādītāji: 3. dienā 5,5 balles, 7. dienā 7,1 un 14. dienā 8,4 balles no maksimāli 14 iespējamām. Mildronāta terapija devā 200 mg/kg ievērojami uzlaboja ķepu taktilo un proprioceptīvo darbību 14. dienā pēc operācijas par 30%, salīdzinot ar kontroles grupu [$F(3,27) = 12,07, p < 0,05$]. Turklāt žurkām, kuras saņēma mildronātu injekcijas, novēroja būtisku atveseļošanās procesu grupas ietvaros [$F(2,24) = 6,872, p < 0,01$], salīdzinot 3. ar 14. pēcoperācijas dienu, respektīvi, $6,3 \pm 1,1$ un $10,9 \pm 0,7$ (skatīt 31. attēlu).



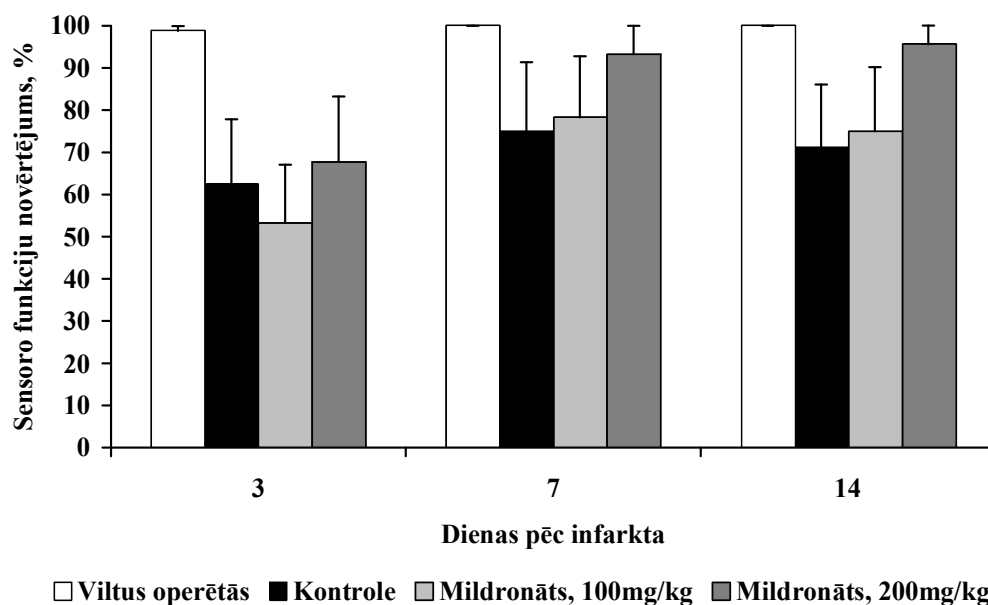
31. attēls. **Mildronāta (100 un 200 mg/kg) terapijas ietekme uz žurku ķepu motoro funkciju pakaļējo un priekšējo ķepu novietošanas testā pēc VCAO.** Oklūzija veikta 90 min. Rezultāti parādīti kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 6-8$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu, ^b $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu, ^c $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar trešo pēcoperācijas dienu attiecīgajā grupā (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman-Keuls* tests).

Kā redzams 31. attēlā, mildronāts devā 100 mg/kg neizraisīja ķepu taktilo un proprioceptīvo stimulu izmaiņas, salīdzinot ar kontroles grupu, lai gan šajā grupā novēroja ievērojamu atveseļošanās procesu grupas ietvaros [$F(2,18) = 3,991$, $p < 0,05$], salīdzinot 3. ar 14. pēcoperācijas dienu, attiecīgi $5,7 \pm 1$ un $9,3 \pm 0,8$.

3.5.2. Mildronāta ietekme uz žurku sensori-motoro funkciju

Sensori-motoro funkciju izvērtēšanai izmantoja žurku ūsu kairinājuma izsaukto ķepu novietošanas testu. Kā redzams 32. attēlā, kontroles grupai novēroja sensori-motorās funkcijas bojājumus 3., 7. un 14. pēcoperācijas dienā, attiecīgi $63 \pm 15\%$, $75 \pm 16\%$ un $71 \pm 15\%$. Mildronāts devā 200 mg/kg neuzrādīja ietekmi uz sensori-motoro funkciju, jo pēc mildronāta ievadīšanas tā ievērojami neatšķīrās no kontroles grupas un rezultāti bija līdzīgi ar viltus operēto grupu, attiecīgi 93% un 96% 7. un 14. pēcoperācijas dienā. Tomēr būtiski uzlabojumi dzīvnieku grupā, kura saņēma mildronātu devā 200 mg/kg tika atrasti, salīdzinot 3. un 14. dienu, attiecīgi

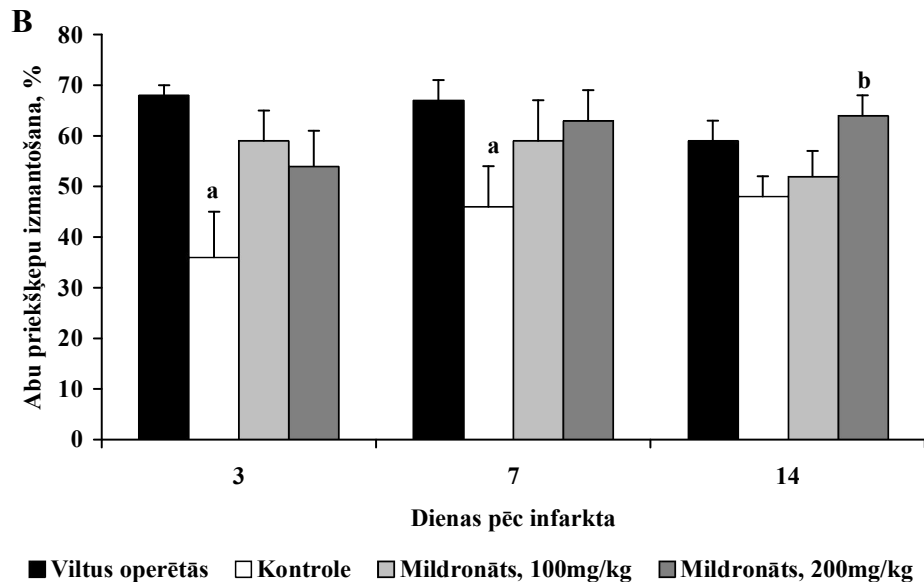
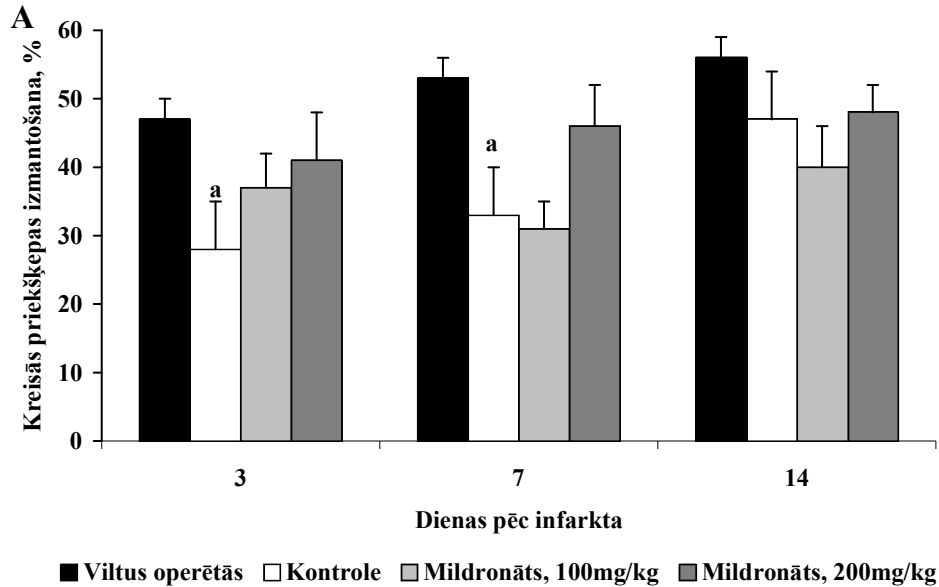
68% un 96%. Mildronāts devā 100 mg/kg neizraisīja būtiskas izmaiņas žurku sensori motorajās funkcijās, salīdzinot ar kontroles grupu (32. attēls).



32. attēls. Sensori-motora funkciju novērtējums žurku ūsu kairinājuma izsuktajā ķepu novietošanas testā pēc mildronāta terapijas. Oklūzija veikta 90 min. Mildronāts tika injicēts devās 100 un 200 mg/kg. Vērtības izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. ($n = 6-8$).

3.5.3. Mildronāta ietekme uz žurku ķepu motoro darbību

Lai novērtētu motorās darbības traucējumus, tika izmantots cilindra jeb žurku ķepu izmantošanas asimetrijas tests. Kreisās priekšķepas izmantošana cilindra testā būtiski bija samazinājusies kontroles grupā 3. dienā [$F(3,27) = 2,152, p < 0,05$] un 7. dienā [$F(3,27) = 4,549, p < 0,05$] pēc operācijas, attiecīgi par 39% un 38%, salīdzinot ar viltus operēto dzīvnieku grupu. Tomēr 14. dienā pēc VCAO starp kontroles un viltus operēto dzīvnieku grupu atšķirības kreisās priekšķepas izmantošanā nebija novērojamas. Septītajā dienā pēc operācijas 200 mg/kg mildronāta grupai bija novērojami uzlabojumi kreisās priekšķepas izmantošanā (46%), bet šie rezultāti būtiski neatšķīrās no kontroles grupas. Mildronāta terapija devā 100 mg/kg būtiski neietekmēja kreisās priekšķepas izmantošanu cilindra testā (33.A attēls).



33. attēls. **Mildronāta ietekme devās 100 un 200 mg/kg uz žurku motoro funkciju cilindra testā pēc VCAO.** (A) Kreisās priekšķeņas izmantošana cilindra testā tika aprēķināta, izmantojot formulu – (kreisā priekšķeņa + 1/2 abas priekšķeņas / visi soļi) × 100%. (B) Abu priekšķeņu izmantošana tika aprēķināta pēc formulas – (abas priekšķeņas / visi soļi) × 100%. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 6–8); ^ap < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu, ^bp < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar trešo pēcoperācijas dienu attiecīgajā grupā (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman–Keuls* tests).

Kā redzams 33.B attēlā, abu priekšķeņu izmantošana cilindra testā ievērojami bija samazinājusies kontrolē grupā pēcoperācijas 3. [$F(3,27) = 3,887, p < 0,02$] un 7. [$F(3,27) = 1,487, p < 0,05$] dienā, attiecīgi 47% un 45% ($p < 0,05$), salīdzinot ar viltus

operēto dzīvnieku grupu. Lai gan 14. pēcoperācijas dienā kontroles grupai tika novērota samazināta abu priekšķepu izmantošana, tomēr rezultāti ticami neatšķīrās, salīdzinot ar viltus operēto dzīvnieku grupu. 200 mg/kg mildronāta grupai novēroja pastiprinātu abu priekšķepu izmantošanu, salīdzinot ar kontroles grupu, it īpaši 14. pēcoperācijas dienā, tā uzlabojās par 34%, rezultāti ticami atšķiras [$F(3,27) = 2,97, p < 0,05$]. Turklāt 14. dienā pēc operācijas 200 mg/kg mildronāta grupai abu ķepu lietojums žurkām bija līdzīgs ar viltus operēto grupu rezultātiem. 100 mg/kg mildronāta grupā nenovēroja samazinātu abu priekšķepu izmantošanu pēcoperācijas periodā, jo īpaši 3. un 7. dienā, salīdzinot ar kontroles grupu (33.B attēls), bet mildronāta efekti devās 100 mg/kg un 200 mg/kg savā starpā neatšķīrās.

3.5.4. Mildronāta ietekme uz žurku priekšējo un pakaļējo ķepu sensori-motoro funkciju

Pārvietošanās pa laipu tests tika izmantots, lai novērtētu žurku priekšējo un pakaļējo ķepu sensori-motoros traucējumus pēc VCAO. Kontroles grupas dzīvniekiem ir palielināts nepareizi noieto soļu skaits gan priekšķepām, gan pakaļķepām, salīdzinot ar viltus operēto dzīvnieku grupu, attiecīgi 25% un 23%, šie rezultāti būtiski neatšķiras (5. tabula). Pēc mildronāta ievadīšanas 100 un 200 mg/kg devās nenovēroja būtiski uzlabotu sensori-motoro funkciju visā pēcoperācijas periodā, salīdzinot ar kontroles grupu (5. tabula).

5. tabula. Mildronāta (100 un 200 mg/kg) ietekme uz žurku sensori-motoro funkciju pārvietošanās pa laipu testā (kļūdu skaits, %)

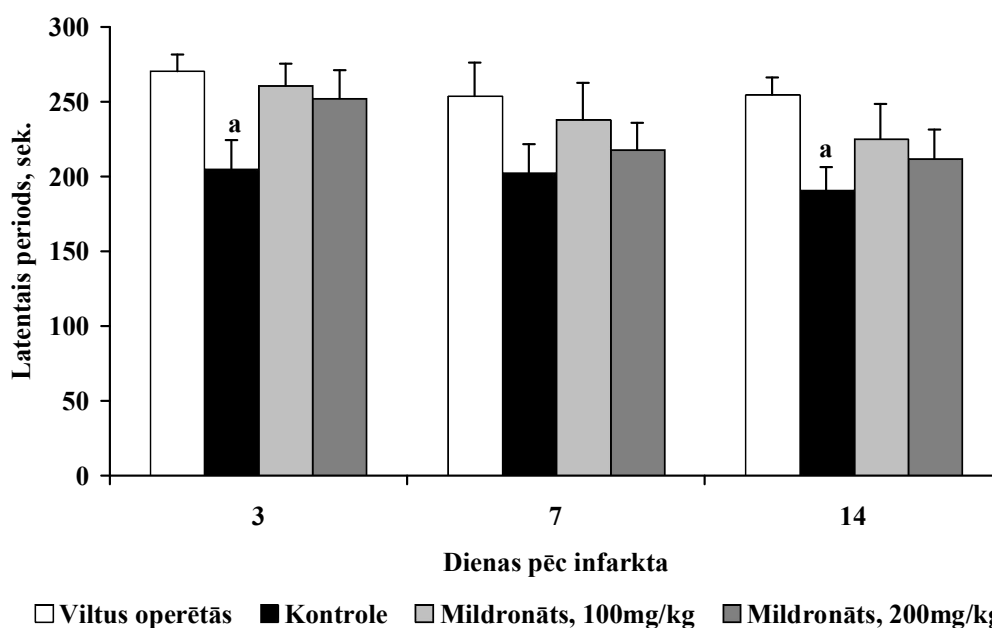
Grupas	Priekšķepas			Pakaļķepas		
	3. diena	7. diena	14. diena	3. diena	7. diena	14.diena
Viltus operētās	7±4	18±4	17±3	19±3	18±3	18±3
Kontrole	25±6	23±4	20±3	23±6	24±3	19±3
Mildronāts 100 mg/kg	25±5	21±4	15±3	24±5	23±2	18±3
Mildronāts 200 mg/kg	25±2	18±3	17±3 ^a	22±4	16±3	17±3

Žurku priekšķepu un pakaļķepu sensori-motorie traucējumi pēc VCAO. Oklūzija veikta 90 min. Iegūtie dati tika analizēti, izmantojot aprēķinu: kļūdu skaits/kopējais soļu skaits. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 6–8); ^ap < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar trešo pēcoperācijas dienu attiecīgajā grupā (viena veida ANOVA un sekojošais Newman–Keuls tests).

Kā redzams 5. tabulā, 200 mg/kg mildronāta grupai novēroja statistiski ticamu atveseļošanās gaitu priekšķepām [$F(2,24) = 3,435, p < 0,05$] (3. pret 14. pēcoperācijas dienu), attiecīgi kļūdu skaits priekšķepām samazinājās no 25% līdz 17%. Devā 100 mg/kg mildronāts neizraisīja ticamu atveseļošanos (skatīt 5. tabulu).

3.5.5. Mildronāta ietekme uz žurku kustību koordināciju

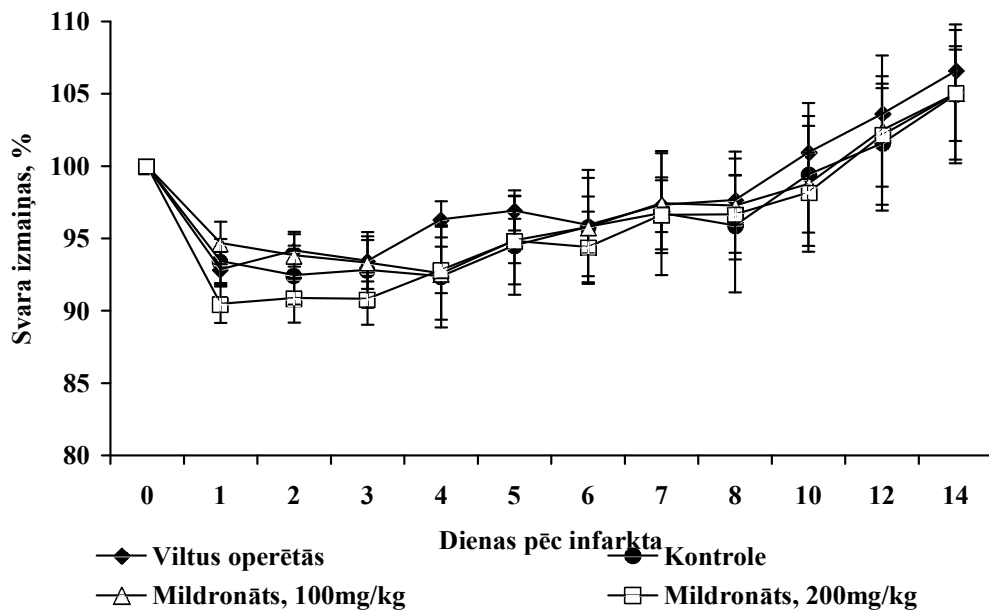
Žurku kustību koordinācija tika novērtēta ar rotējošā stieņa testu. Kā redzams 34. attēlā, viltus operētās grupas žurkām vidējais pārvietošanas laiks rotējošā stieņa testā bija 266 ± 10 sek. 3. pēcoperācijas dienā. Kontroles grupas dzīvniekiem samazinātu kustību koordināciju novēroja visā pēcoperācijas periodā. Rezultāti ticami atšķīrās, salīdzinot ar viltus operēto grupu, 3. [$F(3,27) = 2,886, p < 0,05$] un 14. [$F(3,27) = 2,573, p < 0,05$] pēcoperācijas dienā, attiecīgi 205 ± 19 sek. un 191 ± 15 sek. Savukārt 100 mg/kg un 200 mg/kg mildronāta grupu dzīvnieku rezultāti neatšķīrās no viltus operēto dzīvnieku grupas, bija līdzīga ar viltus operēto grupu rezultātiem. Mildronāta grupas no kontroles grupas neatšķīrās.



34. attēls. **Žurku kustību koordinācijas un motoro funkciju novērtēšana rotējošā stieņa testā pēc mildronāta injekcijām 100 un 200 mg/kg.** Oklūzija veikta 90 min. Latentais periods (sek.) tika izteikts kā vidējais lielums \pm S.E.M. ($n = 6-8$); ^a $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar viltus operēto grupu (viena veida ANOVA un sekojošais *Newman-Keuls* tests).

3.5.6. Dzīvnieku svara izmaiņas pēc insulta radītajiem bojājumiem

Dzīvnieku svars tika reģistrēts no 0. līdz 14. dienai pēc VCAO operācijas. Kā redzams 35. attēlā, svara samazināšanās bija novērojama visās grupās 1. dienā pēc operācijas. Būtiskas svara pieauguma izmaiņas starp kontroles dzīvnieku grupu un 100 un 200 mg/kg mildronāta dzīvnieku grupām nebija novērojamas. Mildronāta terapijas 200 mg/kg 14. dienā dzīvnieku svars sasniedza vidēji 311 g, savukārt kontroles dzīvnieku grupā – 314 g.



35. attēls. **Žurku svars pēcoperācijas periodā.** Oklūzija veikta 90 min. Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība \pm S.E.M. (n = 6–8).

Svara pieaugums no 2. dienas pēc operācijas bija novērojams visās dzīvnieka grupās, taču vislielākais svara pieaugums līdz pat 14. dienai bija vērojams viltus operēto dzīvnieku grupā.

3.5.7. Smadzeņu insulta radīto bojājumu histoloģiskā atradne

Insulta vizualizēšanai izmantotie smadzeņu audi pēc uzņemtajām fotogrāfijām un veiktajiem aprēķiniem ļāva noteikt insulta izmēru ipsilaterālajā smadzeņu puslodē salīdzinājumā pret veselo audu daudzumu kontralaterālajā puslodē.

14. dienā pēc VCAO visām dzīvnieku grupām tika noteikts smadzeņu insulta radīto bojājumu lielums. Kontroles grupā pēc 90 min. VCAO insulta lielums bija $13 \pm$

4,6%. Savukārt mildronāta terapija (100 un 200 mg/kg) būtiski neietekmēja insulta izmēra lielumu, tas bija attiecīgi $15 \pm 2,6\%$ un $18 \pm 6,2\%$.

3.6. Mildronāta ietekme uz smadzeņu mitohondriju funkciju normoksijas apstākļos un pēc anoksijas-reoksigenācijas

3.6.1. Mildronāta ietekme uz acil-karnitīnu koncentrāciju smadzeņu audos

Tā kā zināms, ka mildronāta ievadīšanas rezultātā samazinās karnitīna koncentrācija smadzeņu audos, tika pārbaudīts, vai mildronāts ietekmē acil-karnitīnu (C2-C18) koncentrāciju audos.

6. tabula. Mildronāta divu nedēļu ievadīšanas ietekme uz acil-karnitīna profilu un acil-KoA koncentrāciju smadzeņu audos

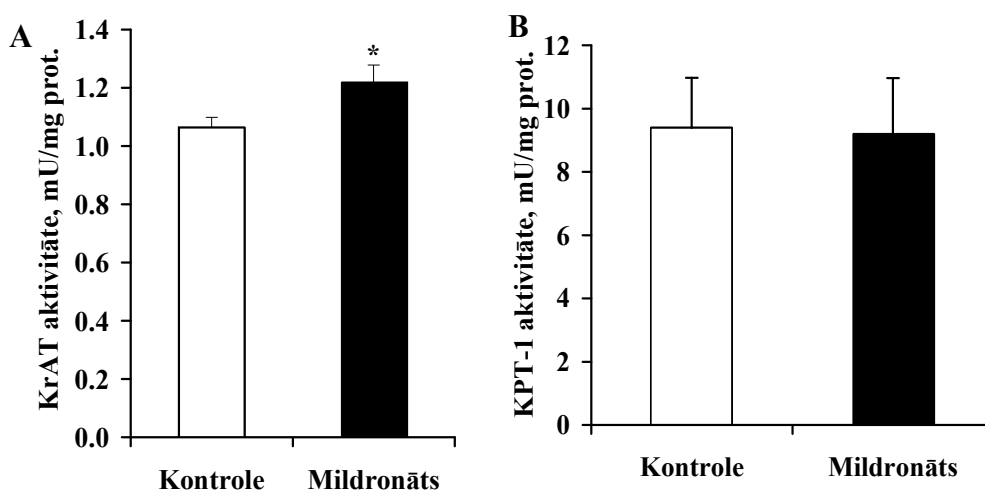
	Kontrole	Mildronāts
Īsķēžu acil-karnitīni		
Acetil-karnitīns (C2), pmol/g smadzeņu audu	1999 ± 306	814 ± 162*
Butiril-karnitīns (C4), pmol/g smadzeņu audu	1075 ± 110	382 ± 74*
Vidēja garuma ķēdes acil-karnitīni		
Heksanoil-karnitīns (C6), pmol/g smadzeņu audu	53 ± 6	13 ± 3*
Dekanoil-karnitīns (C10), pmol/g smadzeņu audu	5,4 ± 0,5	2,8 ± 0,4*
Lauroil-karnitīns (C12), pmol/g smadzeņu audu	52 ± 4	35 ± 3*
Garķēžu acil-karnitīni		
Miristoil-karnitīns (C14), pmol/g smadzeņu audu	269 ± 16	208 ± 11*
Palmitoil-karnitīns (C16), pmol/g smadzeņu audu	533 ± 28	500 ± 38
Stearoil-karnitīns (C18), pmol/g smadzeņu audu	13 ± 1	10 ± 1*
AK:BK attiecība	9,7 ± 1,0	9,8 ± 1,0
Acil-KoA, pmol/g smadzeņu audu	240 ± 17	303 ± 18*
Brīvais KoA, pmol/g smadzeņu audu	205 ± 15	219 ± 21

Mildronāta efekts uz acil-karnitīna profilu un acil-KoA koncentrāciju smadzeņu audos. AK-acil-karnitīns, BK-brīvais karnitīns. Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 6); *p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu (Stjudenta *t*-tests).

Pēc 14 dienu ilgas mildronāta *p.o.* ievadīšanas devā 100 mg/kg C2-C18 acil-karnitīnu koncentrācijas smadzeņu audos bija ticami samazinātas (6. tabula). Mildronāta ievadīšanas rezultātā ievērojami bija samazinājušās acetil-, butiril- un heksanoil-karnitīnu koncentrācijas (par 59%, 64% un 76% attiecīgi), kamēr C12-C18 acil-karnitīnu koncentrācijas bija samazinātas vidēji tikai par 20%. Netika novērota acil-karnitīna un brīvā karnitīna attiecību (AK:BK) atšķirība starp kontroles un mildronāta grupām, bet acil-KoA koncentrācija bija ticami paaugstināta par 27% (6. tabula).

3.6.2. Mildronāta ietekme uz karnitīna acetiltransferāzes un palmitoiltransferāzes 1 aktivitāti smadzeņu audos

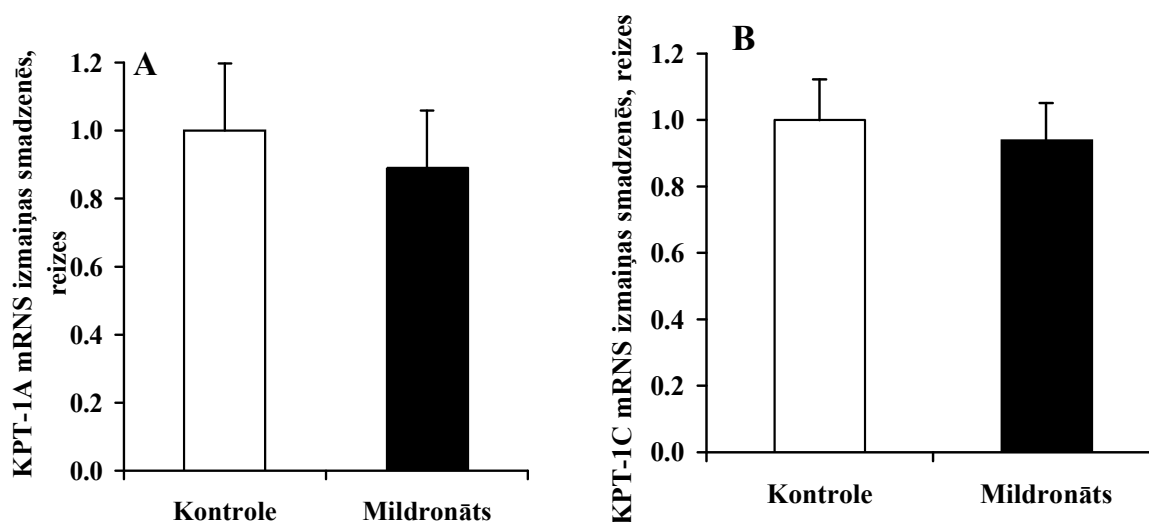
Tā kā mildronāta hroniskas ievadīšanas rezultātā samazinās karnitīna koncentrācija smadzeņu audos, tika pārbaudīts, vai karnitīna biopieejamības samazinājums ietekmē no karnitīna atkarīgo enzīmu KrAt un KPT-1 aktivitāti (36. A,B attēls). KrAT aktivitāte tika noteikta izolētos žurku smadzeņu mitohondrijos, normoksijas apstākļos pēc 14 dienu mildronāta vadīšanas *p.o.* (100 mg/kg). Kā redzams 36. A attēlā, KrAT aktivitāte bija ticami palielināta par 15%, bet KPT-1 aktivitāte nebija izmainīta, salīdzinot ar kontroles grupu.



36. attēls. Mildronāta 14 dienu ievadīšanas ietekme uz karnitīna acetiltransferāzes (KrAT) aktivitāti (A). Karnitīna palmitotranferāzes (KPT-1) aktivitāte pēc mildronāta 14 dienu ievadīšanas (B). Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 6); *p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu (Stjūdentā *t*-tests).

3.6.3. Mildronāta ietekme uz karnitīna palmitoiltransferāzes gēnu ekspresiju smadzeņu audos

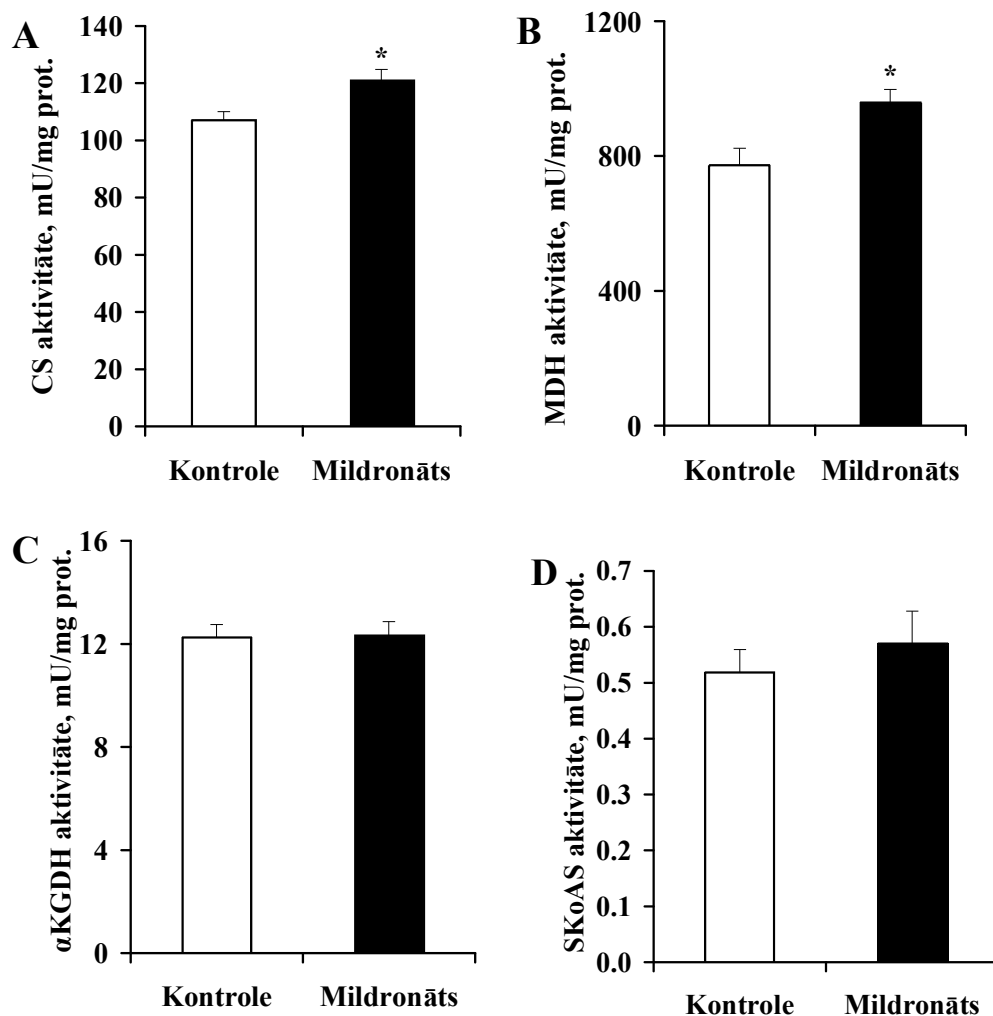
Tika noteikts KPT-1 gēnu mRNS daudzums smadzeņu audos pēc karnitīna koncentrācijas samazinājuma, izmantojot mildronāta ievadīšanu. Kā redzams 37.A,B attēlā, tad hroniska mildronāta ievadīšana neietekmēja KPT-1A un KPT-1C gēnu mRNS daudzumu smadzeņu audos.



37. attēls. Mildronāta 14 dienu ievadīšanas ietekme uz karnitīna palmitotranferāzes gēnu ekspresiju smadzeņu audos: A – KPT-1A (aknu tips) un (B) – KPT-1C (smadzeņu tips). Mērījumu vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. (n = 5)

3.6.4. Mildronāta ietekme uz Krebsa cikla enzīmu aktivitāti smadzeņu audos

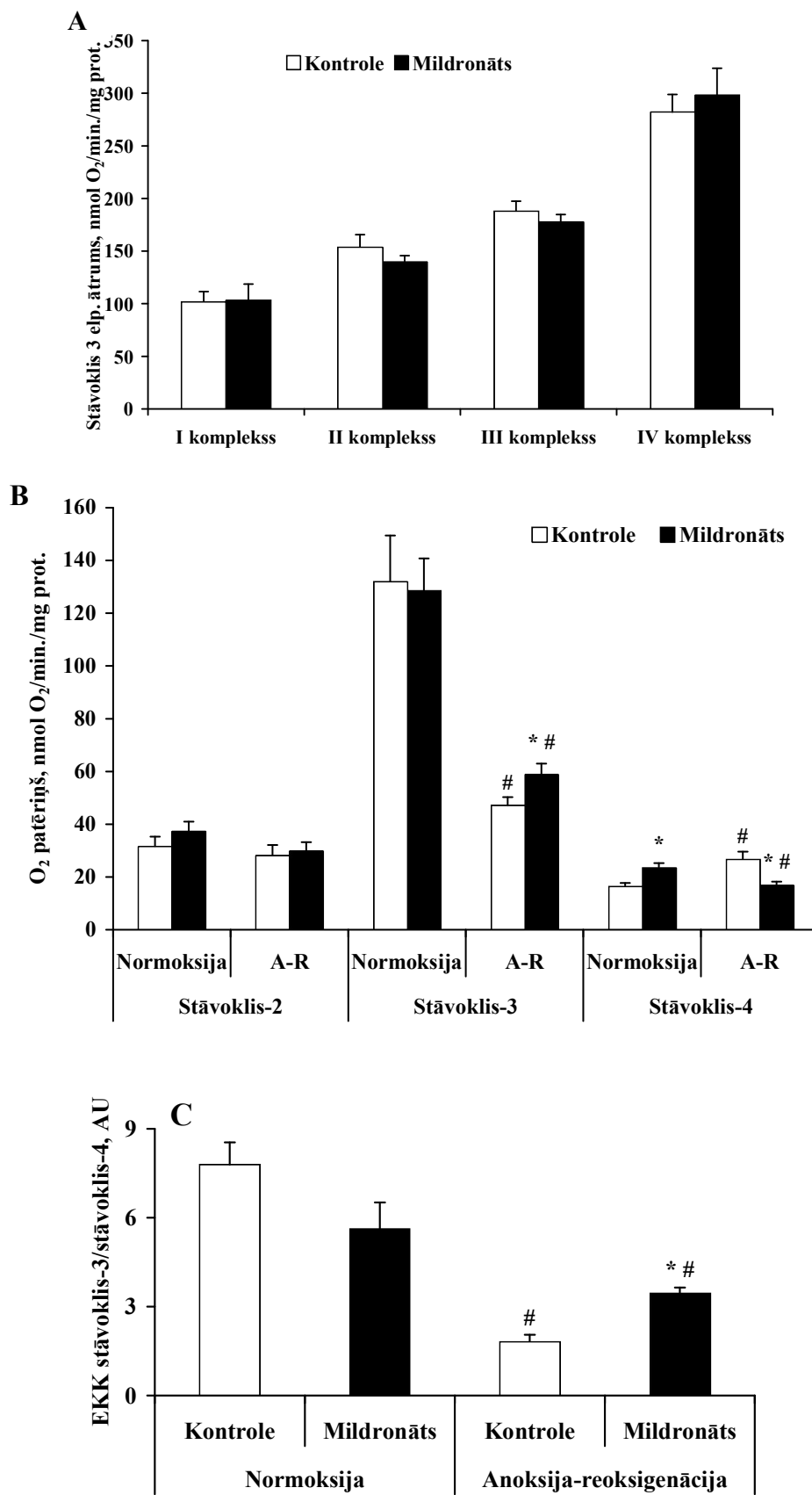
Lai noteiktu, kā karnitīna biopieejamības samazinājums smadzeņu audos ietekmē mitohondriju katabolismu, tika veikti Krebsa cikla enzīmu aktivitātes mērījumi izolētos smadzeņu mitohondrijos pēc 14 dienu mildronāta ievadīšanas devā 100 mg/kg. Mildronāta ievadīšanas rezultātā malātdehidrogenāzes un citrātsintāzes aktivitāte smadzeņu mitohondrijos bija ticami palielināta attiecīgi par 24% un 13%, salīdzinot ar kontroli (38.A,B attēls). Mildronāta ievadīšana neietekmēja α -ketoglutarātdehidrogenāzes un sukcinil-KoA sintēzes aktivitāti, tā bija vienāda ar kontroles grupas mērījumiem (38.C, D attēls).



38. attēls. Mildronāta 14 dienu ievadišanas ietekme uz Krebsa cikla enzīmu aktivitāti. A – citrātsintāze (CS), B – malātdehidrogenāzes (MDH), C – α -ketoglutarātdehidrogenāzes (α KGDH), D – sukcinil-KoA sintēze (SKoAS). Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi \pm S.E.M. (n = 6); *p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu (Stjūdenta *t*-tests).

3.6.5. Mildronāta ietekme uz smadzeņu mitohondriju elpošanu normoksijā un pēc anoksijas-reoksigenācijas

Pēc hroniskas mildronāta ievadišanas tika novērota samazināta karnitīna koncentrācija smadzeņu audos, kas var ietekmēt mitohondriju elpošanas ķēdes funkcionēšanu, tāpēc tika veikti mitohondriju skābekļa patēriņa eksperimenti (39. attēls). Mildronāta ievadišanas rezultātā netika ietekmēts stāvoklis-3 nevienā no elpošanas kompleksiem (39.A attēls). Tomēr pēc mildronāta ievadišanas stāvoklī-4 normoksijas apstākļos skābekļa patēriņš bija pieaudzis par 30%, kā rezultātā nedaudz pazeminājās EKK vērtība (39.B,C attēls).



39. attēls. Mildronāta 2 nedēļu ievadišanas ietekme uz izolētu smadzeņu mitohondriju elpošanu. A – stāvokļa-3 (ADF stimulētā elpošana) elpošanas ātrums

normoksiska apstākļos. B – skābekļa patēriņa ātrums normoksijas apstākļos pēc anoksijas-reoksigenācijas un C – elpošanas kontroles koeficients (EKK, stāvoklis-3/stāvokli-4) normoksijas apstākļos pēc anoksijas-reoksigenācijas (A-R). Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 6); *p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar atbilstošo kontroles grupu. #p < 0,05 statistiski ticami, salīdzinot ar atbilstošo normoksijas grupu (viena veida ANOVA un sekojošu *Kruskal-Wallis* testu).

Kā var redzēt 39.B attēlā, anoksija-reoksigenācija kontroles smadzeņu mitohondrijiem izraisīja skābekļa patēriņa samazinājumu stāvoklī-3 par 2,8 reizēm un stāvoklī-4 skābekļa patēriņa pieaugumu par 1,6 reizēm. Līdz ar to anoksijas-reoksigenācijas rezultātā tika 4,2 reizes samazināta EKK vērtība, salīdzinot ar normoksijas kontroli. Pēc ilgstošas mildronāta ievadīšanas devā 100 mg/kg tika ticami samazināti anoksijas-reoksigenācijas izraisītie bojājumi stāvokļa-3 un stāvokļa-4 gadījumā. Kā redzams 39.B attēlā, pēc anoksijas-reoksigenācijas stāvokļa-3 skābekļa patēriņš mildronāta grupā bija ticami lielāks un stāvokļa-4 gadījumā ticami zemāks, salīdzinot ar kontroles grupas radītājiem. EKK vērtība pēc anoksijas-reoksigenācijas bija gandrīz 2 reizes lielāka mildronātu grupā, salīdzinot ar kontroles grupu pēc anoksijas-reoksigenācijas, un ticami atšķīrās (39.C attēls).

3.6.7. Mildronāta ietekme uz adenozīna trifosfātu koncentrāciju

Smadzeņu audos un izolētos mitohondrijos normoksijas apstākļos ATF koncentrācija pēc mildronāta ilgstošas lietošanas nebija izmainīta un bija līdzīga ar kontroles grupu (7. tabula). Pēc anoksijas-reoksigenācijas ATF koncentrācija izolētos mitohondrijos mildronāta grupā neatšķīrās no kontroles grupas (7. tabula).

7. tabula. ATF koncentrācija smadzeņu audos un izolētos mitohondrijos pēc mildronāta 14 dienu ievadīšanas

	Kontrole	Mildronāts
ATF, μmol/g smadzeņu audu	12,6 ± 2,1	13,0 ± 3,0
Izolēti mitohondriji, nmol/mg prot.		
Normoksija	112 ± 1	127 ± 5
Pēc anoksijas- reoksigenācijas	45 ± 3	53 ± 2

Vērtības tika izteiktas kā vidējie lielumi ± S.E.M. (n = 4).

4. DISKUSIJA

Promocijas darbā pētīta karnitīna koncentrācijas izmaiņu neirotropā ietekme, kā farmakoloģisko aģentu izmantojot karnitīna biosintēzes un transporta inhibitoru mildronātu. Pētījumā tika raksturota karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz žurku tēviņu seksuālo aktivitāti, atveseļošanās procesiem pēc smadzeņu išēmijas un smadzeņu mitohondriju funkcionēšanu, kā arī pētīti mildronāta iespējamie darbības mehānismi CNS.

4.1. Mildronāta neirotropā darbība akūtas ievadīšanas gadījumā

Pētījumā parādīti mildronāta neirotropie efekti akūtas ievadīšanas gadījumā PTZ izraisīto krampju un alkohola inducēto smadzeņu darbības traucējumu peļu eksperimentālajos modeļos. Mildronātam novēroja pretkrampju efektu PTZ izraisītajā krampju testā (17. attēls), kā arī samazinātu etanola izraisīto „pārvelšanās” refleksa zudumu hipnotiskās darbības testā (18. attēls). Turklāt mildronāts daļēji kavēja etanola izraisīto asins plūsmas samazinājumu smadzeņu garozā (19. attēls), kā arī mazināja īslaicīgas CCA oklūzijas izraisītā skābekļa piesātinājuma un asiņu plūsmu izmaiņas (20. attēls).

Ķīmisko konvulsantu izmantošanai eksperimentālajos dzīvnieku modeļos ir nozīmīga loma, lai izprastu epilepsijas mehānismus, cēloņus un sekas, kā arī meklētu līdzekļus tās ārstēšanai. Viens no ķīmiskajiem konvulsantiem ir PTZ, ko plaši izmanto dažādu epilepsijas veidu modelēšanai (Smeland *et.al.*, 2012), kā arī lai pārbaudītu potenciālos zāļu līdzekļus. PTZ darbības mehānisms ir tikai daļēji noskaidrots. Uzskata, ka PTZ ar piritoksīnu konkurē par saistīšanās vietām pie GASS_A receptora kompleksa (Huang *et.al.*, 2001; Ramanjaneyulu un Ticku, 1984). Dzīvniekiem, kam krampji izraisīti ar PTZ, var novērot izmainītu kairināmo, kavējošo un/vai modulatoro neurotransmiteru receptoru blīvumu (Cremer *et.al.*, 2009). PTZ ierosināto krampju sliekšnis tiek regulēts caur centrālo α_2 -receptoru noradrenerģisko aktivitāti (Szot *et.al.*, 2004) un NO sintēzi (Nidhi *et.al.*, 1999). PTZ izraisītajā krampju testā ir parādīta karnitīna pretkrampju aktivitāte 3 g/kg lielā devā pēc vienreizējas *i.p.* injekcijas eksperimentālajā PTZ izraisītajā krampju testā (Yu *et.al.*, 1997). Karnitīna pretkrampju aktivitātes mehānisms nav zināms, ir izteikti minējumi par tā saistību ar GASS sistēmu (Fariello un Shug, 1981). Tai pat laikā klīnikā tiek plaši lietots nātrija

valproāts, kas ir karnitīna biosintēzes inhibitors un kam arī ir pierādīta pretkrampju aktivitāte (Farkas *et.al.*, 1996). Valproātu pacienti parasti lieto ilgstoši, bet tam ir arī pierādīta akūta pretkrampju iedarbība PTZ modelī (Luszczki *et.al.*, 2006), kā arī zināms, ka akūta valproāta ievadīšana nesamazina karnitīna daudzumu sirds, muskuļu un nieru audos (Rozas *et.al.*, 1990). Ir zināms, ka karnitīna koncentrācija smadzenēs nemainās arī 1 stundu pēc mildronāta ievadīšanas (nepublicēti dati), kā arī pēc 24 stundām (skatīt 15. attēlu), tāpat mildronāta ievadīšanas gadījumā nenovēro izmainītu karnitīna koncentrāciju asins plazmā un sirds audos pēc 24 stundām (Liepinsh *et al.*, 2006). Mūsu veiktajos eksperimentos mildronāts atkarībā no devas uzrādīja PTZ, bet ne BIK izraisītu krampju samazināšanos. Tā kā ir zināms, ka bikukulīns ir GASS_A receptora antagonists un PTZ darbība tiek saistīta ar dažādiem mehānismiem, tajā skaitā GASS, tad varētu norādīt, ka akūta mildronāta pretkrampju darbība tieši nerealizējas caur GASS signālceļiem. Turklāt PTZ izraisītajā krampju testā mildronāts būtiski palielināja etanola pretkrampju darbību, bet BIK izraisītajā krampju testā šāda mildronāta aktivitāte netika novērota, tāpēc var secināt, ka mildronāta pretkrampju aktivitāte nav saistīta ar GASS signālsistēmu.

Glikoze ir galvenais smadzeņu enerģijas avots (Peters, 2011), samazināts glikozes līmenis paaugstina epilepsijas krampju biežumu (Roulet-Perez *et al.*, 2008; Reid *et al.*, 2009). Ļoti bieži krampjus ietekmē traucēts glikozes transports caur hematoencefālisko barjeru, šajos procesos nozīmīga loma ir glikozes transportproteīnam-1 (GLUT1) (Suls *et.al.*, 2009). Ir zināms, ka viens no epilepsijas cēloņiem ir mutācijas GLUT1 gēnā, kas noved pie funkcionāli mazaktīva proteīna (Suls *et al.*, 2009; Roulet-Perez *et al.*, 2008). Lai gan epilepsijas pacientiem glikozes koncentrācija asinīs, mērot gan tukšā dūšā, gan paēdušā stāvoklī, no kontroles grupas neatšķiras, tomēr epilepsijas pacientiem tukšā dūšā (zems glikozes līmenis) pieaug lēkmju biežums (Badawy *et.al.*, 2013), tāpēc iesaka uzturēt stabilu glikozes koncentrāciju asinīs. Ir zināms, ka PTZ izraisa izmaiņas enerģijas metabolismā, samazinot glikozes patēriņu (Smeland *et al.*, 2012). Pētot acetilkarnitīnu PTZ krampju modelī, konstatēts, ka acetilkarnitīns neietekmē glikozes metabolismu krampju laikā, lai gan ir grūti spriest, vai paaugstināts glikozes saturs nozīme kavētu tās patēriņu, vai arī iespējams, ka Krebsa ciklam tiek papildus piegādāts acetil-fragments no acetilkarnitīna, nodrošinot to ar papildu enerģijas avotu (Smeland *et al.*, 2012). Iepriekš ir parādīts, ka ne akūtas, ne hroniskas mildronāta ievadīšanas gadījumā nenovēroja izmainītu glikozes uzņemšanu smadzenēs veselām pelēm, kā arī tas

neietekmēja glikozes daudzumu asinīs (Vilšķērsts *et al.*, 2009). Hroniska mildronāta ievadīšana neizmainīja svarīgāko glikozes metabolismā iesaistīto gēnu transkripciju galvas smadzenēs, tai skaitā GLUT1 veselām pelēm (Vilšķērsts *et al.*, 2009). Varētu domāt, ka mildronāta pretkrampju darbība nav saistīta ar glikozes metabolisma veicināšanu smadzeņu audos.

Iepriekš ir atrasta mildronāta akūtas ievadīšanas ietekme uz NO un adrenoreceptorajām sistēmām (Dzintare *et al.*, 2002; Sizova *et al.*, 2002). Abas sistēmas ir iesaistītas PTZ izraisīto krampju sliekšņa modulācijā (Nidhi *et al.*, 1999; Szot *et al.*, 2004), tātad mildronāta pretkrampju aktivitāte PTZ inducēto krampju testā varētu būt saistīta ar vienu vai abām šīm sistēmām. Lai noskaidrotu mildronāta darbības mehānismu PTZ izraisītajā krampju testā, tika izmantots NO sintāzes inhibitors L-NAME un α_2 -adrenoreceptora antagonists johimbīns. Iepriekš publicētie dati liecina, ka α_2 -adrenoreceptora agonisti parāda pretkrampju (guanfacīns, albuterols), savukārt antagonisti parāda krampjus pastiprinošo (prazosīns) aktivitāti PTZ krampju eksperimentālajā dzīvnieku modelī. α_2 -adrenoreceptoru presinaptiskais apakštips mediē endogēnā norepinefrīna pretkrampju darbību, savukārt postsinaptiskais apakštips – krampju pastiprinošo darbību (Szot *et al.*, 2004). Turklāt NO ir zināms kā krampju modulators, piemēram, NO sintāzes inhibitoram ir krampjus pastiprinoša darbība (Tsuda *et al.*, 1997), savukārt, NG-monomethyl-L-arginīnam (NMMA) specifiskajam NO sintāzes inhibitoram un NO donoram L-arginīnam ir zināma pretkrampju darbība (De Sarro *et al.*, 1991; Nidhi *et al.*, 1999) dažādos krampju modeļos. Mēs izmantojām zemas L-NAME (10 mg/kg) un johimbīna (2 mg/kg) koncentrācijas, kas pašas par sevi neietekmēja PTZ izraisīto krampju sliekšni (Hodayoun *et al.*, 2002; Riazi *et al.*, 2006). NO sintāzes inhibitora L-NAME un α_2 -adrenoreceptora antagonista johimbīna klātbūtnē mildronāta pretkrampju aktivitāte netika novērota. Šie dati norāda uz mildronāta PTZ krampju sliekšņa modulējošo aktivitāti, kas saistīti ar NO un adrenerģisko ceļu.

Mildronāts, atkarībā no devas lieluma, kavēja etanola izraisīto gulēšanas laiku. Iespējams, ka mildronāta un etanola darbība ir saistīta ar līdzīgiem CNS procesiem. PTZ krampju testā mildronāts paaugstināja etanola pretkrampju darbību. Turklāt mildronāta akūta ievadīšana mazināja etanola izraisītās izmaiņas smadzeņu garozas asins plūsmā. Savukārt mildronātam nenovēroja antihipnotisko ietekmi etanola testā L-NAME un johimbīna klātbūtnē, kas ir pretēji PTZ testa rezultātiem. Literatūrā atrodamas norādes par etanola atšķirīgo ietekmi uz dzīvnieku aktivitāti – etanola

injicēšana *i.p.* mazās devās izraisa paaugstinātu aktivitāti “atvērtā lauka” testā, savukārt etanols lielās devās noved pie kustību koordinācijas trūkuma un izraisa narkozi – miegainības efektu (Draski un Deitrich, 1993). Savukārt pēc akūta mildronāta ievadīšanas devās 30, 100 un 300 mg/kg netika novērotas izmaiņas “atvērtā lauka” testā. Mūsu pētījumā mildronāta akūta ievadīšana izraisīja atšķirīgus, ar etanola saistītus CNS efektus: mildronāts samazināja etanola hipnotisko darbību, etanolu pretkrampju darbība mildronāta klātbūtnē pastiprinājās. Iegūtie rezultāti vēlreiz norāda uz etanola iedarbības komplekso dabu, vienlaicīgi arī uz iespējamām, ar karnitīnu saistītiem mehānismiem, ko ietekmē mildronāts.

Tradiccionāli karnitīnam smadzeņu audos piedēvē noteiktas aizsargfunkcijas, tostarp tas 800 mg/kg devā samazina lipīdu peroksidāciju dažādos smadzeņu reģionos dzīvniekiem, kas pakļauti hipobāriskai hipoksijai (Koudelova *et.al.*, 1994). Tāpat ir ziņots par to, ka karnitīns novērš neironu virsmas lādiņu zudumu (Maresova *et.al.*, 2001), kā arī nodrošināšana enerģētisko metabolītu homeostāzi pēc išēmijas (Matsuoka un Igisu, 1992). Iepriekš publicētie rezultāti liecina, ka pēc karnitīna injicēšanas devā 50 mg/kg novēro samazinātu izpētes un pārvietošanās aktivitāti pelēm atklāta lauka testā (Moraes E Luz EW *et.al.*, 2013). Tas skaidrots ar samazinātu acetilholīna koncentrāciju, kas būtu ņemams vērā, lietojot lielas karnitīna devas ikdienas uzturā. Savukārt mildronāta ievadīšana (līdz pat 300 mg/kg devā) neizmainīja izpētes aktivitāti, novērtējot to pēc 30, 60 un 120 min. Acetilkarnitīns 1,5 g akūti ievadīts *i.v.* uzlaboja smadzeņu garozas asins plūsmu pacientiem ar hronisku insultu (Postiglione *et.al.*, 1991). Mūsu iegūtie rezultāti liecina, ka arī mildronāts (200 mg/kg) aizkavē CCA oklūzijas izraisītās smadzeņu garozas asins plūsmas un skābekļa piesātinājuma izmaiņas. Tādējādi pētījums liecina, ka akūta mildronāta ievadīšana organismā var aizsargāt smadzenes pret akūtiem smadzeņu asinsrites traucējumiem.

Mūsu pētījums demonstrē mildronāta pretkrampju aktivitāti eksperimentālā modelī uz toniskajiem-kloniskajiem krampjiem, kā arī prethipnotisko efektu etanola izraisītajā „pārvelšanās” refleksa zuduma testā. Turklāt mildronāta terapija samazināja pēc īslaicīgas CCA oklūzijas izraisītās smadzeņu garozas un skābekļa piesātinājuma izmaiņas. Mūsu rezultāti norāda uz iespējamu mildronāta lietošanas paplašināšanu krampju un akūtas alkohola intoksikācijas gadījumā.

4.2. Karnitīna daudzuma samazināšanas ietekme uz seksuālo funkciju

Asinsvadu slimības ir viens no visbiežāk sastopamajiem seksuālajās disfunkcijas, tai skaitā erekcijas problēmu, iemesliem, kas samazina vīriešu dzīves kvalitāti (Jackson *et.al.*, 2006). Tāpēc, ārstējot asinsvadu slimības, iespējama arī seksuālās funkcijas uzlabošanās. Mildronāta ilgstošas ievadīšanas ietekmei žurku tēviņu seksuālās uzvedības testā tika izvēlētas 3 devas: 30, 100 un 300 mg/kg, kas aptver devu intervālu, kurā tiek ietekmēta karnitīna un GBB koncentrācija žurku asins plazmā un līdz šim pētītajos orgānos – sirdī un aknās (Liepinsh *et al.*, 2006, 2009). Tā kā zināms, ka mildronāta ievadīšana izraisa karnitīna koncentrācijas samazināšanos dažādos audos, bet karnitīna atvasinājumus iesaka lietot ar vecumu saistītās seksuālās disfunkcijas ārstēšanai (Cavallini *et.al.*, 2004a), šajā pētījumā tika noskaidroti mildronāta efekti uz seksuālo aktivitāti žurku tēviņu uzvedības testā, kā arī novērtēta mildronāta ietekme uz reproduktīvajiem orgāniem.

Kā redzams rezultātu kopsavilkuma tabulā, mildronāta ilgstoša (14 dienas, *p.o.*) ievadīšana nesamazināja žurku tēviņu seksuālo aktivitāti uzvedības testā (skatīt 2. tabulu), bet atsevišķos rādītājos to uzlaboja. Piemēram, aktivitātes rādītājs „pārošanās efektivitāte” bija vienāds kontroles grupai un mildronāta grupām (ap 90% visās grupās). Rādītājs tuvu 100% liecina, ka žurku tēviņiem ir bijusi laba seksuālā motivācija un potence (Agmo, 1997). Par žurku tēviņu palielināto seksuālo aktivitāti liecina arī mildronāta ietekme uz kopējo intromisiju skaitu (2. tabula), jo intromisiju skaita palielināšanās liecina par uzlabotu ejakulācijas refleksu aktivāciju (Agmo, 1997). Nesens pētījums parāda, ka pēc 90 dienu mildronāta ievadīšanas Jorkšīras kuļiem novēro uzlabotu seksuālo darbību, palielinās ejakulāciju skaits (Bruveris *et.al.*, 2013). Kopumā var secināt, ka mildronāts uzlabo tēviņu seksuālo funkciju.

Vairākos pētījumos ir parādīts, ka, karnitīnu lietojot ikdienas uzturā, vīriešiem uzlabojas spermas kvalitāte, kustīgums, koncentrācija, morfolģija (Balercia *et.al.*, 2005; Cavallini *et.al.*, 2004b; Lenzi *et.al.*, 2004; Ross *et.al.*, 2010). Tai pašā laikā ir pētījums, kurā parādīts, ka pēc 24 nedēļu karnitīna lietošanas nenovēro nozīmīgu ietekmi uz spermatozoīdu kustīgumu vai kopējo kustīgo spermatozoīdu daudzumu (Sigman *et.al.*, 2006). Savukārt ir zināms, ka mildronāts samazina karnitīna koncentrāciju žurku asins plazmā, un arī šajā pētījumā mildronāts jau devā 30 mg/kg ticami samazināja karnitīna koncentrāciju samazināšanos asins plazmā (14.A attēls).

Jau iepriekš ir aprakstīts mildronāta efekts uz karnitīna koncentrāciju dažādos audos, piemēram, sirdī un aknās (Hayashi *et al.*, 2000; Liepinsh *et al.*, 2006, 2009). Agrākie eksperimenti rāda, ka nozīmīga karnitīna koncentrācijas pazemināšanās sirds un aknas audos tika novērota tikai pēc 10 dienu mildronāta ievadīšanas 50 mg/kg devā (Hayashi *et al.*, 2000). Mūsu eksperimenta rezultāti rāda, ka mildronāta lietošanas ietekmē karnitīna koncentrācija žurku tēviņu sēkliniekos samazinās, bet būtisks efekts ir novērojams tikai 100 un 300 mg/kg devās (14.B. attēls). Šo efektu var skaidrot ar pastiprinātu karnitīna atpakaļ uzņemšanu un transportsistēmas darbību reproduktīvajos orgānos, kas novērš mildronāta efektu sēklinieku audos. Citu autoru publikācijās aprakstīts, ka 800 mg/kg mildronāta ievadīšanas gadījumā karnitīna koncentrācija bija samazināta žurku sirds audos, savukārt no žurku sirdīm izolētajos mitohondrijos, kam pirms tam bija ievadīts mildronāts, kopējā karnitīna daudzums bija lielāks nekā kontroles žurku sirds mitohondrijos (Degrace *et.al.*, 2004). Varētu domāt, ka arī žurku tēviņu sēkliniekos adaptīvā transporta sistēma palīdz uzturēt optimālu karnitīna koncentrāciju.

Mēs atradām, ka atkārtoti ievadīts mildronāts ne tikai samazina brīvā karnitīna koncentrāciju žurku asins plazmā un sēkliniekos, bet arī ievērojami palielina GBB koncentrāciju (14. attēls). Iepriekšējās publikācijās ir ziņots, ka mildronāta ievadīšanas rezultātā GBB palielinās žurku sirdīs, aknās un plazmā (Akahira *et al.*, 1997; Liepinsh *et al.*, 2006, 2009). Piemēram, žurku sirds audos pēc 10 dienu mildronāta ievadīšanas devā 100 mg/kg tika atrasts, ka GBB koncentrācija bija 20 reizes lielāka nekā kontroles grupas paraugos (Akahira *et al.*, 1997). Turpretim žurku sēkliniekos GBB koncentrācija mildronāta iedarbības rezultātā bija tikai trīs reizes augstāka nekā kontroles dzīvnieku audos. Tātad mildronāts paaugstina GBB koncentrāciju gan sirds, gan sēklinieku audos, tomēr sēkliniekos GBB koncentrācijas pieaugums ir ievērojami mazāks. Šis novērojums bija negaidīts, jo mildronāts ir pazīstams kā GBB hidroksilāzes inhibitors, un šis enzīms ir atrodams sēkliniekos, bet nav ekspresēts sirds audos (Carter *et.al.*, 1987). Ja sēkliniekos mildronāts bloķētu GBB transformāciju par karnitīnu, tādējādi būtu saglabāts tā paaugstināts koncentrācijas līmenis. Mildronāta K_i GBB hidroksilāzes gadījumā ir mikromolārā diapazonā (Simkhovich *et.al.*, 1988), kas liek domāt, ka augstai mildronāta koncentrācijai vajadzētu kavēt karnitīna biosintēzi, nomācot GBB hidroksilāzi. Mūsu eksperimenti pierāda, ka mildronāta koncentrācija sēkliniekos pieauga atkarībā no tā ievadīšanas devas lieluma un sasniedza apmēram 140 nmol/g audos mildronāta devā

300 mg/kg. Iespējams, ka mildronāta koncentrācija tomēr nesasniedza pietiekami augstu līmeni, lai bloķētu GBB hidroksilāzes darbību, un tāpēc GBB netika uzkrāts, un sēkliniekos novērotais GBB līmeņa pieaugums nebija tik izteikts kā sirds audos. Turklāt jāņem vērā arī nozīmīgā karnitīna transportsistēmas loma gan sirds, gan sēklinieku audos.

Karnitīna koncentrācija vīriešu reproduktīvajos orgānos tiek regulēta ar karnitīna transportproteīna kompleksu (Maeda *et.al.*, 2007). Šis ir pirmais pētījums, kas parāda, ka mildronāts ietekmē karnitīna koncentrāciju žurku sēkliniekos. Mildronāta K_i konstante karnitīna transportproteīniem dažādos audos vēl nav precīzi noteikta, savukārt mūsu dati liek domāt, ka mildronāts varētu kavēt karnitīna transportu caur asins-sēklinieku barjeru. Karnitīna transportēšanā un atpakaļ uzņemšanā no asinīm uz sēkliniekiem varētu būt iesaistīts OKTN2, kas tiek ekspresēts arī sēklinieku audos. Līdz šim Grube ar kolēģiem ir aprakstījis, ka sirdī karnitīna uzņemšanu no asinīm nodrošina OKTN2 un ka mildronāts kavē OKTN2 aktivitāti sirdī (Grube *et.al.*, 2006). Tomēr jaunākie pētījumi ļauj secināt, ka mildronāts pilnībā kavē karnitīna atpakaļ uzņemšanu muskuļu šūnās, savukārt sirds šūnās kavēšana ir tikai daļēja, tomēr mildronāts kā karnitīna atpakaļ uzņemšanas inhibitors darbojas gan muskuļu, gan sirds šūnās (Rigault *et.al.*, 2008). Mūsu eksperimentā, ievadot 100 mg/kg mildronāta, tas izraisīja būtisku karnitīna koncentrācijas samazināšanos par 36% sēkliniekos, un tas ļauj domāt, ka mildronāts arī šajos audos ietekmē karnitīna transportproteīnu aktivitāti, kā rezultātā tiek samazināta karnitīna koncentrācija sēkliniekos.

Imunoblota audu analīzes negaidīti parādīja, ka mildronāta žurku tēviņu sēkliniekos KPT-1B proteīnu ekspresija saglabājās nemainīga. Tas varētu liecināt, ka pētījumā izmantoto mildronāta devu efekts uz karnitīna koncentrāciju nav tik izteikts, lai to vajadzētu kompensēt ar KPT-1B proteīnu ekspresijas palielināšanos. Vairākās publikācijās ir aprakstīta palielināta KPT-1 aktivitāte, proteīna daudzums un gēnu ekspresija (mRNS) sirds un aknu audos, lietojot mildronātu 200 mg/kg devā pelēm (21 diena) un 800 mg/kg žurkām (10 dienas) (Degrace *et.al.*, 2004; Degrace *et.al.*, 2007; Liepinsh *et.al.*, 2008). Savukārt pēc 2 nedēļu ilgas mildronāta (100 mg/kg) lietošanas netika novērotas KPT-1A un KPT-1B mRNS ekspresijas izmaiņas sirds mitohondrijos (Kuka *et al.*, 2012). Savos eksperimentos mēs neizmantojām ļoti augstas mildronāta devas, bet iespējams, ka kompensatorai KPT-1 mRNS un proteīna

daudzuma, kā arī aktivitātes palielināšanai karnitīna koncentrācijas samazinājumam jābūt ļoti izteiktam vai ilgstošam.

Mūsu dati rāda, ka 100 mg/kg mildronāta grupā sēklas pūslīša svars bija būtiski lielāks un mazāk paraugos tika novērota aglutinācija. Savukārt parametros „spermatozoīdu blīvums” un „spermatozoīdu kustīgums” nekonstatējām atšķirības, salīdzinot ar kontroles grupu paraugiem (4. tabula). Jaunākā pētījumā ir parādīts, ka mildronāta 40 dienu ievadīšana 2 g lielā devā Jorkšīras kuiļiem ticami palielināja spermas kustīgumu, kas saglabājās arī pēc 80 un 90 dienu mildronāta lietošanas (Bruveris *et al.*, 2013). Pēc 90 dienu mildronāta ievadīšanas dzimumorgānu svars Jorkšīras kuiļiem nebija izmainīts (Bruveris *et al.*, 2013). Rezultāti ļauj secināt, ka samazināta karnitīna koncentrācija sēkliniekos neizsauc nekādas nozīmīgas izmaiņas dzimumorgānu svarā vai spermas kvalitātes pasliktināšanos.

Iepriekš veikti pētījumi par testosterona ietekmi uz karnitīna koncentrāciju, kur izvirzīta doma par karnitīnu kā bioķīmisko auglības marķieri, kas būtu daudz ticamāks rādītājs nekā ļoti svārstīgās testosterona koncentrācijas noteikšana asins paraugos (Li *et.al.*, 2007; Ruiz-Pesini *et.al.*, 2001). Tāpēc tika pārbaudītas testosterona koncentrācijas izmaiņas mildronāta ievadīšanas rezultātā, zinot, ka mildronāts samazina karnitīna koncentrāciju. Mūsu dati rāda, ka mildronāts devās 100 un 300 mg/kg neizraisa testosterona izmaiņas, salīdzinot ar kontroles grupu (23. attēls), tai pašā laikā tika konstatēta karnitīna koncentrācijas samazināšanās asins plazmā. Turpretim pēc 90 dienu mildronāta ievadīšanas kuiļiem ir novērota ticami paaugstināta testosterona koncentrācija asins serumā (Bruveris *et al.*, 2013). Lai gan ir publicēts pētījums, kas parāda, ka palielināts sēklinieku svars korelē ar palielinātu testosterona koncentrāciju asins serumā, ko saista ar ģenētiski kontrolētu testosterona biosintēzi (Lubritz *et.al.*, 1991), tomēr vairāki pētījumi liecina, ka testosterona koncentrāciju ietekmē dažādi endogēnie un eksogēnie faktori, piemēram, vecums (Meyer un Korz, 2013; Wu *et.al.*, 2010), diennakts ritms (Brambilla *et.al.*, 2009), ikdienas uzturs (Escobar *et.al.*, 2009). Darbā iegūtie rezultāti liecina, ka samazināta karnitīna koncentrācija neietekmē brīvā testosterona koncentrāciju asins plazmā, ja mildronāts lietots devās 100 un 300 mg/kg. Mūsu rezultāti liek arī domāt, ka diētas vai zāļu lietošanas rezultātā izmainītā asins plazmas karnitīna koncentrācija varētu radīt maldīgus secinājumus par vīriešu auglību, un karnitīns tomēr nebūtu piemērots biomarķieris, lai veiktu viennozīmīgus secinājumus par tēviņu auglību.

Klīnikā mildronāts tiek izmantots kā antiišēmisks un šūnas enerģijas metabolismu regulējošs medikaments, kas izmantojams sirds un CNS saslimšanu gadījumos (Dambrova *et al.*, 2002; Sjakste *et al.*, 2005). Papildus karnitīna koncentrāciju samazinošajam efektam, kas tiek novērots pēc mildronāta uzņemšanas, ir konstatēta paaugstināta slāpekļa oksīda koncentrācija žurku audos (Dzintare *et.al.*, 2002). Interesanti, ka vienlaicīgas mildronāta un GBB ievadīšanas rezultātā tiek paaugstināta NO koncentrācija arī sēkliniekos (Dzintare, 2004). Mildronāta ievadīšanas rezultātā palielinātā seksuālā aktivitāte mūsu eksperimentos varētu būt saistīta ar pieaugušo GBB un mildronāta koncentrāciju žurku sēkliniekos un abu savienojumu ietekmi uz NO koncentrāciju. Literatūrā ir aprakstītas līdzīgas izmaiņas žurku seksuālajā uzvedībā pēc L-arginīna (dabiskais substrāts slāpekļa oksīda sintēzei) *i.p.* ievadīšanas (Benelli *et.al.*, 1995). Pēc hroniskas L-NAME ievadīšanas žurku tēviņiem attīstās erekcijas disfunkcija, tādējādi pieckārtīgi samazinot „pārošanās efektivitāti” (Ferraz *et.al.*, 2003). Arī iepriekš veiktie pētījumi ar mildronātu pieļauj, ka GBB saturošus farmaceitiskos preparātus varētu izmantot seksuālās aktivitātes un potences stimulēšanai (Kalvinsh *et.al.*, 2003). Mēs nevaram izslēgt iespējamību, ka mūsu eksperimenta rezultāti varētu būt saistīta gan ar karnitīna koncentrācijas samazināšanos, gan arī ar paša mildronāta farmakoloģisko darbību, kas saistīta ar citām signālsistēmām.

Kopumā jāsecina, ka mildronāts kardioprotektīvajā devā 100 mg/kg, kā arī 300 mg/kg devā *p.o.* samazina brīvā karnitīna koncentrāciju žurku sēkliniekos. Tomēr šis efekts nesamazina žurku tēviņu spermas kvalitāti un seksuālo aktivitāti, bet pat to viegli stimulē. Šī informācija ir nozīmīga arī klīnikā, vīriešiem ilgstoši lietojot mildronātu kardioprotektīvo un antiišēmisko efektu sasniegšanai.

4.3. Sensori-motorās darbības un atmiņas traucējumi pēc 90 un 120 minūšu pārejošās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas žurkās

Pārejošās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas eksperimentālais modelis tiek plaši izmantots insulta modulēšanai un jaunu zāļu meklēšanai, bet līdz šim nebija salīdzināts 90 un 120 min. garas oklūzijas neiroloģisko traucējumu līmenis. Vairākos pētījumos ir parādīta pasliktināta taktīlā un proprioceptīvā funkcija divas nedēļas pēc 120 min. VCAO ķepu novietošanas testā (Jolkkonen *et.al.*, 2000; Makinen *et.al.*, 2006; Puurunen *et.al.*, 2001), bet literatūrā nav datu par pakaļējo un priekšējo ķepu

taktilo un proprioceptīvo stimulu izmaiņu izvērtēšanu pēc 90 min. VCAO. Mūsu iegūtie rezultāti rāda, ka taktilā un proprioceptīvā funkcija ir samazināta ķepu novietošanas testā pēc smadzeņu bojājuma. Ķepu novietošanas tests ir izmantojams, lai pārbaudītu dzīvnieku pakalējo un priekšējo ķepu taktilo un proprioceptīvo stimulu izmaiņu gan pēc 90, gan pēc 120 min. VCA oklūzijas *Wistar* līnijas žurkām.

Lai novērtētu žurku sensori-motoro funkciju pēc dažādiem oklūzijas laikiem, tika izmantots žurku ūsu kairinājuma izsauktais ķepu novietošanas tests. Jau iepriekš ir ziņots, ka sensori-motoro funkciju traucējumi nav vērojami *Wistar* līnijas žurkām pēc 60 un 75 min. VCAO žurku ūsu kairinājuma izsauktajā ķepu novietošanas testā (Encarnacion *et.al.*, 2011). Mūsu dati parādīja, ka 90 min. ilga VCAO ir pietiekama, lai izraisītu sensori-motoro funkciju traucējumus *Wistar* līnijas žurkām. Tomēr jušanas funkcija bija ievērojami ietekmēta 90 min. oklūzijas grupai 3. pēcoperācijas dienā, bet 7. un 14. pēcoperācijas dienā netika konstatēta būtiska atšķirība starp 90 min. un viltus operēto grupu. Veicot neiroloģisko traucējumu novērtējumu, tika aprēķināts mazākais nepieciešamais dzīvnieku skaits, lai atšķirības starp 90 min. oklūzijas un viltus operētās grupas dzīvniekiem būtu ticamas. Šajā gadījumā dzīvnieku skaits grupā būtu jāpalielina no 8 uz 16. *Wistar* līnijas žurkām būtiski samazinātu jušanas funkciju novēroja visās pēcoperācijas dienās pēc 120 min. oklūzijas. Žurku ūsu kairinājuma izsauktais ķepu novietošanas tests ir izmantojams, lai pārbaudītu dzīvnieku sensori-motoro funkciju izmaiņu gan pēc 90, gan pēc 120 min. VCA oklūzijas *Wistar* līnijas žurkām.

Žurku priekšējo un pakalējo ķepu sensori-motoro funkciju traucējumu izvērtēšanai pēc VCAO dažādos laikos tika izmantots pārvietošanās pa laipu tests. Iegūtie dati skaidri parādīja, ka ir nepieciešama 120 min. ilga VCA oklūzija, lai konstatētu sensori-motoro funkciju bojājumus pārvietošanās pa laipu testā, un tas ir viens no nedaudzajiem testiem, lai noteiktu sensori-motoro funkciju traucējumus pakalķepām.

Cilindra jeb žurku ķepu izmantošanas asimetrijas testu izmantoja, lai novērtētu motorās darbības traucējumus pēc dažādiem oklūzijas ilgumiem. Mūsu iegūtie dati skaidri parādīja, ka *Wistar* līnijas žurkām pēc 120 min. VCAO šis tests ir piemērojams 2 nedēļu ilgiem pētījumiem, novērtējot sensori-motoro disfunkciju, bet pēc 90 min. oklūzijas šis tests ir noderīgs sensori-motoro disfunkcijas pētījumiem līdz 7 dienām pēc operācijas. Dažāda veida testi tiek izmantoti, lai izvērtētu sensori-motoros traucējumus pēc insulta. Piemēram, kāpņu tests, kas šajā pētījumā nav

iekļauts, tiek izmantots līdzīgos apstākļos *Wistar* līnijas žurkām pēc 90 un 120 min. VCA oklūzijas, arī izvērtējot sensori–motoro funkciju (Hudzik *et.al.*, 2000). Tomēr šis pētījums parādīja, ka pēc pirmajām 3 nedēļām pēc VCAO nebija būtisku traucējumu un atšķirības starp viltus operētās un oklūzijas grupas (Hudzik *et.al.*, 2000). Vienlaicīgi *Sprague-Dawley* līnijas žurkām šajā pašā testā pēc 60 min. VCA oklūzijas konstatēja būtiski pasliktinātu sensori-motoro funkciju jau pēc 2 nedēļām pēc operācijas (Freret *et.al.*, 2006). Interesanti, ka arī žurku ūsu kairinājuma izsauktajā ķepu novietošanas testā sensori-motoro funkciju bojājumi *Sprague-Dawley* līnijas žurkām ir izteiktāki par *Wistar* līnijas žurkām (Encarnacion *et.al.*, 2011). Rotējošā stienā tests ir viens no biežāk izmantotajiem testiem motoro funkciju bojājumu noteikšanai pēc VCAO. Motorie traucējumi tiek novēroti, sākot ar 24 stundām līdz pat 2 nedēļām pēc VCAO gan *Wistar*, gan *Sprague-Dawley* līnijas žurkām (Ding *et.al.*, 2004; Gupta *et.al.*, 2002; Kim *et.al.*, 2012). Tomēr ar šī testa palīdzību var izvērtēt tikai motorās funkcijas, nevis sensori-motorās funkcijas pēc VCA oklūzijas operācijām. Cilindra un pārvietošanās pa laipu testi ir vienkāršāki par kāpņu testu, tāpēc ir piemēroti sensori-motoro funkciju novērtēšanai ilgākā periodā (vismaz 4 nedēļas), jo īpaši *Wistar* līnijas žurkām.

Vairāki pētījumi ir izvērtējuši VCAO ietekmi uz atmiņas procesiem (Borlongan *et.al.*, 1995; Yoshioka *et.al.*, 2002). Tomēr, izmantojot PNR testu eksperimentā, ir svarīgi izvēlēties pareizu nepieciešamo pēdas kairinājuma strāvas stiprumu. Kā liecina Gupta un viņa kolēģu pētījums, pēc 120 min. VCAO žurkām atbildes laiks 24 stundas pēc pēdu kairinājuma saņemšanas, kā arī 7. un 15. dienā pēc kairinājuma saņemšanas bija nemainīgs – no 350 līdz 400 sek. visās novērotajās dienās (Gupta *et.al.*, 2002). Mūsu pilotpētījumi ir parādījuši līdzīgus rezultātus. Atbildes reakcija, ja žurkas ir saņēmušas pārāk augstu elektrisko šoku, pēdu kairinājumu 0,6 mA/3 sek., bija augsta – ap 350 sek. gan pēc 24 stundām, gan pēc 6 dienām pēc pēdu kairinājuma saņemšanas. Atšķirība no viltus operētās grupas netika novērota. Mūsu dati liecina, ka PNR tests ir piemērots, lai pētītu atmiņas procesus pēc 120 min. VCA oklūzijas, un ir svarīgi izvēlēties pareizo pēdas kairinājuma elektriskā šoka strāvas stiprumu.

Darbības atmiņas novērtēšanai izmantojām Y veida labirintu. Kā aprakstījuši Save un Poucet (Save un Poucet, 2005), darbības atmiņa ir īstermiņa, kas ļauj žurkām atcerēties, ka, piemēram, veicot konkrētu izmēģinājumu, mērķis ir noteiktā vietā. Turklāt arī PNR testā novērojām, ka īslaicīgā atmiņa netiek traucēta pēc 90 un 120

min. VCAO, salīdzinot ar viltus operētajām žurkām. Rezultāti liecina, ka vienīgi ilglaicīgā atmiņa tiek ietekmēta ar VCAO izraisītajiem smadzeņu audu bojājumiem.

Mūsu pētījums parādīja, ka *Wistar* līnijas žurkām, kuras bija pakļautas 120 min. VCAO, tika novērots lielāks bojāto audu apjoms nekā žurkām, kuras tika pakļautas 90 min. VCAO. Nesen tika parādīts, ka, palielinot oklūzijas laiku no 60 min. uz 75 min., tam nav nekādas ietekmes uz bojāto audu apjomu *Wistar* līnijas žurkām. Turklāt neiroloģisko funkciju traucējumi arī neatšķirās starp 60 un 75 min. VCAO grupām (Encarnacion *et al.*, 2011). Mūsu pētījuma dati liecina, ka 90 un 120 min. VCAO ilgums ir pietiekams, lai izraisītu dažādus uzvedības un histoloģiskos bojājumus.

90 un 120 minūtes ir visbiežāk lietotie žurku insulta modeļu VCAO laiki, lai pēc tam analizētu funkcionālās izmaiņas ilgākā laika periodā (Carmichael, 2005; Freret *et.al.*, 2011; Ma *et.al.*, 2006). Mūsu pētījums liecina, ka oklūzijas laiks (90 vai 120 min. VCAO) ir svarīgs faktors, kas ietekmē gan atlabšanas procesu, gan uzvedības reakcijas. Iegūtie rezultāti pārlicinoši rāda, ka sensori-motoro funkciju bojājumi, ko novēro pārvietošanās pa laipu un cilindra testā, visizteiktāk novērojami tieši pēc 120 min., salīdzinot ar 90 min. VCAO. Savukārt salīdzinot savstarpēji taustes, sensori-motorās un proprioceptīvās funkcijas ar ķepu novietošanas un ūsu kairinājuma izsaukto ķepu novietošanas testu netika novērotas būtiskas, ar pārejošu VCAO laiku saistītas atšķirības. Ilglaicīgas atmiņas procesus būtiskāk ietekmēja 120 min. VCAO. Papildus nozīmīgām atšķirībām uzvedības testos, būtiskas atšķirības ir novērojamas arī starp infarktu izmēriem, kas izraisīti izmantojot dažādu 90 un 120 min. ilgu pārejošu VCAO (8. tabula).

8. tabula. VCAO ilguma ietekme uz *Wistar* līnijas žurku uzvedību

TESTI	90 min. VCAO (dienas)			120 min. VCAO (dienas)		
	3.	7.	14.	3.	7.	14.
<i>Ķepu novietošanas tests</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Ūsu kairinājuma izsauktais ķepu novietošanas tests</i>	+	-	-	+	+	+
<i>Pārvietošanās pa laipu tests (priekšķepas)</i>	-	-	-	+, *	-	-
<i>Pārvietošanās pa laipu tests (pakaļķepas)</i>	-	-	-	+, *	+, *	+, *
<i>Cilindra tests</i>	+	+	-	+	+	+, *
<i>PNR (īslaicīgā atmiņa, 7. dienā)</i>		-			-	
<i>PNR (īlgalaicīgo atmiņu, 13. dienā)</i>		-			+	
<i>Y veida labirinta tests (14. dienā)</i>		-			-	
<i>Infarkta izmērs (14. dienā)</i>		+			+, *	

“+” – ticami atšķiras rezultāti no viltus operētiem un VCAO grupas dzīvniekiem attiecīgajā dienā;

“*” – ticami atšķiras rezultāti starp 90 un 120 min. VCAO grupām attiecīgajā dienā.

Kopumā var secināt, ka gan 90, gan 120 minūšu oklūzijas modeļi izraisa būtiskus sensori-motoro, taktilo un proprioceptīvo funkciju traucējumus, savukārt būtiski atmiņas traucējumi ir novērojami tikai pēc 120 min. oklūzijas. Gan ķepu novietošanas, gan ūsu kairinājuma izsaukto ķepu novietošanas testu var izmantot neiroloģisko funkciju traucējumu novērtēšanai gan pēc 90, gan 120 min. VCAO 14 dienu atlabšanas periodā. Taču cilindra un pārvietošanās pa laipu testi ir piemērotāki pēc 120 minūšu VCAO neiroloģisko funkciju bojājumu noteikšanai. Mūsu pētījuma rezultāti ļauj spriest par piemērotāko uzvedības testu izvēli, veicot garāku vai īsāku VCA oklūziju.

4.4. Karnitīna daudzuma samazināšanas ietekme uz smadzeņu audu išēmisko bojājumu

Išēmisks insults ir viens no galvenajiem nāves cēloņiem pasaulē, un tā radītās sekas ir iemesls paliekošai invaliditātei (Truelsen *et.al.*, 2006), tādēļ išēmijas gadījumā ir svarīgi ne tikai samazināt smadzenēs radītos bojājumus, bet arī uzlabot atveseļošanās gaitu. Šis pētījums parādīja, ka karnitīna daudzumu samazinoša mildronāta terapija pēc VCAO uzlaboja žurkām neiroloģiskās funkcijas dažādos sensori-motorajos uzvedības testos, taču mildronāta ievadīšana neietekmēja insulta izmēru smadzeņu audos. Mildronāta terapija uzlaboja taktilo un proprioceptīvo funkciju ķepu novietošanas testā (skatīt 31. attēlu), priekšķepu sensori-motorās funkcijas pārvietošanās pa laipu testā (skatīt 5. tabulu), un abu priekšķepu motorās funkcijas cilindra testā (33. attēls). Žurkām, kurām pēc VCAO tika injicēts mildronāts, motoro funkciju rezultāti rotējošā stieņa testā bija līdzīgi ar viltus operēto dzīvnieku grupu (skatīt 34. attēlu). Mildronāta terapija (14 dienas) samazināja karnitīna koncentrāciju, savukārt GBB un mildronāta koncentrācija pieauga, kā parādīja smadzenīšu audu paraugu UPLC/MS/MS analīze (16. attēls).

Viens no būtiskiem zāļu darbības aizsardzības mehānismiem ir atjaunot smadzeņu asinsriti pēc smadzeņu infarkta (DeWitt un Prough, 2003; Jolkkonen *et.al.*, 2003). Iepriekš veiktā eksperimentā esam parādījuši, ka pēc akūtas mildronāta *i.p.* injicēšanas (200 mg/kg) žurkām tiek stabilizēta asins plūsma un skābekļa piesātinājums īslaicīgas *a. carotis communis* oklūzijas gadījumā (Zvejniece *et.al.*, 2010). Klīniskajos pētījumos ir atklāts, ka mildronāta lietošana uzlabo gan smadzeņu hemodinamiku (Vinichuk, 1991), gan neiroloģisko funkciju atjaunošanos pēc akūta išēmiska insulta (Zhu *et.al.*, 2013). Tas varētu būt viens no izskaidrojumiem, kāpēc mildronāta terapija spēj pozitīvi ietekmēt neiroloģisko iznākumu pēc insulta.

Mildronāts ir antiišēmisks līdzeklis, kura terapijas rezultātā tiek pazemināta brīvā karnitīna koncentrācija šūnās, pārslēdzot enerģijas metabolismu no taukskābju oksidācijas uz išēmijas laikā enerģētiski izdevīgāko glikozes oksidēšanu (Dambrova *et al.*, 2002; Simkhovich *et al.*, 1988). Vairākos pētījumos ir parādīts, ka preparāti ar mildronātam līdzīgu darbības mehānismu, regulējot enerģijas metabolismu, ir izmantojami pēcinsulta terapijā pacientiem. Piemēram, trimetazidīns (1-(2,3,4) trimetobenzil) piperazīna hidrohlorīds (TMZ) ir antiišēmisks medikaments, kas arī pārslēdz sirds enerģijas metabolismu no taukskābju oksidācijas uz glikozes oksidāciju

(Kantor *et.al.*, 2000; Lopaschuk, 2001). TMZ aizsargā smadzenes no smadzeņu išēmijas-reperfūzijas bojājuma (Dhote un Balaraman, 2008). Vienreizēja TMZ injekcija žurkām vienu stundu pēc VCAO pasargā smadzenes, samazinot infarkta apjomu un smadzeņu tūsku; tomēr 22 stundas pēc reperfūzijas nebija novērojami neiroloģiski uzlabojumi (Dhote un Balaraman, 2008). Lai gan pēc akūtas mildronāta terapijas (līdz 3. dienai pēc VCAO) nebija novērojami neiroloģiski uzlabojumi žurkām, tomēr hroniska 14 dienu mildronāta terapija ievērojami uzlaboja neiroloģiskos iznākumus, neizmainot infarkta izmēra lielumu. TMZ terapija arī nepasargāja no smadzeņu bojājuma 21. dienā pēc VCAO (Iqbal *et.al.*, 2002). TMZ neiroprotektējošā darbība pēc VCAO izraisītajiem smadzeņu bojājumiem tiek skaidrota ar antioksidanta un hipotermiskajiem efektiem un enerģijas līdzsvara saglabāšanu mitohondrijos (Dhote un Balaraman, 2008). Mildronāta un TMZ pozitīvos efektus, kas parādīti eksperimentālajā VCAO modelī dažādos pētījumos, varētu izmantot terapijā, uzlabojot neiroloģisko funkcionalitāti pēc išēmiskiem bojājumiem smadzeņu audos.

Iepriekšējie pētījumi ir atklājuši, ka mildronāta terapija 100 mg/kg ievērojami samazina karnitīna koncentrāciju sirds un aknu audos un arī asins plazmā (Liepinsh *et al.*, 2009). Karnitīnam ir nozīmīga loma kā ko-faktoram šūnu enerģijas ražošanā sirds un muskuļu mitohondriālajā matriksā, kā arī tas kalpo kā izejviela neiromediatoru sintēzei, un tā esteri darbojas kā šūnu diferenciācijas faktori un apoptozes kavētāji smadzenēs (Berezowski *et.al.*, 2004; Foster, 2004; Nalecz *et.al.*, 1995). Šajā pētījumā mēs konstatējām, ka pēc 14 dienu ilgas mildronāta terapijas devās 100 un 200 mg/kg, karnitīna koncentrācija smadzenīšu audos bija ievērojami samazinājusies, salīdzinot ar kontroles grupu (skatīt 16. attēlu). Karnitīna koncentrācija pēc išēmiskā insulta neatšķīrās starp viltus operēto un kontroles dzīvnieku grupu. Nemainīga karnitīna koncentrācija VCAO un viltus operēto dzīvnieku grupā tika konstatēta arī hipoksijas-išēmijas eksperimentālajā modelī (Wainwright *et.al.*, 2006). Turklāt nebija novērojamas atšķirības karnitīna koncentrācijā starp skarto un neskarto smadzeņu puslodi; karnitīna terapija aizkavēja išēmijas izraisīto acil-KoA:KoA proporcijas izmainīšanos (Wainwright *et.al.*, 2006). Karnitīns tiek ieteikts, lai išēmijas laikā saglabātu enerģijas metabolītu līmeni smadzeņu audos (Matsuoka un Igisu, 1992), kā arī karnitīna terapija pēc smadzeņu hipoksijas kavē apoptozes attīstību, atjaunojot nervu audu struktūru (Kuzin un Kolesnikova, 1999), un pasargā no neurodeģenerācijas dažādus smadzeņu reģionus, piemēram, *hippocampus* un *striatum* (Burda *et.al.*,

2009). Turklāt ir pierādīts, ka karnitīns samazina neironu deģenerāciju mitohondriju disfunkcijas eksperimentālajā modelī (Binienda *et.al.*, 2005). Tomēr Slivka un kolēģi savā pētījumā atrada, ka karnitīna lietošana pēc insulta neizmainīja ne infarkta izmēru, ne arī ietekmēja fizioloģiskos parametrus (Slivka *et.al.*, 1990). Mūsu pētījumā infarkta izmērs starp kontroles un mildronāta grupu (100 un 200 mg/kg) bija līdzīgs, lai gan karnitīna koncentrācija bija samazināta mildronāta dzīvnieku grupā, tāpēc mēs varam secināt, ka karnitīna koncentrācijas izmaiņas pieaugušu žurku smadzenēs neietekmē insulta izmēru smadzenēs.

Pentilen-tetrazola krampju modelī mildronātam parādījām pretkrampju darbību pēc akūtas ievadīšanas. Šī aktivitāte mildronātam ir atkarīga no α -adrenergiskajiem receptoriem un NO-mehānisma, jo tā pretkrampju darbību kavēja α_2 -adrenoceptora antagonists johimbīns un NO sintāzes inhibitors L-NAME. Ir zināms, ka α_2 -adrenoceptoru agonists deksmedetomidīns uzlaboja neiroloģiskās funkcijas un samazināja infarkta lielumu pēc 30 minūšu ilgas išēmijas (Hoffman *et.al.*, 1991). Tomēr citi pētījumi liecina, ka zemas devas deksmedetomidīns vai nu samazināja, vai arī neizmainīja infarkta izmēra lielumu, salīdzinot ar kontroles grupu, savukārt deksmedetomidīna lielās devās palielināja infarkta izmēra lielumu (Kuhmonen *et.al.*, 2001; Nakano un Okamoto, 2009). Savukārt pēc 60 min. pārejošās VCAO α_2 -adrenoceptoru apakštipu ($\alpha_{2A}^{-/-}$, $\alpha_{2B}^{-/-}$ un $\alpha_{2C}^{-/-}$) transgēnajām pelēm nenovēroja neiroloģisko funkciju uzlabojumu, un infarkta izmērs bija līdzīgs kontroles grupas datiem (Brede *et.al.*, 2011). Interesanti, ka ārstēšana ar visiem labi zināmu α_2 -adrenoceptora agonistu klonidīnu uzlabo neiroloģiskās funkcijas un samazina infarkta izmēru, to izraisot žurkām ar pārejošu priekšējo smadzeņu daļas išēmiju (Zhang, 2004). NO un adrenoceptoru sistēma ietekmē uzvedības reakcijas un infarkta izmēru smadzenēs pēc išēmijas; atbilde ir atkarīga no laika un devas (DeWitt un Prough, 2003). NO veicina smadzeņu audu plasticitāti, tādējādi NO ievadīšanai pēc insulta smadzenēs varētu būt terapeitisks efekts. Ir pierādīts, ka NO ir iesaistīts neiroģenēzes regulācijā pieaugušo smadzenēs un uzlabo funkcionālo rezultātu pēc insulta, lai gan pēc NO donora DETA/NONOate terapijas išēmiskie bojājumi nesamazinājās (Bednar, 2008; Zhang *et.al.*, 2001). Inhalējot ar NO peles uzreiz pēc vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas, novēro samazinātu infarkta izmēru, lai gan šis efekts ir „U” veida un atkarīgs no NO koncentrācijas un inhalēšanas laika (Li *et.al.*, 2013), aizsargmehānisms tiek skaidrots ar NO spēju sintezēt neironālā slāpekļa oksīda sintāzi (nNOS). Ir zināms, ka išēmijas laikā NO koncentrācija audos samazinās, bet

jau vienu stundu pēc reperfūzijas atgriežas fizioloģiskajā līmenī un turpina pieaugt no 12 stundām līdz pat 8 dienām. NO ietekmē smadzeņu bojājumu attīstību dažādos laika posmos pēc traumas vai išēmijas (Godinez-Rubi *et.al.*, 2013; Iadecola *et.al.*, 1997). Ir zināms, ka NO klātbūtnē kodolu faktors-κB (NF-κB) atrodas stabilā kompleksā ar pIκB citoplazmā. Zema NO gadījumā komplekss disociē un NF-κB var iekļūt kodolā, inducējot ar iekaisumu procesiem saistīto gēnu transkripciju (iNOS, TNF-α, IL-1β). Augsta NO koncentrācija šūnā var izsaukt peroksinitrīta (ONOO⁻) veidošanos, kas savukārt var ierosināt pIκB-NF-κB kompleksa disociāciju ar visām no tā izrietošajām sekām. Izvēloties fizioloģiski piemērotu NO koncentrāciju, ir iespējams regulēt iekaisuma procesus (Godinez-Rubi *et.al.*, 2013). Endotelīna-1 insulta izraisītajā eksperimentālajā modelī žurkām mildronāta terapijai ir parādīta neiroprotektīva darbība, samazinot bojāto audu daudzumu, kas tiek skaidrota ar pretiekaisuma aktivitāti (Rumaks *et al.*, 2013). Mildronātam novēro pretiekaisuma darbību sirds audos, jo tiek samazināts NF-κB proteīna daudzums sirds audu riska zonā pēc išēmijas, veicinot PPARα/PGC1α signālceļu aktivāciju (Liepinsh *et.al.*, 2013). Pēdējā laikā ar vien vairāk publicē pētījumus, kuros tiek raksturota un parādīta peroksisomu proliferāciju aktivējošā receptoru (PPAR) nozīme smadzeņu išēmija/reperfūzijas bojājumu ārstēšanai, rekomendējot kā jaunu terapeitisku mērķi (Collino *et.al.*, 2008). Tomēr nevar izslēgt, ka adrenerģiskie un NO signālceļi ietekmē pozitīvo mildronāta rezultātu neiroloģiskajos parametros pēc insulta.

Kopumā jāsecina, ka mildronāts uzlabo motorās, taktilās un jušanas funkcijas žurkām pēc insulta, tādējādi eksperimentāli apstiprinot mildronāta efektivitāti smadzeņu išēmiskā insulta ārstēšanai.

4.5. Mildronāta ietekme uz smadzeņu mitohondriju funkciju

Vairākos pētījumos jau iepriekš ir parādīts, ka karnitīna ievadīšana aizsargā no hipoksijas radītajiem bojājumiem (Rau *et.al.*, 2012; Rauchova *et.al.*, 2012). Šajā pētījumā mēs noskaidrojām, kā pazemināta karnitīna koncentrācija audos ietekmē atsevišķus mitohondriju enerģētiskās vielmaiņas aspektus samazinātas skābekļa koncentrācijas apstākļos. Pirmo reizi parādījām, ka mildronāts var aizsargāt smadzeņu mitohondrijus pret anoksiju un tai sekojošās reperfūzijas laikā izraisītajiem bojājumiem.

Smadzeņu audos mildronāts samazina karnitīna un acil-karnitīna koncentrāciju, bet neietekmē acil-karnitīna un brīvā karnitīna attiecību. Tas norāda uz

to, ka nav izmainīts intramitohondriālais acil-KoA un brīvā KoA līdzsvars (Wainwright *et al.*, 2006), līdz ar to mildronāts neietekmē smadzeņu mitohondriju enerģētisko vielmaiņu. Papildus tam mildronāta izraisītais karnitīna samazinājums attiecīgi samazina arī acil-karnitīna uzkrāšanās risku, kas iepriekš ir parādīts kā nevēlams išēmiska-hipoksijas bojājuma smadzenēs blakusefekts (Wainwright *et al.*, 2006). Uzkrājoties garo ķēžu taukskābēm, šūnās pieaug oksidatīvais stress, kas var izraisīt nervu šūnu bojāeju (Baarine *et.al.*, 2012; Zarrouk *et.al.*, 2012). Samazināts brīvā karnitīna daudzums noved pie samazināta acil-karnitīna daudzuma, un pēc mildronāta lietošanas novēro paaugstinātu acil-KoA (acetil-KoA un garķēžu acil-KoA) koncentrāciju audos. Ir zināms, ka acetil-KoA ir viens no galvenajiem savienojumiem, kuru tālāk enerģijas ieguvē izmanto visas organisma šūnas. Vairāk nekā 90% no acetil-KoA šūnās tiek izmantots tieši enerģijas ieguvei mitohondrijos (Szutowicz *et.al.*, 2013). Tātad šī metabolīta pieejamība mitohondrijos var būt viens no galvenajiem neironu dzīvotspējas noteicošajiem faktoriem smadzenēs.

Acetil-karnitīna koncentrācijas samazinājuma un sekojošas kompensatorās reakcijas, paaugstinātas KrAT aktivitātes, rezultātā palielinās acetil-KoA koncentrācija (Jones *et.al.*, 2010). Tā kā substrātu un produktu koncentrācija ir noteicošie faktori Krebsa cikla enzīmu regulācijā (Bowtell *et.al.*, 2007; Mullinax *et.al.*, 1982), acetil-KoA koncentrācijas izmaiņas var būt par iemeslu mildronāta izraisītai Krebsa cikla enzīmu aktivitāšu modulācijai. Neskatoties uz acetil-KoA izcelsmi (taukskābes vai glikoze), citrātsintāze to brīvi iekļauj Krebsa ciklā (Szutowicz *et al.*, 2013). Pēc mildronāta hroniskas ievadīšanas, lai gan karnitīna koncentrācija ir samazināta, novēro paaugstinātu citrātsintāzes aktivitāti un kopējo acil-KoA koncentrāciju smadzeņu audos, kas tādējādi nodrošina Krebsa cikla funkcionēšanu. Badinātu žurku modeļa gadījumā novēro Krebsa cikla substrātu koncentrāciju samazinājumu šūnā un attiecīgi arī pazeminātu cikla enzīmu aktivitāti, kas savukārt izraisa pazeminātus reducēto kofaktoru līmeņus mitohondrijos (Matecki *et.al.*, 2002). Papildus Matecki un kolēģi novēroja pazeminātu elektronu transporta ķēdes aktivitāti (Matecki *et.al.*, 2002). Šis piemērs liecina par to, ka Krebsa cikla aktivitāte var norādīt uz audu enerģētiskās vielmaiņas efektivitāti. Mūsu eksperimentos novērotā Krebsa cikla aktivitātes paaugstināšanās noved pie papildu reducētajiem kofaktoriem (NADH un FADH₂), ko pēc hipoksijas nekavējoties izmanto oksidatīvajā fosforilēšanā, lai atjaunotu nepieciešamos ATF resursus audiem.

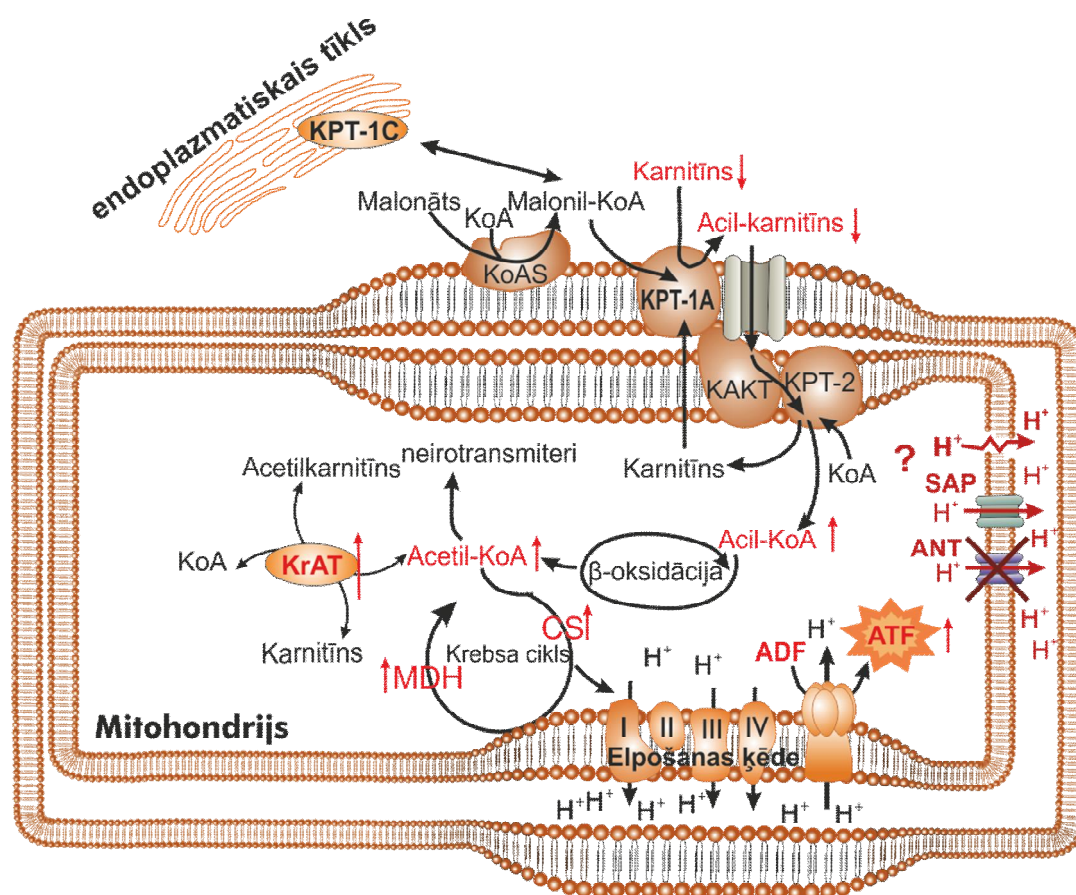
Mildronāts smadzeņu audos izraisa 2,5 reizu acetilkarnitīna samazinājumu. Gan mildronātu, gan acetilkarnitīnu iesaka kā potenciālus farmaceutiskus aģentus Pārkinsona slimības vai insulta gadījumos (Jones *et.al.*, 2010; Klusa *et.al.*, 2010; Svalbe *et.al.*, 2011; Vinichuk, 1991). Ir parādīta KrAT un holīna acetiltransferāzes saistība, lai sintezētu acetilholīnu, kam kā acetil grupas donors kalpo acetilkarnitīns (White un Scates, 1990). Hroniskas mildronāta ievadīšanas rezultātā žurku smadzenēs novērojām samazinātu acetilkarnitīna koncentrāciju, taču kopējā acil-KoA koncentrācija smadzeņu audos palielinājās, kas netieši varētu liecināt arī par paaugstinātu acetil-KoA līmeni smadzeņu audos. Kā iespējamo neiroprotektīvās darbības mehānismu var minēt acetil-KoA līmeņa palielinājumu un tam sekojošu holīnerģisko neurotransmiteru sintēzes veicināšanu. Līdz ar to mūsu rezultāti liecina, ka mildronāta darbības mehānisma pamatā ir paaugstināta acil-KoA (tajā skaitā acetil-KoA) pieejamība un sekojošas izmaiņas mitohondriju funkcionalitātē, tāpat nevar izslēgt arī mildronāta efektus uz neurotransmiteru sintēzi kā vienu no neiroprotektīvās aktivitātes skaidrojumiem.

Tā kā pēc 14 dienu mildronāta ievadīšanas devā 100 mg/kg novēro samazinātu karnitīna koncentrāciju smadzeņu audos, tas varētu norādīt uz to, ka tiks ietekmēta KPT-1 aktivitāte, kā arī KPT-1A un KPT-1C gēnu mRNS daudzums. Iepriekš veiktajos pētījumos ir parādīta KPT-1 mRNS ekspresijas un arī proteīna daudzuma palielināšanās ne tikai sirdī, bet arī aknu audos pēc mildronāta lietošanas izraisītā karnitīna samazinājuma audos (Degrace *et.al.*, 2004; Degrace *et.al.*, 2007; Liepinsh *et.al.*, 2008). Pēc hroniskas un ilgstošas (līdz pat 12 nedēļām) mildronātu ievadīšanas 400 mg/kg pieauga KPT-1 aktivitāte sirds audos, bet nenovēroja izmaiņas aknu audos (Liepinsh *et.al.*, 2009a). Smadzeņu audos pie samazinātas karnitīna koncentrācijas nenovēroja izmainītu KPT-1A un KPT-1C gēnu mRNS daudzumu, kā arī KPT-1 aktivitāte smadzeņu mitohondrijos pie audos atrodamām karnitīna koncentrācijām nebija izmainīta. Ir noskaidrots, ka KPT-1 enzīma K_m vērtība smadzenēs ir $\sim 37 \mu\text{M}$ (Makrecka nepublicēti dati). Mildronāta lietošana izraisa būtisku karnitīna koncentrācijas samazinājumu smadzenēs, tomēr karnitīna daudzums audos vēl joprojām ir pietiekams, lai nodrošinātu KPT-1 aktivitāti. Lai notiktu kompensatora KPT-1 mRNS daudzuma un aktivitātes palielināšanās, nepieciešams ilgstošs un ļoti izteikts karnitīna koncentrācijas samazinājums.

Pēc anoksijas-reoksigenācijas palielinātais skābekļa patēriņš stāvokļa-3 un samazinātais skābekļa patēriņš stāvokļa-4 gadījumā norāda uz efektīvāku mitohondriju funkcionēšanu pēc hroniskas mildronāta ievadīšanas. Uz mitohondriju efektīvāku darbību mildronāta grupā norāda palielinātā EKK vērtība pēc anoksijas-reoksigenācijas. Turklāt ATF koncentrācija mitohondrijos bija par 17% augstāka hroniski vadīta mildronāta grupā pēc anoksijas-reoksigenācijas, salīdzinot ar kontroles grupu. Tas varētu liecināt par no mildronāta atkarīgu smadzeņu mitohondriju funkciju saglabāšanu anoksijas-reoksigenācijas gadījumā (40. attēls). Līdz ar to mildronāta hroniska lietošana var uzlabot smadzeņu mitohondriju toleranci anoksijas-reoksigenācijas gadījumos.

Mūsu pētījuma rezultāti parādīja nedaudz pazeminātu EKK vērtību normoksijas apstākļos pēc mildronāta lietošanas, kas liecina par daļēju oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšanu. Tas varētu būt par pamatu neironu šūnu aizsardzībai pret hipoksijas izraisītajiem bojājumiem. Literatūrā sastopami dati, ka iepriekšēja sagatavošana stresa situācijai (*preconditioning*) uzlabo smadzeņu un sirds audu izturību pret išēmiju, un šie efekti ir saistīti ar daļēju oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšanu (Dirnagl un Meisel, 2008; Sack, 2006). Vairākos pētījumos parādīts, ka īslaicīga atjūdzēju terapija aizsargā no išēmijas – reperfūzijas izraisītajiem bojājumiem sirds un smadzeņu audos (Korde *et.al.*, 2005; Minners *et.al.*, 2000; Pandya *et.al.*, 2007). Mildronātam audos atrastajā koncentrācijā nav tiešas ietekmes uz elpošanas ķēdes sajūgšanu (Pupure *et.al.*, 2008), kas liek mums secināt, ka fosforilēšanas atjūgšana no elektronu transporta ķēdes (*uncoupling*) ir inducēta netieši. Iespējamais novirzītās protonu plūsmas un oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšanas iemesls varētu būt specifisku atjūdzēju proteīnu (SAP) inducēšana un (vai) adenīnu nukleotīdu translokāžu (ANT) aktivizēšana (Jastroch *et.al.*, 2010). Karboksiatraktilozīds ir specifisks ANT inhibitors, attiecīgi tas kavē ANT atjūdzējo darbību (Parker *et.al.*, 2008). Jau iepriekš ziņots par garo ķēžu taukskābju acil-KoA spēju izraisīt mitohondriju elektronu transporta ķēdes atjūgšanu (Jastroch *et.al.*, 2010); mēs uzskatām, ka arī mildronāta ierosinātā atjūgšana var noritēt, pateicoties paaugstinātai garo ķēžu taukskābju acil-koA koncentrācijai smadzeņu audos. Novērotais skābekļa patēriņa pieaugums stāvoklī-4, specifiskā ANT inhibitora, karboksiatraktilozīda, klātbūtnē norāda uz to, ka mildronāta lietošanas gadījumā oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšana nav saistīta ar ANT aktivitāti. Šis rezultāts kopā

ar novēroto kopējo acil-KoA koncentrācijas pieaugumu norāda uz SAP lomu mildronāta ierosinātajā elektronu transporta ķēdes atjūgšanā.



40. attēls. Mildronāta izraisītā karnitīna koncentrācijas samazinājuma neuroprotektīvais mehānisms. Ar bultām norādīti stimulējoši efekti un koncentrācijas palielināšanās vai inhibējoša ietekme un koncentrācijas samazināšanās.

Pētījums parāda, ka mildronāts izraisa daļēju elpošanas ķēdes atjūgšanu, tādējādi paaugstinot mitohondriju funkcionālo izturību pret samazinātas skābekļa koncentrācijas apstākļiem. Iegūtie rezultāti liecina, ka karnitīna pieejamības regulēšana var tikt izmantota jaunu farmakoloģisku preparātu izstrādei cerebrālās išēmijas un saistīto komplikāciju ārstēšanā.

5. SECINĀJUMI

1. L-karnitīna biosintēzes inhibitors mildronāts samazina brīvā L-karnitīna koncentrāciju žurku sēkliniekos, bet viegli stimulē žurku tēviņu seksuālo aktivitāti un uzlabo spermas kvalitāti.
2. Akūta mildronāta ievadīšana izraisa pretkrampju un antihipnotiskus efektus, kas saistīti ar NO un adrenerģisko ceļu regulāciju, kā arī mildronāta terapija samazina īslaicīgas CCA oklūzijas izraisītās smadzeņu garozas asins plūsmas un skābekļa piesātinājuma izmaiņas.
3. Mildronāta terapija pēc VCAO uzlabo neiroloģisko funkciju atjaunošanos, bet nesamazina bojāto audu apjomu žurku smadzenēs.
4. Mildronāta izraisītais L-karnitīna pieejamības samazinājums izraisa daļēju elektrontransporta atjūgšanu no ATF sintēzes mitohondriju membrānā, tādējādi paaugstinot mitohondriju funkcionālo izturību hipoksijas apstākļos.

6. AIZSTĀVAMĀS TĒZES

1. L-karnitīna samazinājums neietekmē vīriešu seksuālo funkciju. Šī informācija ir nozīmīga klīnikā, vīriešiem ilgstoši lietojot mildronātu tā kardioprotektīvo un anti-išēmisko efektu sasniegšanai.
2. Mildronāta terapija ir ieteicama pacientiem pēcinsulta periodā, lai veicinātu funkcionālo rehabilitāciju.
3. Mūsu rezultāti norāda uz iespējamu mildronāta lietošanas paplašināšanu krampju un akūtas alkohola intoksikācijas gadījumā.
4. L-karnitīna biopieejamības regulēšanu var izmantot jaunu farmakoloģisku preparātu izstrādei cerebrālās išēmijas un ar to saistīto komplikāciju ārstēšanā.

7. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Publikācijas (zinātniskie raksti) par pētījuma tēmu starptautiski recenzētos izdevumos

1. Makrečka M, **Svalbe B**, Volska K, Sevostjanovs E, Liepins J, Grinberga S, Pugovics O, Liepinsh E, Dambrova M, Mildronate, the inhibitor of L-carnitine transport, induces brain mitochondrial uncoupling and protects against anoxia-reoxygenation, *Eur J Pharmacol*, **2014**, 723:55–61.
2. Zvejniece L., **Svalbe B.**, Liepinsh E., Pulks E., Dambrova M. The sensorimotor and cognitive deficits in rats following 90- and 120-min transient occlusion of the middle cerebral artery, *J Neurosci Methods*. **2012**, 208:197–204.
3. **Svalbe B.**, Zvejniece L., Vavers E., Pugovichs O., Muceniece R., Liepinsh E., Dambrova M. Mildronate treatment improves functional recovery following middle cerebral artery occlusion in rats, *Behav Brain Res.*, **2011**, 222:26–32.
4. Zvejniece L., **Svalbe B.**, Makrečka M., Liepinsh E., Kalvinsh I., Dambrova M. Mildronate exerts acute anticonvulsant and antihypnotic effects, *Behav Pharmacol*. **2010**, 21:548–555.
5. Dambrova M., Cirule H., **Svalbe B.**, Zvejniece L., Pugovichs O., Zorenko T., Kalvinsh I., Liepinsh E., Belozertseva I. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance, *Physiol. Behav.*, **2008**, 95:341–347.

Konferenču tēzes par pētījuma tēmu

1. **Svalbe B.**, Zvejniece L., Vavers E., Kisis V., Dambrova M., Time-dependent changes in the behavioral outcomes in rats after transient occlusion of the middle cerebral artery, *45th meeting of the European Brain and Behaviour Society (EBBS)*, Munich Germany, September 6-9, 2013, Abstract Nr.342.
2. **Svalbe B.**, Makrečka M., Volska K., Cirule H., Dambrova M. The effects of L-carnitine biosynthesis inhibitor on brain energetic metabolism, *45th meeting of the European Brain and Behaviour Society (EBBS)*, Munich Germany, September 6-9, 2013, Abstract Nr.186.
3. **Svalbe B.**, Skapare E, Vavers E, Zvejniece L, Dambrova M. Investigation of cognitive function and pain perception in animal models of obesity and type 2 diabetes mellitus, *The International Nutrition and Brain Summer School*, Bordeaux, France, September 3-14, 2012. Abstract Nr.21
4. **Svalbe B.**, Skapare E, Liepinsh E, Vilskersts R, Vavers E, Zvejniece L, Dambrova M. Investigation of macro- and microvascular complications in animal models of obesity and type 2 diabetes mellitus, *8th FENS forum of Neuroscience*, Barcelona, Spain, July 14-18, 2012. Abstract Nr.2295.
5. **Svalbe B.**, Volska K, Skapare E, Makrečka M, Kuka J, Muceniece R, Dambrova M, The effects of L-carnitine biosynthesis inhibitor on brain mitochondrial energy

pathways, *International Conference in Pharmacology*, Riga, Latvia, April 20-21, 2012, Abstract book, P.58.

6. Zvejniece L, **Svalbe B**, Pulks E, Liepinsh E., Dambrova M, Mildronate treatment improves functional recovery following ischemic stroke in rats, *7th International Congress on Vascular Dementia*, Riga, Latvia, October 20 – 23, 2011. Abstract book, P. 377.
7. **Svalbe B.**, Grinberga S., Veinberg G., Dambrova M., Zvejniece L., Comparative pharmacological activity of optical isomers of phenotropil, *43rd European Brain and Behaviour Society Meeting*, Seville, Spain, 9–12 September, 2011, Abstract book, P. 146
8. **Svalbe B.**, Zvejniece L., Grinberga S., Liepinsh E., Dambrova M., Neuroprotective action of mildronate, an inhibitor of L-carnitine biosynthesis, after acute and chronic administration in rats, *The 8th IBRO World Congress*, Florence, Italy, 14–18 July, 2011, Abstract book, P. D443.
9. **Svalbe B.**, Zvejniece L., Liepinsh E., Dambrova M., Acute and chronic CNS effects of mildronate, an inhibitor of L-carnitine biosynthesis, *11th Young Scientist Forum and 36th FEBS Congress - Biochemistry for tomorrow's medicine*, Torino, Italy, 23–30 June, 2011, Abstract book, P. 481
10. **Svalbe B**, Muceniece R, Vavers E, Liepinsh E, Zvejniece L, The antihypnotic and antihypoxic effects of mildronate, *16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology*, Copenhagen, Denmark, July 17-23, 2010, Abstract book, P. 598.
11. **Svalbe B**, Muceniece R, Liepinsh E, Dambrova M, Zvejniece L, L-carnitine regulator - mildronate exerts acute anticonvulsant and antihypnotic effects, *35th FEBS Congress - Molecules of life*, Gothenburg, Sweden, June 26 – July 1, 2010, Abstract book, P. 79.
12. Zvejniece L, **Svalbe B**, Dambrova M, Antihypnotic action of an inhibitor of L-carnitine biosynthesis, *Satellite symposium „Oxygen in Health and Disease” of COST Action „Hypoxia sensing, signalling and adaptation”*, Smolenice, Slovakia, June 15-18, 2010.

Ziņojumi kongresos un konferencēs

1. **Švalbe B**, Makrecka M, Voļska K, Cīrule H, Muceniece R, Dambrova M, L-karnitīna biosintēzes inhibitora mildronāta ietekme uz smadzeņu mitohondriju funkciju. LU 72. zinātniskā konference, Medicīnas sekcija, Rīga, Latvija, 14. februāris 2014. gadā. Tēzes 22 – 23 lpp.
2. Kīsis V., Zvejniece L., **Švalbe B.**, Vāvers E., Liepiņš E., Mauriņa B., Dambrova M., Sensorimotorās darbības un atmiņas traucējumi pēc 90 un 120 minūšu pārejošās vidējās cerebrālās artērijas oklūzijas žurkās, *RSU 2013. gada zinātniskā konference, Bioloģisko novecošanās procesu faktori un dzīves kvalitāte Latvijas populācijā*, Rīga, Latvija, 21.-22. marts, 2013, Tēzes, 35.lpp.
3. **Švalbe B.**, Ošeniece B., Muceniece R., Zvejniece L., L-karnitīna koncentrāciju samazinošā aģenta efekti išēmiska smadzeņu insulta eksperimentālajā modelī *in vivo.*, *LU 69. zinātniskā konference, Medicīnas sekcija*, Rīga, Latvija, 3.febr., 2011, 14 lpp.

8. PATEICĪBAS

Vārdiem nav izsakāma pateicība manai lieliskajai zinātniskā darba vadītājai asoc. prof. *Dr. pharm.* Maijai Dambrovai par doto iespēju, atbalstu, palīdzību un vērtīgiem padomiem promocijas darba tapšanā, kā arī par neatslābstošo interesi par darba progresu. Es augsti novērtēju to, ka, sākot jau ar pirmo publikāciju, tiku aktīvi iesaistīta tās tapšanas procesā un varēju izteikt viedokli par iegūto rezultātu atspoguļošanu.

Liels paldies manai LU Medicīnas fakultātes promocijas darba vadītājai prof. *Dr. habil. biol.* Rutai Mucenieci par padomiem, ieteikumiem un brīnišķīgajām atsauksmēm.

Promocijas darbu nebūtu iespējams realizēt bez lielisko kolēģu līdzdalības un atbalsta. Pateicos dzīvnieku uzvedības un neirofizioloģijas speciālistei Līgai Zvejnieci par metožu iemācīšanu, zinātniskajām diskusijām. Paldies Edgaram Liepiņam par pirmajiem soļiem pipetēšanas apgūšanā un entuziasma uzturēšanā, par meistarīgajām fotogrāfijām. Pateicos: Helēnai Cīrulei un Ligitai Kariņai par lielisko sadarbību un jautriem brīžiem, vērojot žurku tēviņus sarkanā apgaismojumā, imunoblota un RT-PKĀR analīzes speciālistei Elīnai Makarovai par pedantiski precīzu izpildījumu, Marinai Makreckai un Kristīnei Voļskai par teicamo smadzeņu mitohondriju elpināšanu, 106. istabas „brālīšiem” Reinim Vilšķērstam par uzmundrinošiem vārdiem un Jānim Kūkam par padomiem grafisko attēlu noformēšanā, bioķīmisko reakciju entuziastam Edijam Vāveram par atbalstu, izpalīdzīgajiem asistentiem Rūdfam Mežapuķem, Olgai Žarkovai-Malkovai un Raitai Brikmanei. Paldies mazajiem, pūkainajiem draugiem grauzējiem.

Paldies, analītikas meistariem *Dr. chem.* O. Pugovičam, *Dr. chem.* S. Grīnbergai un *MSc.* E. Sevostjanovam.

Pateicos Latvijas Organiskās sintēzes institūta vadībai, īpaši direktoram Ivaram Kalviņam par iespēju izstrādāt disertāciju.

Mīļš paldies maniem vecākiem un vecvecākiem, radniekiem par audzināšanu, skološanu un atbalstu. Īpašs paldies Jānim par pacietību un urķīgajiem jautājumiem par zinātņi arī mājās. Liels paldies manam bioloģijas skolotājam Gunāram Cakulam-Strodam par lieliskajām bioloģijas stundām.

Paldies *L'Oreal* stipendijai "Sievietēm zinātnē", UNESCO Latvijas Nacionālajai komisijai un Latvijas Zinātņu akadēmijai par finansiālu atbalstu pētījuma veikšanai. Materiālu iegādi finansēja Valsts pētījumu programmas BIOMEDICINE apakšprojekts „Diabēta komplikāciju izpēte un kardiovaskulāro preparātu bioloģiskā aktivitāte”. Promocijas darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta “Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” finansiālu atbalstu.

9. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- Abdul Muneer PM, Alikunju S, Szlachetka AM, Haorah J (2011) Inhibitory effects of alcohol on glucose transport across the blood-brain barrier leads to neurodegeneration: preventive role of acetyl-L-carnitine. *Psychopharmacology (Berl)*, 214:707-718.
- Agarwal A, Said TM (2004) Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online*, 8:376-384.
- Agmo A (1997) Male rat sexual behavior. *Brain Res Brain Res Protoc*, 1:203-209.
- Akahira M, Hara A, Abiko Y (1997) Effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on myocardial derangements induced by hydrogen peroxide in the isolated perfused rat heart. *Fundam Clin Pharmacol*, 11:356-364.
- Augustyniak A, Skrzydlewska E (2009) L-Carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress. *Alcohol*, 43:217-223.
- Baarine M, Ragot K, Athias A, Nury T, Kattan Z, Genin EC, Andreoletti P, Menetrie, F, Riedinger JM, Bardou M, Lizard G (2012) Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-alpha on oligodendrocytes and astrocytes. *Neurotoxicology*, 33:212-228.
- Badawy RA, Vogrin SJ, Lai A, Cook MJ (2013) The cortical excitability profile of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 54:1942-1949.
- Bailey JA, Lahiri DK (2012) Chromatographic separation of reaction products from the choline acetyltransferase and carnitine acetyltransferase assay: differential ChAT and CrAT activity in brain extracts from Alzheimer's disease versus controls. *J Neurochem*, 122:672-680.
- Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M (2005) Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril*, 84:662-671.
- Beal MF (2003) Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S39-S47.
- Bednar MM (2008) The role of sildenafil in the treatment of stroke. *Curr Opin Investig Drugs*, 9:754-759.
- Beketov AI, Mametova AN, Polevik IV, Sapegin ID (2000) Comparative characteristics of cerebrovascular protective effects of mildronate, riboxine, and their combination during modeling of cerebral hemodynamics disturbance. *Eksp Klin Farmakol*, 63:18-21.
- Benelli A, Bertolini A, Poggioli R, Cavazzuti E, Calza L, Giardino L, Arletti R (1995) Nitric oxide is involved in male sexual behavior of rats. *Eur J Pharmacol*, 294:505-510.
- Berezowski V, Miecz D, Marszalek M, Broer A, Broer S, Cecchelli R, Nalecz KA (2004) Involvement of OCTN2 and B0,+ in the transport of carnitine through an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 91:860-872.
- Bieber LL (1988) Carnitine. *Annu Rev Biochem*, 57:261-283.
- Binienda Z, Przybyla-Zawislak B, Virmani A, Schmued L (2005) L-carnitine and neuroprotection in the animal model of mitochondrial dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, 1053:174-182.

- Binienda ZK (2003) Neuroprotective effects of L-carnitine in induced mitochondrial dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, 993:289-295.
- Binienda ZK, Beaudoin MA, Gough B, Ali SF, Virmani A (2010) Assessment of 3-nitropropionic acid-evoked peripheral neuropathy in rats: neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine and resveratrol. *Neurosci Lett*, 480:117-121.
- Blachnio-Zabielska AU, Koutsari C, Jensen MD (2011) Measuring long-chain acyl-coenzyme A concentrations and enrichment using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 25:2223-2230.
- Borlongan CV, Cahill DW, Sanberg PR (1995) Locomotor and passive avoidance deficits following occlusion of the middle cerebral artery. *Physiol Behav*, 58:909-917.
- Bowtell JL, Marwood S, Bruce M, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL (2007) Tricarboxylic acid cycle intermediate pool size: functional importance for oxidative metabolism in exercising human skeletal muscle. *Sports Med*, 37:1071-1088.
- Brambilla DJ, Matsumoto AM, Araujo AB, McKinlay JB (2009) The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 94:907-913.
- Brede M, Braeuninger S, Langhauser F, Hein L, Roewer N, Stoll G, Kleinschnitz C (2011) alpha(2)-adrenoceptors do not mediate neuroprotection in acute ischemic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31:e1-e7.
- Bresolin N, Freddo L, Vergani L, Angelini C (1982) Carnitine, carnitine acyltransferases, and rat brain function. *Exp Neurol*, 78:285-292.
- Bruveris Z, Antane V, Misane I, Rimeicans J, Lusic I, Auzans A, Mangale M, Mednis A, Stonans I (2013) Effects of meldonium on sexual performance, sperm motility, testes morphology and blood biochemical markers in boars. *Anim Reprod Sci*, 136:303-309.
- Burda J, Hernandez VM, Danielisova V, Nemethova M, Montoliu C, Felipo V (2009) Effect of L-carnitine on postischemic inhibition of protein synthesis in the rat brain. *Gen Physiol Biophys*, 28:242-248.
- Bykov I, Jarvelainen H, Lindros K (2003) L-carnitine alleviates alcohol-induced liver damage in rats: role of tumour necrosis factor-alpha. *Alcohol Alcohol*, 38:400-406.
- Calvani M, Reda E, Arrigoni-Martelli E (2000) Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions. *Basic Res Cardiol*, 95:75-83.
- Capaldo B, Napoli R, Di BP, Albano G, Sacca L (1991) Carnitine improves peripheral glucose disposal in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 14:191-195.
- Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*, 2:396-409.
- Carrasco P, Sahun I, McDonald J, Ramirez S, Jacas J, Gratacos E, Sierra AY, Serra D, Herrero L, Acker-Palmer A, Hegardt FG, Dierssen M, Casals N (2012) Ceramide levels regulated by carnitine palmitoyltransferase 1C control dendritic spine maturation and cognition. *J Biol Chem*, 287:21224-21232.
- Carter AL, Abney TO, Braver H, Chuang AH (1987) Localization of gamma-butyrobetaine hydroxylase in the rat testis. *Biol Reprod*, 37:68-72.

- Cavallini G, Caracciolo S, Vitali G, Modenini F, Biagiotti G (2004a) Carnitine versus androgen administration in the treatment of sexual dysfunction, depressed mood, and fatigue associated with male aging. *Urology*, 63:641-646.
- Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G (2004b) Cinnoxicam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl*, 25:761-770.
- Cederblad G (1987) Effect of diet on plasma carnitine levels and urinary carnitine excretion in humans. *Am J Clin Nutr*, 45:725-729.
- Cha S & Parks Re Jr (1964) Succinic thiokinase I purification of the enzyme from prig heart. *J Biol Chem*, 239:1961-1967.
- Collino M, Patel NS, Thiemermann C (2008) PPARs as new therapeutic targets for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2:179-197.
- Corbucci GG, Melis A, Piga M, Marchionni A, Calvani M (1992) Influence of acetyl-carnitine on some mitochondrial enzymic activities in the human cerebral tissue in conditions of acute hypoxia. *Int J Tissue React*, 14:183-194.
- Costa M, Canale D, Filicori M, D'iddio S, Lenzi A (1994) L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. Italian Study Group on Carnitine and Male Infertility. *Andrologia*, 26:155-159.
- Cremer CM, Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Schleicher A, Speckmann EJ, Zilles K (2009) Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 163:490-499.
- Dai Y, Wolfgang MJ, Cha SH, Lane MD (2007) Localization and effect of ectopic expression of CPT1c in CNS feeding centers. *Biochem Biophys Res Commun*, 359:469-474.
- Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I (2002) Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 12:275-279.
- De Sarro GB, Donato Di PE, De SA, Vidal MJ (1991) Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid-induced seizures from the deep prepiriform cortex. *Fundam Clin Pharmacol*, 5:503-511.
- De AC, Scarfo C, Falcinelli M, Perna E, Reda E, Ramacci MT, Angelucci L (1994) Acetyl-L-carnitine prevents age-dependent structural alterations in rat peripheral nerves and promotes regeneration following sciatic nerve injury in young and senescent rats. *Exp Neurol*, 128:103-114.
- Degrace P, Demizieux L, Du ZY, Gresti J, Caverot L, Djaouti L, Jourdan T, Moindrot B, Guillaud JC, Hocquette JF, Clouet P (2007) Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem*, 282:20816-20826.
- Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Tsoko M, Andre A, Demaison L, Clouet P (2004) Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. *Mol Cell Biochem*, 258:171-182.
- Demarquoy J, Georges B, Rigault C, Royer M, Clairet A, Soty M, Lekounougou S, Le Borgne F (2004) Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chem*, 86:137-142.
- DeWitt DS, Prough DS (2003) Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma*, 20:795-825.
- Dhar PK, Grupp IL, Schwartz A, Grupp G, Matlib MA (1996) Reduction of Carnitine Content by Inhibition of Its Biosynthesis Results in Protection of Isolated

- Guinea Pig Hearts Against Hypoxic Damage. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 1:235-242.
- Dhitavat S, Ortiz D, Shea TB, Rivera ER (2002) Acetyl-L-carnitine protects against amyloid-beta neurotoxicity: roles of oxidative buffering and ATP levels. *Neurochem Res*, 27:501-505.
- Dhote V, Balaraman R (2008) Anti-oxidant activity mediated neuroprotective potential of trimetazidine on focal cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35:630-637.
- Ding Y, Li J, Lai Q, Rafols JA, Luan X, Clark J, Diaz FG (2004) Motor balance and coordination training enhances functional outcome in rat with transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience*, 123:667-674.
- Dirnagl U, Meisel A (2008) Endogenous neuroprotection: mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology*, 55:334-344.
- Draski L, Deitrich R (1993) Initial effects of ethanol on the central nervous system. In *Pharmacological Effects of Ethanol on the Nervous System*. ed. Deitrich,R. & Erwin,V. pp. 227-249. CRC Press: Boca Raton.
- Dziak LA, Golik VA (2003) [Use of mildronate for the treatment of patients with circulatory encephalopathy against a background of stenosis of major arteries of the head]. *Lik Sprava*, 98-101.
- Dzintare M (2004) Changes of concentration of nitric oxide in tissues under action of different pharmacological agents. *University of Latvia*. 76.
- Dzintare M, Baumanė L, Merirena D, Lauberte L, Kalvins I, Sjakste N (2002) Involvement of Nitric Oxide Production in the Mildronate Mechanism of Action. *Pharmacology Reviews and Communications*. 12:1-8.
- Encarnacion A, Horie N, Keren-Gill H, Bliss TM, Steinberg GK, Shamloo M (2011) Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. *J Neurosci Methods*, 196:247-257.
- Escobar EL, Gomes-Marcondes MC, Carvalho HF (2009) Dietary fatty acid quality affects AR and PPARgamma levels and prostate growth. *Prostate*, 69:548-558.
- Esser V, Britton CH, Weis BC, Foster DW, McGarry JD (1993) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase I. Direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function. *J Biol Chem*, 268:5817-5822.
- Evans AM, Fornasini G (2003) Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet*, 42:941-967.
- Fariello RG, Ferraro TN, Golden GT, DeMattei M (1988) Systemic acetyl-L-carnitine elevates nigral levels of glutathione and GABA. *Life Sci*, 43:289-292.
- Fariello RG, Shug AL (1981) Competitive inhibition by 3-aminopropanesulfonic acid and gamma-aminobutyric acid of carnitine transport in rat brain slices. *Biochem Pharmacol*, 30:1012-1013.
- Farkas V, Bock I, Cseko J, Sandor A (1996) Inhibition of carnitine biosynthesis by valproic acid in rats--the biochemical mechanism of inhibition. *Biochem Pharmacol*, 52:1429-1433.
- Ferraz MR, Ferraz MM, Santos R, de Moura RS (2003) Preventing L-NAME inhibitory effects on rat sexual behavior with hydralazine, isradipine or captopril co-treatment. *Pharmacol Biochem Behav*, 75:265-272.
- Filipek PA, Juranek J, Nguyen MT, Cummings C, Gargus JJ (2004) Relative carnitine deficiency in autism. *J Autism Dev Disord*, 34:615-623.

- Foster DW (2004) The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 1033:1-16.
- Freret T, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Boulouard M (2006) Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behav Neurosci*, 120:1285-1298.
- Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M, Bouet V (2011) On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside. *Exp Transl Stroke Med*, 3:6.
- Ganapathy ME, Huang W, Rajan DP, Carter AL, Sugawara M, Iseki K, Leibach FH, Ganapathy V (2000) beta-lactam antibiotics as substrates for OCTN2, an organic cation/carnitine transporter. *J Biol Chem*, 275:1699-1707.
- Gao S, Zhu G, Gao X, Wu D, Carrasco P, Casals N, Hegardt FG, Moran TH, Lopaschuk GD (2011) Important roles of brain-specific carnitine palmitoyltransferase and ceramide metabolism in leptin hypothalamic control of feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:9691-9696.
- Garzya G, Corallo D, Fiore A, Lecciso G, Petrelli G, Zotti C (1990) Evaluation of the effects of L-acetylcarnitine on senile patients suffering from depression. *Drugs Exp Clin Res*, 16:101-106.
- Ghoshal AK, Guo T, Soukhova N, Soldin SJ (2005) Rapid measurement of plasma acylcarnitines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization. *Clin Chim Acta*, 358:104-112.
- Godinez-Rubi M, Rojas-Mayorquin AE, Ortuno-Sahagun D (2013) Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid Med Cell Longev*, 2013:297-357.
- Goety CG, Tanner CM, Cohen JA, Thelen JA, Carroll VS, Klawans HL, Fariello RG (1990) L-acetyl-carnitine in Huntington's disease: double-blind placebo controlled crossover study of drug effects on movement disorder and dementia. *Mov Disord*, 5:263-265.
- Goncalves S, Paupe V, Dassa EP, Briere JJ, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP, Benit P, Rustin P (2010) Rapid determination of tricarboxylic acid cycle enzyme activities in biological samples. *BMC Biochem*, 11:5.
- Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Prager D, Haney J, Moritz KU, Meissner K, Roskopf D, Eckel L, Bohm M, Jedlitschky G, Kroemer HK (2006) Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*, 113:1114-1122.
- Gupta YK, Sinha K, Chaudhary G (2002) Transient focal ischemia induces motor deficit but does not impair the cognitive function in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *J Neurol Sci*, 203-204:267-271.
- Hayashi Y, Muranaka Y, Kirimoto T, Asaka N, Miyake H, Matsuura N (2000) Effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on tissue carnitine and lipid levels in rats. *Biol Pharm Bull*, 23:770-773.
- Haynes CA, Allegood JC, Sims K, Wang EW, Sullards MC, Merrill AH Jr (2008) Quantitation of fatty acyl-coenzyme A in mammalian cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*, 49:1113-1125.
- Herrmann WM, Dietrich B, Hiersemenzel R (1990) Pharmacoelectroencephalographic and clinical effects of the cholinergic substance--

- acetyl-L-carnitine--in patients with organic brain syndrome. *Int J Clin Pharmacol Res*, 10:81-84.
- Herzmann C, Johnson MA, Youle M (2005) Long-term effect of acetyl-L-carnitine for antiretroviral toxic neuropathy. *HIV Clin Trials*, 6:344-350.
- Hoffman WE, Kochs E, Werner C, Thomas C, Albrecht RF (1991) Dexmedetomidine improves neurologic outcome from incomplete ischemia in the rat. Reversal by the alpha 2-adrenergic antagonist atipamezole. *Anesthesiology*, 75:328-332.
- Homayoun H, Khavandgar S, Namiranian K, Gaskari SA, Dehpour AR (2002) The role of nitric oxide in anticonvulsant and proconvulsant effects of morphine in mice. *Epilepsy Res*, 48:33-41.
- Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH (2001) Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther*, 298:986-995.
- Hudzik TJ, Borrelli A, Bialobok P, Widzowski D, Sydserff S, Howell A, Gendron P, Corbett D, Miller J, Palmer GC (2000) Long-term functional end points following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 65:553-562.
- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci*, 17:9157-9164.
- Ido Y, McHowat J, Chang KC, Arrigoni-Martelli E, Orfalian Z, Kilo C, Corr PB, Williamson JR (1994) Neural dysfunction and metabolic imbalances in diabetic rats. Prevention by acetyl-L-carnitine. *Diabetes*, 43:1469-1477.
- Imperato A, Ramacci MT, Angelucci L (1989) Acetyl-L-carnitine enhances acetylcholine release in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats. *Neurosci Lett*, 107:251-255.
- Iqbal S, Baziany A, Hussain M, James S, Wright S, Hemmings S, Shuaib A, Rajput A (2002) Trimetazidine as a potential neuroprotectant in transient global ischemia in gerbils: a behavioral and histological study. *Brain Res*, 928:1-7.
- Jackson G, Rosen RC, Kloner RA, Kostis JB (2006) The second Princeton consensus on sexual dysfunction and cardiac risk: new guidelines for sexual medicine. *J Sex Med*, 3:28-36.
- Jalal FY, Bohlke M, Maher TJ (2010) Acetyl-L-carnitine reduces the infarct size and striatal glutamate outflow following focal cerebral ischemia in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 1199:95-104.
- Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD (2010) Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*, 47:53-67.
- Jolkkonen J, Gallagher NP, Zilles K, Sivenius J (2003) Behavioral deficits and recovery following transient focal cerebral ischemia in rats: glutamatergic and GABAergic receptor densities. *Behav Brain Res*, 138:187-200.
- Jolkkonen J, Puurunen K, Rantakomi S, Harkonen A, Haapalinna A, Sivenius J (2000) Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Pharmacol*, 400:211-219.
- Jones LL, McDonald DA, Borum PR (2010) Acylcarnitines: role in brain. *Prog Lipid Res*, 49:61-75.
- Kalvinsh I, Veveris M, Birmans A (2003) Pharmaceutical composition comprising gamma-butyrobetaine for stimulating the sexual activity and potency, WO/2003/022263.

- Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD (2000) 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*, 86:580-588.
- Keating DJ (2008) Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, regulation of exocytosis and their relevance to neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 104:298-305.
- Khan-Siddiqui L, Bamji MS (1980) Plasma carnitine levels in adult males in India: effects of high cereal, low fat diet, fat supplementation, and nutrition status. *Am J Clin Nutr*, 33:1259-1263.
- Kido Y, Tamai I, Ohnari A, Sai Y, Kagami T, Nezu J, Nikaido H, Hashimoto N, Asano M, Tsuji A (2001) Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 79:959-969.
- Kim SW, Jin Y, Shin JH, Kim ID, Lee HK, Park S, Han PL, Lee JK (2012) Glycyrrhizic acid affords robust neuroprotection in the postischemic brain via anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB1 phosphorylation and secretion. *Neurobiol Dis*, 46:147-156.
- Klusa V, Muceniece R, Isajevs S, Isajeva D, Beitnere U, Mandrika I, Pupure J, Rumaks J, Jansone B, Kalvinsh I, Vinters HV (2013) Mildronate enhances learning/memory and changes hippocampal protein expression in trained rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 106:68-76.
- Klusa VZ, Isajevs S, Svirina D, Pupure J, Beitnere U, Rumaks J, Svirskis S, Jansone B, Dzirkale Z, Muceniece R, Kalvinsh I, Vinters HV (2010) Neuroprotective properties of mildronate, a small molecule, in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*, 11:4465-4487.
- Korde AS, Sullivan PG, Maragos WF (2005) The uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial homeostasis following striatal quinolinic acid injections. *J Neurotrauma*, 22:1142-1149.
- Koudelova J, Mourek J, Drahotka Z, Rauchova H (1994) Protective effect of carnitine on lipoperoxide formation in rat brain. *Physiol Res*, 43:387-389.
- Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem*, 279:4127-4135.
- Kuhmonen J, Haapalinna A, Sivenius J (2001) Effects of dexmedetomidine after transient and permanent occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neural Transm*, 108:261-271.
- Kuka J, Vilskersts R, Cirule H, Makrecka M, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M, Liepinsh E (2012) The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 17:215-222.
- Kumar R, Gautam G, Gupta NP (2006) Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *J Urol*, 176:1307-1312.
- Kuratsune H, Yamaguti K, Lindh G, Evengard B, Hagberg G, Matsumura K, Iwase M, Onoe H, Takahashi M, Machii T, Kanakura Y, Kitani T, Langstrom B, Watanabe Y (2002) Brain regions involved in fatigue sensation: reduced acetylcarnitine uptake into the brain. *Neuroimage*, 17:1256-1265.
- Kuwajima M, Harashima H, Hayashi M, Ise S, Sei M, Lu K, Kiwada H, Sugiyama Y, Shima K (1999) 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*, 289:93-102.
- Kuzin BM, Kolesnikova TI (1999) The neurotropic effect of aplegin (carnitine) in cerebral hypoxia. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 99:27-32.
- Lennon DL, Shrago ER, Madden M, Nagle FJ, Hanson P (1986) Dietary carnitine intake related to skeletal muscle and plasma carnitine concentrations in adult men and women. *Am J Clin Nutr*, 43:234-238.
- Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, Gandini L (2003) Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril*, 79:292-300.
- Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, Santulli M, Agarwal A, Gandini L (2004) A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril*, 81:1578-1584.
- Li K, Li W, Huang Y (2007) Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility. *Clin Chim Acta*, 378:159-163.
- Li SY, Liu Y, Sigmon VK, McCort A, Ren J (2005) High-fat diet enhances visceral advanced glycation end products, nuclear O-Glc-Nac modification, p38 mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis. *Diabetes Obes Metab*, 7:448-454.
- Li YS, Shemmer B, Stone E, Nardi A, Jonas S, Quartermain D (2013) Neuroprotection by inhaled nitric oxide in a murine stroke model is concentration and duration dependent. *Brain Res*, 1507:134-145.
- Liepinsh E, Konrade I, Skapare E, Pugovics O, Grinberga S, Kuka J, Kalvinsh I, Dambrova M (2011) Mildronate treatment alters gamma-butyrobetaine and l-carnitine concentrations in healthy volunteers. *J Pharm Pharmacol*, 63:1195-1201.
- Liepinsh E, Kuka J, Svalbe B, Vilskersts R, Skapare E, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M (2009a) Effects of long-term mildronate treatment on cardiac and liver functions in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 105:387-394.
- Liepinsh E, Skapare E, Kuka J, Makrecka M, Cirule H, Vavers E, Sevostjanovs E, Grinberga S, Pugovics O, Dambrova M (2013) Activated peroxisomal fatty acid metabolism improves cardiac recovery in ischemia-reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 386:541-550.
- Liepinsh E, Skapare E, Vavers E, Konrade I, Strele I, Grinberga S, Pugovics O, Dambrova M (2012) High L-carnitine concentrations do not prevent late diabetic complications in type 1 and 2 diabetic patients. *Nutr Res*, 32:320-327.
- Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D, Kirjanova O, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M (2006) Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 48:314-319.
- Liepinsh E, Vilskersts R, Skapare E, Svalbe B, Kuka J, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M (2008) Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*, 83:613-619.
- Liepinsh E, Vilskersts R, Zvejniece L, Svalbe B, Skapare E, Kuka J, Cirule H, Grinberga S, Kalvinsh I, Dambrova M (2009b) Protective effects of

- mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Br J Pharmacol*, 157:1549-1556.
- Lindner MD, Gribkoff VK, Donlan NA, Jones TA (2003) Long-lasting functional disabilities in middle-aged rats with small cerebral infarcts. *J Neurosci*, 23:10913-10922.
- Liu J, Atamna H, Kuratsune H, Ames BN (2002) Delaying brain mitochondrial decay and aging with mitochondrial antioxidants and metabolites. *Ann N Y Acad Sci*, 959:133-166.
- Lolic MM, Fiskum G, Rosenthal RE (1997) Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine after stroke in rats. *Ann Emerg Med*, 29:758-765.
- Lombard KA, Olson AL, Nelson SE, Rebouche CJ (1989) Carnitine status of lactoovo vegetarians and strict vegetarian adults and children. *Am J Clin Nutr*, 50:301-306.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20:84-91.
- Lopaschuk GD (2001) Optimizing cardiac energy metabolism: how can fatty acid and carbohydrate metabolism be manipulated? *Coron Artery Dis*, 12:Suppl 1, S8-11.
- Loscher W, Honack D, Fassbender CP, Nolting B (1991) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. *Epilepsy Res*, 8:171-189.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Lubritz D, Johnson B, Robison OW (1991) Genetic parameters for testosterone production in boars. *J Anim Sci*, 69:3220-3224.
- Luszczki JJ, Zuchora M, Sawicka KM, Kozinska J, Czuczwar SJ (2006) Acute exposure to caffeine decreases the anticonvulsant action of ethosuximide, but not that of clonazepam, phenobarbital and valproate against pentetrazole-induced seizures in mice. *Pharmacol Rep*, 58:652-659.
- Ma J, Zhao L, Nowak TS Jr (2006) Selective, reversible occlusion of the middle cerebral artery in rats by an intraluminal approach. Optimized filament design and methodology. *J Neurosci Methods*, 156:76-83.
- Ma W, Berg J, Yellen G (2007) Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening K(ATP) channels. *J Neurosci*, 27:3618-3625.
- Maeda T, Goto A, Kobayashi D, Tamai I (2007) Transport of organic cations across the blood-testis barrier. *Mol Pharm*, 4:600-607.
- Makar TK, Cooper AJ, Tofel-Grehl B, Thaler HT, Blass JP (1995) Carnitine, carnitine acetyltransferase, and glutathione in Alzheimer brain. *Neurochem Res*, 20:705-711.
- Makinen S, Kekarainen T, Nystedt J, Liimatainen T, Huhtala T, Narvanen A, Laine J, Jolkkonen J (2006) Human umbilical cord blood cells do not improve sensorimotor or cognitive outcome following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, 1123:207-215.
- Malaguarnera M, Bella R, Vacante M, Giordano M, Malaguarnera G, Gargante MP, Motta M, Mistretta A, Rampello L, Pennisi G (2011) Acetyl-L-carnitine reduces depression and improves quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Scand J Gastroenterol*, 46:750-759.
- Malaguarnera M, Cammalleri L, Gargante MP, Vacante M, Colonna V, Motta M (2007) L-Carnitine treatment reduces severity of physical and mental fatigue

- and increases cognitive functions in centenarians: a randomized and controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr*, 86:1738-1744.
- Malaguarnera M, Gargante MP, Cristaldi E, Vacante M, Risino C, Cammalleri L, Pennisi G, Rampello L (2008) Acetyl-L-carnitine treatment in minimal hepatic encephalopathy. *Dig Dis Sci*, 53:3018-3025.
- Malaguarnera M, Risino C, Cammalleri L, Malaguarnera L, Astuto M, Vecchio I, Rampello L (2009) Branched chain amino acids supplemented with L-acetylcarnitine versus BCAA treatment in hepatic coma: a randomized and controlled double blind study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21:762-770.
- Mancuso C, Bates TE, Butterfield DA, Calafato S, Cornelius C, De LA, Dinkova Kostova AT, Calabrese V (2007) Natural antioxidants in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 16:1921-1931.
- Mandhane SN, Aavula K, Rajamannar T (2007) Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. *Seizure*, 16:636-644.
- Maresova D, Rauchova H, Jandova K, Valkounova I, Koudelova J, Trojan S (2001) Carnitine pretreatment can partially change the excitability of the immature nervous tissue. *Physiol Res*, 50:439-442.
- Marson J, Meuris S, Cooper RW, Jouannet P (1991) Puberty in the male chimpanzee: progressive maturation of semen characteristics. *Biol Reprod*, 44:448-455.
- Matecki S, Py G, Lambert K, Peyreigne C, Mercier J, Prefaut C, Ramonatxo M (2002) Effect of prolonged undernutrition on rat diaphragm mitochondrial respiration. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 26:239-245.
- Matsuoka M, Igisu H (1992) Preservation of energy metabolites by carnitine in the mouse brain under ischemia. *Brain Res*, 590:334-336.
- McDaniel MA, Maier SF, Einstein GO (2003) "Brain-specific" nutrients: a memory cure? *Nutrition*, 19:957-975.
- Meldrum BS (1975) Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol*, 17:1-36.
- Mera P, Bentebibel A, Lopez-Vinas E, Cordente AG, Gurunathan C, Sebastian D, Vazquez I, Herrero L, Ariza X, Gomez-Puertas P, Asins G, Serra D, Garcia J, Hegardt FG (2009) C75 is converted to C75-CoA in the hypothalamus, where it inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 and decreases food intake and body weight. *Biochem Pharmacol*, 77:1084-1095.
- Meyer K, Korz V (2013) Age dependent differences in the regulation of hippocampal steroid hormones and receptor genes: relations to motivation and cognition in male rats. *Horm Behav*, 63:376-384.
- Mingrone G (2004) Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 1033:99-107.
- Minners J, van den Bos EJ, Yellon DM, Schwalb H, Opie LH, Sack MN (2000) Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 47:68-73.
- Montgomery SA, Thal LJ, Amrein R (2003) Meta-analysis of double blind randomized controlled clinical trials of acetyl-L-carnitine versus placebo in the treatment of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Int Clin Psychopharmacol*, 18:61-71.
- Moraes E Luz EW, Vieira LR, Semedo JG, Bona SR, Forgiarini LF, Pereira P, Cavalcante AA, Marroni NA, Picada JN (2013) Neurobehavioral effects of l-carnitine and its ability to modulate genotoxicity and oxidative stress biomarkers in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 110C:40-45.

- Morano S, Mandosi E, Fallarino M, Gatti A, Tiberti C, Sensi M, Gandini L, Buchetti B, Lenti L, Jannini EA, Lenzi A (2007) Antioxidant treatment associated with sildenafil reduces monocyte activation and markers of endothelial damage in patients with diabetic erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. *Eur Urol*, 52:1768-1774.
- Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillement J (2001) Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 49:151-174.
- Mroczkowska JE, Roux FS, Nalecz MJ, Nalecz KA (2000) Blood-brain barrier controls carnitine level in the brain: a study on a model system with RBE4 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 267:433-437.
- Mullinax TR, Mock JN, McEvily AJ, Harrison JH (1982) Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase. Evidence for an allosteric citrate-binding site. *J Biol Chem*, 257:13233-13239.
- Nakanishi T, Hatanaka T, Huang W, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy ME, Ganapathy V (2001) Na⁺- and Cl⁻-coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB(0,+)_{ASCT2} from mouse colon expressed in HRPE cells and *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 532:297-304.
- Nakano T, Okamoto H (2009) Dexmedetomidine-induced cerebral hypoperfusion exacerbates ischemic brain injury in rats. *J Anesth*, 23:378-384.
- Nalecz KA, Korzon D, Wawrzencyk A, Nalecz MJ (1995) Transport of carnitine in neuroblastoma NB-2a cells. *Arch Biochem Biophys*, 322:214-220.
- Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS (2004) The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann N Y Acad Sci*, 1033:177-188.
- Nidhi G, Balakrishnan S, Pandhi P (1999) Role of nitric oxide in electroshock and pentylenetetrazole seizure threshold in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 21:609-612.
- Nieradko-Iwanicka B, Borzecki A (2008) Effect of cypermethrin on memory, movement activity and coordination in mice after transient incomplete cerebral ischemia. *Pharmacol Rep*, 60:699-705.
- Obici, S, Feng, Z, Arduini, A, Conti, R & Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med*, 9, 756-761.
- Ottani A, Giuliani D, Ferrari F (2002) Modulatory activity of sildenafil on copulatory behaviour of both intact and castrated male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 72:717-722.
- Palay SL (1956) Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol*, 2:193-202.
- Pandya JD, Pauly JR, Nukala VN, Sebastian AH, Day KM, Korde AS, Maragos WF, Hall ED, Sullivan PG (2007) Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. *J Neurotrauma*, 24:798-811.
- Panter RA, Mudd JB (1969) Carnitine levels in some higher plants. *FEBS Lett*, 5:169-170.
- Parker N, Vidal-Puig A, Brand MD (2008) Stimulation of mitochondrial proton conductance by hydroxynonenal requires a high membrane potential. *Biosci Rep*, 28:83-88.
- Parnetti L, Gatti A, Mecocci P, Cadini D, Senin U (1992) Pharmacokinetics of IV and oral acetyl-L-carnitine in a multiple dose regimen in patients with senile dementia of Alzheimer type. *Eur J Clin Pharmacol*, 42:89-93.

- Peters A (2011) The selfish brain: Competition for energy resources. *Am J Hum Biol*, 23:29-34.
- Picconi B, Barone I, Pisani A, Nicolai R, Benatti P, Bernardi G, Calvani M, Calabresi P (2006) Acetyl-L-carnitine protects striatal neurons against in vitro ischemia: the role of endogenous acetylcholine. *Neuropharmacology*, 50:917-923.
- Poorabbas A, Fallah F, Bagdadchi J, Mahdavi R, Aliasgarzadeh A, Asadi Y, Koushavar H, Vahed JM (2007) Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. *Eur J Clin Nutr*, 61:892-895.
- Postiglione A, Soricelli A, Cicerano U, Mansi L, De CS, Gallotta G, Schettini G, Salvatore M (1991) Effect of acute administration of L-acetyl carnitine on cerebral blood flow in patients with chronic cerebral infarct. *Pharmacol Res*, 23:241-246.
- Price N, van der Leij F, Jackson V, Corstorphine C, Thomson R, Sorensen A, Zammit V (2002) A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 80:433-442.
- Pueschel SM (2006) The effect of acetyl-L-carnitine administration on persons with Down syndrome. *Res Dev Disabil*, 27:599-604.
- Pupure J, Fernandes MA, Santos MS, Moreno AJ, Kalvinsh I, Klusa V, Oliveira CR (2008) Mitochondria as the target for mildronate's protective effects in azidothymidine (AZT)-induced toxicity of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biochem Funct*, 26:620-631.
- Puurunen K, Jolkkonen J, Sirvio J, Haapalinna A, Sivenius J (2001) An alpha(2)-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology*, 40:597-606.
- Ramanjaneyulu R, Ticku MK (1984) Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *Eur J Pharmacol*, 98:337-345.
- Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR (2001) Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta*, 1546:21-43.
- Rau TF, Lu Q, Sharma S, Sun X, Leary G, Beckman ML, Hou Y, Wainwright MS, Kavanaugh M, Poulsen DJ, Black SM (2012) Oxygen glucose deprivation in rat hippocampal slice cultures results in alterations in carnitine homeostasis and mitochondrial dysfunction. *PLoS One*, 7:e40881.
- Rauchova H, Vokurkova M, Koudelova J (2012) Hypoxia-induced lipid peroxidation in the brain during postnatal ontogenesis. *Physiol Res*, 61:Suppl 1, S89-101.
- Rebouche CJ (1992) Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J*, 6:3379-3386.
- Rebouche CJ (2004) Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 1033:30-41.
- Rebouche CJ, Mack DL, Edmonson PF (1984) L-Carnitine dissimilation in the gastrointestinal tract of the rat. *Biochemistry*, 23:6422-6426.
- Reid CA, Berkovic SF, Petrou S (2009) Mechanisms of human inherited epilepsies. *Prog Neurobiol*, 87:41-57.
- Riazi K, Roshanpour M, Rafiei-Tabatabaei N, Homayoun H, Ebrahimi F, Dehpour AR (2006) The proconvulsant effect of sildenafil in mice: role of nitric oxide-cGMP pathway. *Br J Pharmacol*, 147:935-943.
- Rigault C, Dias JV, Demarquoy J, Le BF (2008) Characteristics of L-carnitine import into heart cells. *Biochimie*, 90:542-546.

- Robinson IN, Zammit VA (1982) Sensitivity of carnitine acyltransferase I to malonyl-CoA inhibition in isolated rat liver mitochondria is quantitatively related to hepatic malonyl-CoA concentration in vivo. *Biochem J*, 206:177-179.
- Rosenthal RE, Williams R, Bogaert YE, Getson PR, Fiskum G (1992) Prevention of postischemic canine neurological injury through potentiation of brain energy metabolism by acetyl-L-carnitine. *Stroke*, 23:1312-1317.
- Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T (2010) A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online*, 20:711-723.
- Roulet-Perez E, Ballhausen D, Bonafe L, Cronel-Ohayon S, Maeder-Ingvar M (2008) Glut-1 deficiency syndrome masquerading as idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsia*, 49:1955-1958.
- Rozas I, Camina MF, Paz JM, Alonso C, Castro-Gago M, Rodriguez-Segade S (1990) Effects of acute valproate administration on carnitine metabolism in mouse serum and tissues. *Biochem Pharmacol*, 39:181-185.
- Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enriquez JA, Lopez-Perez MJ (2001) Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl*, 24:335-340.
- Rumaks J, Pupure J, Svirskis S, Isajevs S, Duburs G, Kalvinsh I, Klusa V (2012) Search for stroke-protecting agents in endothelin-1-induced ischemic stroke model in rats. *Medicina (Kaunas)*, 48:525-531.
- Sack MN (2006) Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovasc Res*, 72:210-219.
- Sakvarelidze EP (2006) Change of concentration of L-carnitine in blood and other tissues in rats on a background of the alcohol intake and influence of mildronate on its level. *Georgian Med News*, 94-96.
- Save E, Poucet B, Piloting. In Kolb B, Whishaw IQ, editors (2005) *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*, Oxford University Press: New York: 394.
- Schallert T, Woodlee M (2005) Motor systems: orienting and placing. In *The Behaviour of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. ed. Whishaw, I. & Kolb, B. pp. 29-140. Oxford University Press : New York.
- Schofield RS, Hill JA (2001) Role of metabolically active drugs in the management of ischemic heart disease. *Am J Cardiovasc Drugs*, 1:23-35.
- Shuaib A, Waqaar T, Wishart T, Kanthan R, Howlett W (1995) Acetyl-L-carnitine attenuates neuronal damage in gerbils with transient forebrain ischemia only when given before the insult. *Neurochem Res*, 20:1021-1025.
- Sierra AY, Gratacos E, Carrasco P, Clotet J, Urena J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N (2008) CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem*, 283:6878-6885.
- Sigman M, Glass S, Campagnone J, Pryor JL (2006) Carnitine for the treatment of idiopathic asthenospermia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*, 85:1409-1414.
- Sima AA (2007) Acetyl-L-carnitine in diabetic polyneuropathy: experimental and clinical data. *CNS Drugs*, 21:Suppl 1, 13-23.
- Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuke RJ, Molodchina TN, Kalvins IJ, Lukevics E (1988) 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 37:195-202.

- Sinclair S (2000) Male infertility: nutritional and environmental considerations. *Altern Med Rev*, 5:28-38.
- Sizova EN, Tsirkin VI, Dvorianskii SA (2002) The role of endogenous modulators of chemoreactivity in the regulation of coronary blood flow. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 88:856-864.
- Sjakste N, Gutcaits A, Kalvinsh I (2005) Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications. *CNS Drug Rev*, 11:151-168.
- Slivka A, Silbersweig D, Pulsinelli W (1990) Carnitine treatment for stroke in rats. *Stroke*, 21:808-811.
- Sloan JL, Mager S (1999) Cloning and functional expression of a human Na(+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(0+). *J Biol Chem*, 274:23740-23745.
- Smeland OB, Meisingset TW, Sonnewald U (2012) Dietary supplementation with acetyl-L-carnitine in seizure treatment of pentylenetetrazole kindled mice. *Neurochem Int*, 61:444-454.
- Sokolovska J, Isajevs S, Sugoka O, Sharipova J, Lauberte L, Svirina D, Rostoka E, Sjakste T, Kalvinsh I, Sjakste N (2011) Correction of glycaemia and GLUT1 level by mildronate in rat streptozotocin diabetes mellitus model. *Cell Biochem Funct*, 29:55-63.
- Spaniol M, Brooks H, Auer L, Zimmermann A, Solioz M, Stieger B, Krahenbuhl S (2001) Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. *Eur J Biochem*, 268:1876-1887.
- Spratt NJ, Fernandez J, Chen M, Rewell S, Cox S, van RL, Hogan L, Howells DW (2006) Modification of the method of thread manufacture improves stroke induction rate and reduces mortality after thread-occlusion of the middle cerebral artery in young or aged rats. *J Neurosci Methods*, 155:285-290.
- Srere PA (1963) Citryl-CoA an substrate for the citrate-cleavage enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 73:523-525.
- Statsenko ME, Poletaeva LV, Turkina SV, Apukhtin AF, Dudchenko GP (2008) Mildronate effects on oxidant stress in type 2 diabetic patients with diabetic peripheral (sensomotor) neuropathy. *Ter Arkh*, 80:27-30.
- Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, Guerrini R, Wuttke TV, Salvo-Vargas A, Deprez L, Claes LR, Jordanova A, Berkovic SF, Lerche H, De JP, Scheffer IE (2009) Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol*, 66:415-419.
- Suslina ZA, Fedorova TN, Maksimova MI, Kim EK (2003) Antioxidant activity of mildronate and L-carnitine in the treatment of patients with cerebrovascular diseases. *Eksp Klin Farmakol*, 66:32-35.
- Svalbe B, Zvejniece L, Vavers E, Pugovics O, Muceniece R, Liepinsh E, Dambrova M (2011) Mildronate treatment improves functional recovery following middle cerebral artery occlusion in rats. *Behav Brain Res*, 222:26-32.
- Szot P, Lester M, Laughlin ML, Palmiter RD, Liles LC, Weinshenker D (2004) The anticonvulsant and proconvulsant effects of alpha2-adrenoreceptor agonists are mediated by distinct populations of alpha2A-adrenoreceptors. *Neuroscience*, 126:795-803.
- Szutowicz A, Bielarczyk H, Gul S, Zielinski P, Pawelczyk T, Tomaszewicz M (2005) Nerve growth factor and acetyl-L-carnitine evoked shifts in acetyl-CoA and cholinergic SN56 cell vulnerability to neurotoxic inputs. *J Neurosci Res*, 79:185-192.

- Szutowicz A, Bielarczyk H, Jankowska-Kulawy A, Pawelczyk T, Ronowska A (2013) Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, 38:1523-1542.
- Taegtmeier H, King LM, Jones BE (1998) Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. *Am J Cardiol*, 82:54K-60K.
- Takada J, Ibayashi S, Nagao T, Ooboshi H, Kitazono T, Fujishima M (2001) Bradykinin mediates the acute effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on cerebral autoregulation in rats. *Stroke*, 32:1216-1219.
- Tamai I, Ohashi R, Nezu JI, Sai Y, Kobayashi D, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000) Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem*, 275:40064-40072.
- Tempesta E, Casella L, Pirrongelli C, Janiri L, Calvani M, Ancona L (1987) L-acetylcarnitine in depressed elderly subjects. A cross-over study vs placebo. *Drugs Exp Clin Res*, 13:417-423.
- Tempesta E, Troncon R, Janiri L, Colusso L, Riscica P, Saraceni G, Gesmundo E, Calvani M, Benedetti N, Pola P (1990) Role of acetyl-L-carnitine in the treatment of cognitive deficit in chronic alcoholism. *Int J Clin Pharmacol Res*, 10:101-107.
- Thal LJ, Calvani M, Amato A, Carta A (2000) A 1-year controlled trial of acetyl-L-carnitine in early-onset AD. *Neurology*, 55:805-810.
- Truelsen T, Piechowski-Jozwiak B, Bonita R, Mathers C, Bogousslavsky J, Boysen G (2006) Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol*, 13:581-598.
- Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J, Niot I, Demarquoy J, Boichot J, Bezard J, Rochette L, Clouet P (1995) Enhancement of activities relative to fatty acid oxidation in the liver of rats depleted of L-carnitine by D-carnitine and a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 49:1403-1410.
- Tsuda M, Suzuki T, Misawa M (1997) Aggravation of DMCM-induced seizure by nitric oxide synthase inhibitors in mice. *Life Sci*, 60:L339-L343.
- Valtneris A (1999) Profesoram Robertam Krimbergam – 125. *Latvijas Ārstu Žurnāls*, 3, 50-54.
- van GT, Puurunen K, Maki HM, Sivenius J, Jolkkonen J (2005) Transformation of diffuse beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid deposits to plaques in the thalamus after transient occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke*, 36:1551-1556.
- Vaz FM, Wanders RJ (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J*, 361:417-429.
- Vilskersts R, Liepinsh E, Mateuszuk L, Grinberga S, Kalvinsh I, Chlopicki S, Dambrova M (2009) Mildronate, a regulator of energy metabolism, reduces atherosclerosis in apoE/LDLR^{-/-} mice. *Pharmacology*, 83:287-293.
- Vilšķērsts R., Zvejniece L., Strogova I., Alijeva J., Muceniece R., Dambrova M., Liepiņš E. (2009). Mildronāts samazina L-karnitīna koncentrāciju, bet neietekmē glikozes uzņemšanu un ar to saistīto gēnu ekspresiju peļu smadzenēs. *Latvijas Universitātes raksti*, 750.sēj.: Medicīna, 106.-117.
- Vinichuk SM (1991) The efficacy of the mildronate treatment of patients with ischemic stroke. *Vrach Delo*, 77-79.
- Virmani A, Binienda Z (2004) Role of carnitine esters in brain neuropathology. *Mol Aspects Med*, 25:533-549.

- Vivoli E, Di Cesare ML, Salvicchi A, Bartolini A, Koverech A, Nicolai R, Benatti P, Ghelardini C (2010) Acetyl-L-carnitine increases artemin level and prevents neurotrophic factor alterations during neuropathy. *Neuroscience*, 167:1168-1174.
- Wainwright MS, Kohli R, Whittington PF, Chace DH (2006) Carnitine treatment inhibits increases in cerebral carnitine esters and glutamate detected by mass spectrometry after hypoxia-ischemia in newborn rats. *Stroke*, 37:524-530.
- Wawrzenczyk A, Nalecz KA, Nalecz MJ (1995) Effect of externally added carnitine on the synthesis of acetylcholine in rat cerebral cortex cells. *Neurochem Int*, 26:635-641.
- Wawrzenczyk A, Sacher A, Mac M, Nalecz MJ, Nalecz KA (2001) Transport of L-carnitine in isolated cerebral cortex neurons. *Eur J Biochem*, 268:2091-2098.
- White HL, Scates PW (1990) Acetyl-L-carnitine as a precursor of acetylcholine. *Neurochem Res*, 15:597-601.
- Wolfgang MJ, Kurama T, Dai Y, Suwa A, Asaumi M, Matsumoto S, Cha SH, Shimokawa T, Lane MD (2006) The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:7282-7287.
- Woodlee MT, Kane JR, Chang J, Cormack LK, Schallert T (2008) Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: compensatory adaptation for contralateral postural instability? *Exp Neurol*, 211:511-517.
- World Health Organization WHO (1999) *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge: Cambridge University Press, 128.
- Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, Labrie F, Huhtaniemi IT (2010) Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med*, 363:123-135.
- Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A (1999) Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther*, 289:768-773.
- Yamada K, Tanaka T, Zou LB, Senzaki K, Yano K, Osada T, Ana O, Ren X, Kameyama T, Nabeshima T (1999) Long-term deprivation of oestrogens by ovariectomy potentiates beta-amyloid-induced working memory deficits in rats. *Br J Pharmacol*, 128:419-427.
- Yamazaki N, Shinohara Y, Shima A, Terada H (1995) High expression of a novel carnitine palmitoyltransferase I like protein in rat brown adipose tissue and heart: isolation and characterization of its cDNA clone. *FEBS Lett*, 363:41-45.
- Yoshioka M, Suda N, Mori K, Ueno K, Itoh Y, Togashi H, Matsumoto M (2002) Effects of ibudilast on hippocampal long-term potentiation and passive avoidance responses in rats with transient cerebral ischemia. *Pharmacol Res*, 45:305-311.
- Yu Z, Iryo Y, Matsuoka M, Igisu H, Ikeda M (1997) Suppression of pentylenetetrazol-induced seizures by carnitine in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 355:545-549.
- Zammit VA (1999) The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem J*, 343:Pt 3, 505-515.

- Zarrouk A, Vejux A, Nury T, El Hajj HI, Haddad M, Cherkaoui-Malki M, Riedinger JM, Hammami M, Lizard G (2012) Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). *Oxid Med Cell Longev*, 2012:623257.
- Zhang R, Zhang H, Zhang Z, Wang T, Niu J, Cui D, Xu S (2012) Neuroprotective Effects of Pre-Treatment with l-Carnitine and Acetyl-l-Carnitine on Ischemic Injury In Vivo and In Vitro. *Int J Mol Sci*, 13:2078-2090.
- Zhang R, Zhang L, Zhang Z, Wang Y, Lu M, Lapointe M, Chopp M (2001) A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann Neurol*, 50:602-611.
- Zhang Y (2004) Clonidine preconditioning decreases infarct size and improves neurological outcome from transient forebrain ischemia in the rat. *Neuroscience*, 125:625-631.
- Zhu Y, Zhang G, Zhao J, Li D, Yan X, Liu J, Liu X, Zhao H, Xia J, Zhang X, Li Z, Zhang B, Guo Z, Feng L, Zhang Z, Qu F, Zhao G (2013) Efficacy and Safety of Mildronate for Acute Ischemic Stroke: A Randomized, Double-Blind, Active-Controlled Phase II Multicenter Trial. *Clin Drug Investig*, 33:755-760.
- Zoccarato F, Pandolfo M, Deana R, Alexandre A (1987) Inhibition by some phenolic antioxidants of Ca²⁺ uptake and neurotransmitter release from brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 146:603-610.
- Zvejniece L, Svalbe B, Makrecka M, Liepinsh E, Kalvinsh I, Dambrova M (2010) Mildronate exerts acute anticonvulsant and antihypnotic effects. *Behav Pharmacol*, 21:548-555.

10. PIELIKUMS



3.pielikums
procedūrai KR.10.P.068
versija 02
lpp.1 no 1

PĀRTIKAS UN VETERINĀRĀ DIENESTA ATĻAUJA Nr. 38 DZĪVNIEKU IZMANTOŠANAI IZMĒĢINĀJUMĀ

Atļaujas saņēmējs

Latvijas Organiskās sintēzes institūts Farmaceitiskās Farmakoloģijas laboratorija
PVD Reģ.nr. 022842

Izmēģinājumu dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra nr.)

Reinis Vilškersts, PVD atļaujas nr.5

Par izmēģinājumu atbildīgā persona (vārds, uzvārds, PVD atļaujas nr.)

Izmēģinājuma nosaukums

„Farmakoloģiskās un bioloģiskās vielu aktivitātes pārbaude kardiovaskulārajos izmēģinājuma modeļos Latvijas Organiskās sintēzes institūtā”

Izmēģinājumā izmantojamie dzīvnieki

700 peles un 2000 žurkas/gadā
(suga un skaits)

Izmēģinājumu norises vieta

Rīga, Rātsupītes iela 1, LV 1006
(faktiskā adrese)

Atļaujas darbības laiks no

01.01.2012.g.
(dd. mm. gggg.)

līdz

31.12.2016.g.
(dd. mm. gggg.)

Ģenerāldirektora pienākumu izpildītājs

U.Zavadskis



ED-2 (1 no 1) 02.versija

Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja dzīvnieku izmantošanai izmēģinājumos.