

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
ĀRSTNIECĪBAS PROGRAMMA
IEKŠĶĪGO SLIMĪBU KATEDRA

**STATĪNU IETEKME UZ ACILKARNITĪNU
KONCENTRĀCIJĀM ASINĪS**

DIPLOMDARBS

Autors: Jānis Feldmanis

Studenta apliecība: jf10032

Darba vadītājs: Dr. Med., Prof. Gustavs Latkovskis

RĪGA 2017

SATURA RĀDĪTĀJS

APZĪMĒJUMU SKAIDROJUMS	3
KOPSAVILKUMS	5
SUMMARY	6
1. IEVADS	8
2. LITERATŪRAS APSKATS.....	9
2.1. Karnitīnu un acilkarnitīnu metabolisms un loma organismā.....	9
2.2. Acilkarnitīnu loma insulīna rezistencē un kardiovaskulārajās slimībās.....	12
2.3. Acilkarnitīni un citas slimības.....	15
2.4. Statīnu darbības mehānisms	16
2.5. Metanalīzes par statīnu efektivitāti kardiovaskulārajā profilaksē	17
2.6. 2013. gada ACC/AHA vadlīnijas par statīnu terapiju holesterīna un kardiovaskulārā riska mazināšanā	19
2.7. 2016. gada ESC/EAS vadlīnijas dislipidēmijas ārstēšanai.....	21
2.8. Statīnu ietekme uz acilkarnitīnu līmeni.....	22
3. MATERIĀLI UN METODEDES	23
4. REZULTĀTI.....	25
4.1. Pētāmās pacientu grupas objektīvais raksturojums, kardiovaskulārie riska faktori un statīnu terapijas režīms.....	25
4.2. Plazmas acilkarnitīnu izmaiņas statīnu terapijas laikā	27
4.3. Asins bioķīmisko rādītāju izmaiņas statīnu terapijas laikā.....	30
4.4. Bioķīmisko rādītāju izmaiņu korelācija ar acilkarnitīnu izmaiņām	32
4.5. Lietotie medikamenti.....	33
4.6. Pētāmo pacientu uzturs un fiziskās aktivitātes	34
5. DISKUSIJA.....	36
6. SECINĀJUMI.....	38
PATEICĪBAS.....	39
LITERATŪRAS SARAKSTS	40
ĒTIKAS KOMITEJAS ATZINUMS	43

APZĪMĒJUMU SKAIDROJUMS

ABLH	-augsta blīvuma lipoproteīnu holesterīns
AK	-acilkarnitīni
AKEI	-angiotenzīna konvertējošā enzīma inhibītors
ALAT	-alanīnaminotransferāze
BAB	-beta adrenoblokatori
CK	-kreatīnkināze
DHP KKB	-dihidropiridīnu kalcija kanālu blokatori
EKG	-elektrokardiogramma
GFR	-glomerulu filtrācijas ātrums
HbA1c	-glikolizētais hemoglobīns
HNS	-hroniska nieru slimība
hs-CRP	-augstas jutības C reaktīvais proteīns
HSM	-hroniska sirds mazspēja
IQR	-starpkvartīļu diapazons
KAŠ	-koronāro artēriju šuntēšana
KH	-kopējais holesterīns
ĶMI	-ķermeņa masas indekss
KPT I	-karnitīna palmitoiltransferāze I
KPT II	-karnitīna palmitoiltransferāze II
metil-GBB	-metil-gamma butirobeatīns
NTB	-netiešais bilirubīns
PCI	-perkutāna koronāra intervence
PSI	-protonu sūkņu inhibītori

PSKUS	-Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīca
SD	-standartdeviācija
TB	-tiešais bilirubīns
TG	-triglicerīdi
TS	-taukskābes
V1	-pirmā vizīte, kuras vakarā tiek uzsākta statīnu terapija
V2	-otrā vizīte, nedēļu pēc statīnu terapijas uzsākšanas
V3	-trešā vizīte, mēnesi pēc statīnu terapijas uzsākšanas
V4	-ceturtā vizīte, trīs mēnešus pēc statīnu terapijas uzsākšanas
ZBLH	-zema blīvuma lipoproteīnu holesterīns

KOPSAVILKUMS

Ievads. Acilkarnitīni ir karnitīna acil-esteri, kas nodrošina taukskābju transportēšanu uz mitohondrija lūmenu, kur var notikt to β oksidācija. Paaugstināti acilkarnitīnu līmeņi norāda uz traucētu taukskābju vielmaiņu. Statīnu galvenais efekts ir zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna samazināšana. Tiem piemīt vairākas blakusparādības, piemēram, insulīna rezistences pasliktināšanās, seruma ALAT paaugstināšanās, miopātijas. Nav zināms vai statīni ietekmē plazmas acilkarnitīnu līmeņus un vai statīnu blaknes nav saistītas ar acilkarnitīnu izmaiņām.

Pētījuma mērķis. Noskaidrot, vai statīnu terapija ietekmē plazmas acilkarnitīnu koncentrācijas un vai pastāv saikne starp acilkarnitīnu izmaiņām un citām statīnu izraisītām bioķīmiskām izmaiņām.

Materiāli un metodes. Šis bija prospektīvs pētījums, kurā tika iekļauti pacienti no PSKUS Sirds asinsvadu kateterizācijas laboratorijas, kuriem bija indicēts uzsākt statīnu terapiju. Tika veiktas četras vizītes – pirms terapijas (V1), nedēļu (V2), mēnesi (V3) un trīs mēnešus (V4) pēc statīnu terapijas uzsākšanas. Plazmas acilkarnitīnu koncentrācijas tika mērītas katrā vizītē un vizītēs V1, V3, V4 tika papildus noteikti seruma KH, ZBLH, ABLH, TG, ALAT, kreatinīns un CK. Tika analizēti preliminārie pētījuma dati no pirmajiem 15 dalībniekiem.

Rezultāti. Nedēļu pēc statīnu terapijas uzsākšanas plazmas īso ķēžu acilkarnitīni bija paaugstinājušies no 7560,68 pmol/l uz 10111,33 pmol/l ($p=0,027$) un vidējo ķēžu acilkarnitīni no 336,43 pmol/l uz 505,38 pmol/l ($p=0,027$). Trešajā vizītē, salīdzinājumā ar pirmo, īso ķēžu acilkarnitīni bija paaugstinājušies par 1149,27 pmol/l ($p=0,369$) un vidējo ķēžu par 179,10 pmol/l ($p=0,020$). Trīs mēnešus pēc terapijas uzsākšanas īso ķēžu acilkarnitīni bija pieauguši par 3740,90 pmol/l ($p=0,003$), bet vidējo ķēžu par 245,74 pmol/l ($p=0,004$). Plazmas garo ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijās nebija vērojamas statistiski ticamas izmaiņas. Mēnesi pēc statīnu terapijas uzsākšanas tika novērota korelācija starp KH un garo ķēžu acilkarnitīnu izmaiņām ($r_s=0,518, p=0,048$), starp CK un vidējo ķēžu acilkarnitīnu izmaiņām ($r_s=0,622, p=0,013$), kā arī kreatinīna izmaiņas korelēja gan ar gara ($r_s=0,879, p=0,001$), gan vidēja ($r_s=0,579, p=0,062$), gan īsa ($r_s=0,715, p=0,013$) garuma acilkarnitīnu izmaiņām.

Secinājumi. Trīs mēnešus pēc statīnu terapijas uzsākšanas, īsa un vidēja garuma ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas asins plazmā palielinās un pirmās izmaiņas jau vērojamas nedēļu pēc statīnu terapijas uzsākšanas. Garo ķēžu acilkarnitīnu koncentrācija būtiski nemainās. Pastāv korelācija starp acilkarnitīnu izmaiņām un CK, kreatinīna un KH izmaiņām.

Atslēgvārdi: acilkarnitīni, statīni, metabolisms

SUMMARY

Title: Influence of statins on plasma levels of acylcarnitines

Author: Jānis Feldmanis

Supervisor: Professor Gustavs Latkovskis

Introduction. Acylcarnitines (AC) are carnitine acyl-esters, which provide the transportation of fatty acids into the mitochondrial matrix, where β oxidation can take place. Increased levels of AC indicate an impaired fatty acid metabolism. The main effect of statins is lowering LDL-C. Statins exhibit a few side effects, for instance, worsening of insulin resistance, increased levels of serum ALAT, myopathies. It is not known whether statins effect plasma AC levels and if their side effects have a connection with changes in acylcarnitine levels.

Aim. The aim of this study was to determine, whether statin therapy effects plasma AC concentrations and if there is a link between changes in AC levels and other biochemical changes caused by statin therapy.

Materials and methods. This was a prospective study. Patients who, according to clinical guidelines, had indications to start statin therapy were included. Plasma AC levels were measured before (V1), a week after (V2), a month after (V3) and three months after initiation of statin therapy. In addition, total cholesterol (TC), LDL-C, HDL-C, ALAT, creatinine and creatine kinase (CK) were measured on V1, V3 and V4. Preliminary data from the first 15 participants was analyzed.

Results. A week after the initiation of statin therapy, plasma short-chain AC had increased from 7560,68 pmol/l to 10111,33 pmol/l ($p=0,027$) and medium-chain AC increased from 336,43 pmol/l to 505,38 pmol/l ($p=0,027$). A month after starting statins (V3), compared to V1, short-chain AC had increased by 1149,27 pmol/l ($p=0,369$) and medium-chain AC increased by 179,10 pmol/l ($p=0,020$). Three months into the therapy short-chain AC had increased by 3740,90 pmol/l ($p=0,003$) and medium-chain AC by 245,74 pmol/l ($p=0,004$). No statistically significant changes in long-chain AC concentrations were identified. A month after the start of statin therapy correlations were identified between changes in TC and long-chain AC levels ($r_s=0,518, p=0,048$), between changes in CK and medium-chain AC levels ($r_s=0,622, p=0,013$). Changes in creatinine levels correlated with changes in long-chain ($r_s=0,879, p=0,001$), medium-chain ($r_s=0,579, p=0,062$) and short-chain ($r_s=0,715, p=0,013$) AC levels.

Conclusions. Short-chain and medium-chain AC plasma concentrations increase three months after the initiation of statin therapy and the first changes are already identifiable one week after the start of therapy. Long-chain AC concentrations do not change significantly. There is a correlation between changes in concentrations of plasma AC and changes in TC, creatinine and CK levels.

Keywords: acylcarnitines, statins, metabolism

1. IEVADS

Statīni ir nozīmīgi aterosklerozes un kardiovaskulārā riska mazinoši medikamenti. To galvenais efekts – zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna samazināšana – tiek panākts ar HMG-CoA reduktāzes inhibēšanas palīdzību. Statīniem piemītošie pleijotropie efekti, joprojām nav līdz galam izskaidroti. Statīniem piemīt vairākas nevēlamas blakusparādības – aknu transamināžu palielināšanās bez aknu bojājuma, insulīna rezistences pasliktināšanās, miopātijas un, ļoti retos gadījumos, rabdomiolīze.

Acilkarnitīni ir taukskābju vielmaiņas produkti, kas var uzkrāties šūnās, traucējot enerģijas metabolismu un samazinot šūnu izdzīvošanu stresa apstākļos. Tie nodrošina taukskābju transportēšanu uz mitohondrija lūmenu, kur var notikt to β oksidācija. Paaugstināti acilkarnitīnu līmeņi norāda uz traucētu taukskābju vielmaiņu.

Līdz šim nav veikti pētījumi par to, kā acilkarnitīnu koncentrācijas izmaiņas statīnu terapijas fonā. Nav zināms vai acilkarnitīnu koncentrāciju izmaiņas, statīnu terapijas laikā, korelē ar statīnu izraisīto insulīna rezistences pasliktināšanos un citām to blakusparādībām.

Zinātniskie pieņēmumi jeb darba hipotēzes:

1. Acilkarnitīnu koncentrācijas paaugstinās statīnu terapijas iespaidā.
2. Acilkarnitīnu izmaiņas korelē ar statīnu hipolipidimizējošo efektu.
3. Acilkarnitīnu izmaiņas korelē ar statīnu blaknēm.

Pētījuma mērķis:

1. Noskaidrot, vai statīnu efektivitāte un blaknes ir saistītas ar acilkarnitīnu līmeņa izmaiņām.

Pētījuma uzdevumi:

1. Noskaidrot, vai statīnu terapija ietekmē acilkarnitīnu koncentrācijas plazmā.
2. Noskaidrot, vai statīnu hipolipidimizējošais efekts korelē ar acilkarnitīnu izmaiņām.
3. Noskaidrot, vai statīnu blaknes – ALAT, kreatinīna un CK koncentrāciju pieaugums – korelē ar acilkarnitīnu izmaiņām.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Karnitīnu un acilkarnitīnu metabolisms un loma organismā

Karnitīns un tā acil esteris – acilkarnitīns – ir svarīgi komponenti taukskābju metabolismā. Lai gan dzīvnieku šūnas var sintezēt L-karnitīnu, izmantojot metionīnu un lizīnu kā prekursorus, tomēr lielāko daļu cilvēks uzņem ar uzturu. Gaļa, zivis un piena produkti ir galvenie karnitīna avoti cilvēkam un spēj nodrošināt 2 līdz 12 μmol uz kilogramu svara karnitīna dienā, salīdzinājumā ar endogēno karnitīna sintēzi, kas spēj nodrošināt aptuveni 1,2 μmol karnitīna uz kilogramu svara dienā. Endogēnā karnitīna sintēze visaktīvāk notiek nierēs, aknās un smadzenēs. Nierēs karnitīns tiek reabsorbēts, lai mazinātu zudumus, tomēr pārlietu lieli līmeņi var tikt izvadīti, ja nepieciešams. (Christie, 2013)

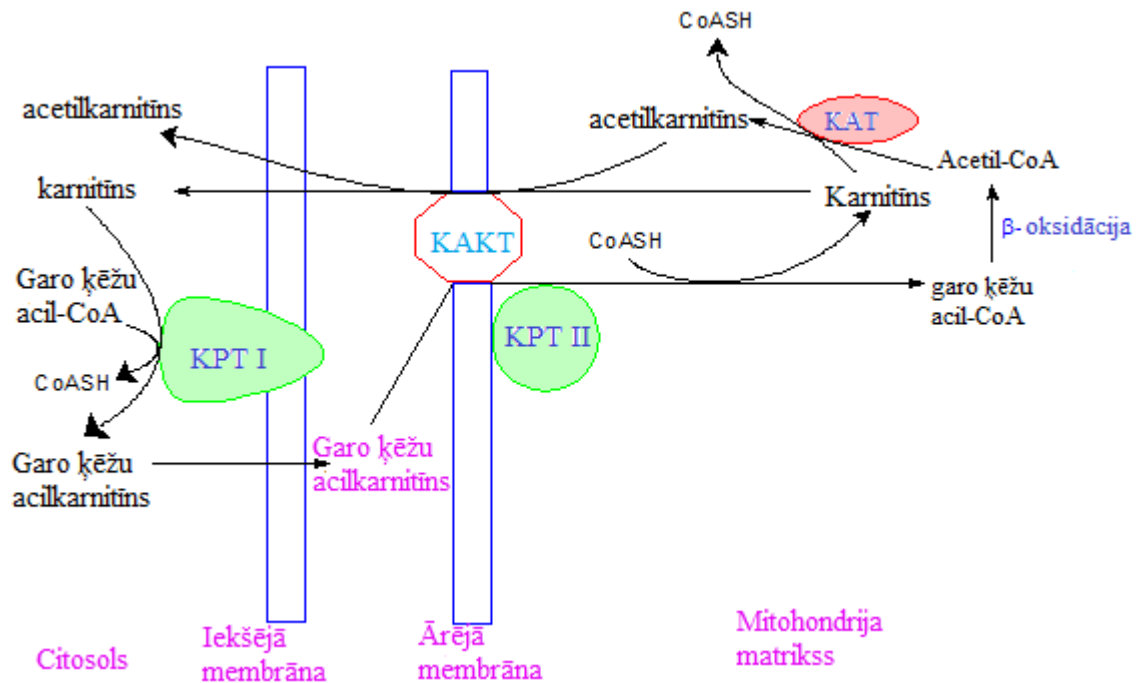
Taukskābju molekulas ar 12 oglekļa atomiem un mazāk var nokļūt mitohondrijos bez membrānas transportieru palīdzības. Garāku ķēžu taukskābes, kas sastāda lielāko daļu no taukaudu atbrīvotajām vai ar uzturu uzņemtajām taukskābēm, nevar tikt cauri mitohondriju membrānai – tām vispirms ir jāiziet cauri trim karnitīna transporta enzīmātiskajām reakcijām.

Pirmajā reakcijā taukskābēm tiek pievienota koenzīma A grupa un izveidota garķēžu tauku acil – CoA molekula. Tauku acil – CoA esteri, kas izveidojušies citosolā, var tikt transportēti uz mitohondriju, lai tos oksidētu, vai tikt izmantoti citosolā membrānu lipīdu sintēzei. Garo ķēžu tauku acil – CoA, kam lemts doties uz mitohondriju β oksidācijai, no sākuma tiek pievienots karnitīna grupai, izveidojot garo ķēžu acilkarnitīnu, kas spējīgas nokļūt mitohondrijā ar specifisku translokāžu palīdzību. Transporta sistēma sastāv no karnitīna palmitoiltransferāzes I (KPT I), kas atrodas mitohondrija ārējā membrānā, karnitīna-acilkarnitīna translokāzes (iekšējās membrānas proteīns), un karnitīna palmitoiltransferāzes II (KPT II), kas atrodas uz iekšējās mitohondrija membrānas, tā matriksa pusē. Mitohondrijā garo ķēžu acil-CoA tiek atšķelts no karnitīna un iesaistīts β oksidācijā, normālos apstākļos izveidojot acetil-CoA. Visbeidzot acetil grupa tiek pārvērsta par acetilkarnitīnu (ar karnitīna acetiltransferāzes palīdzību) un transportēta ārā no mitohondrija. (Reuter and Evans, 2012; Christie, 2013; Nelson et al., 2013)

Šajā procesā karnitīns nodrošina līdzsvaru starp brīvo un esterificēto koenzīmu A, jo pārlietu liels acil-CoA daudzums ir toksisks šūnai. Jebkura procesā iesaistītā enzīma trūkums var izraisīt acil-CoA akumulāciju un šūnai radīt toksicitāti, ja tos neizvāc, izveidojot acilkarnitīnu. Tā kā karnitīns acilētā stāvoklī plazmā atspoguļo citosola acilkarnitīna daudzumu, tas kalpo kā diagnostisks marķieris, lai noteiktu līdzsvaru starp acil-CoA un acilkarnitīnu. (Christie, 2013)

Taukskābes ir nozīmīgs enerģijas avots vairākiem cilvēka audiem (piemēram, skeleta un sirds muskulatūrai). To enerģija var tikt atbrīvota tās oksidējot mitohondrijā, bet, lai taukskābes nokļūtu mitohondrija matriksā, ir nepieciešama karnitīna-acilkarnitīna transporta sistēma. Proteīns KPT I pievieno garo ķēžu acil-CoA grupu karnitīnam, izveidojot acilkarnitīnu. Acilkarnitīns ar translokāžu palīdzību spējīgs transportēt šīs taukskābes uz mitohondriju, β oksidācijas norisei. Ja šajā karnitīnu-acilkarnitīnu transporta procesā trūktu kāds no posmiem, kā tas ir pie vairākām ģenētiskām patoloģijām, piemēram, KPT I un KPT II deficīta, garo ķēžu acil-CoA dehidrogenāzes deficīta, translokāžu deficīta gadījumos, tad taukskābju β oksidācija būtu traucēta vai neiespējama, kas novestu pie smagām klīniskām izpausmēm. Traucētais β oksidācijas process radītu asinīs acilkarnitīnu uzkrāšanos, ko iespējams izmantot diagnostikā. Ir zināmi vairāk kā 20 dažādi iedzimti metaboli traucējumi, kas rada acilkarnitīnu akumulāciju. (Nelson et al., 2013)

Karnitīna un acilkarnitīnu iesaiste procesā, kur taukskābes tiek transportētas mitohondrija matriksā, skatāma attēlā 2.1.



2.1. att. Taukskābju transportēšana caur mitohondrija membrānām ar karnitīna palīdzību
(adaptēts pēc Christie, 2013)

Apzīmējumi: KPT I – karnitīna palmitoiltransferāze I, KPT II - karnitīna palmitoiltransferāze II, KAKT – karnitīna-acilkarnitīna translokāze, KAT – karnitīna acetiltransferāze

2.2 Acilkarnitīnu loma insulīna rezistencē un kardiovaskulārajās slimībās

Tiek uzskatīts, ka hroniska, pārlietu liela barības vielu uzņemšana noved pie palielināta lipīdu satura citosolā insulīn jutīgajos audos (aknās, muskuļos). Tas negatīvi ietekmē šo audu jutību uz insulīnu, inhibējot insulīna signalizēšanu caur tādiem garo ķēžu taukskābju metabolītiem kā keramīds, diacilglicerols. Lipīdu pārslodze šūnā noved pie traucētas mitohondriju darbības, kas izraisa pastiprinātu, nepilnīgu β oksidāciju, nespēju pārslēgties uz ogļhidrātu substrātu un Krebsa cikla starpproduktu izsīkumu. Kā jau iepriekš minēts, pastiprināta un nepilnīga β oksidāciju iet roku rokā ar acilkarnitīnu līmeņa pieaugumu. Attēlā 2.2. skatāms shematisks attēlojums lipīdu inducētai insulīna rezistencei. (Schooneman et al., 2013)

Taukskābju oksidācijas traucējumi tiek uzskatīti par svarīgu patofizioloģisku mehānismu aptaukošanās un otrā tipa cukura diabēta attīstībā. Izmantojot plazmas acilkarnitīnu kā marķieri, iespējams noteikt šos traucējumus. 2010. gadā veiktā pētījumā tika iekļauti 12 pacienti ar normālu ķermeņa masu, 14 pacienti ar aptaukošanos, bet bez diabēta, un 10 pacienti ar otrā tipa cukura diabētu. Pacientiem ar aptaukošanos un diabētu bija līdzīgi paaugstināti plazmas acilkarnitīnu līmeņi. (Mihalik et al., 2010)

Paaugstināti acilkarnitīna līmeņi plazmā norāda uz nepilnīgu, neefektīvu garo ķēžu taukskābju β oksidāciju audos. 2009. gadā veiktā pētījumā tika iekļautas 44 pacientes ar 2. tipa cukura diabētu un 12 pacientes bez diabēta. Tika noskaidrots, ka pacientēm ar diabētu bija ievērojami augstākas plazmas acilkarnitīna koncentrācijas. Pieaugot HbA1c, pieauga arī acilkarnitīna un acetilkarnitīna koncentrācijas plazmā. (Adams et al., 2009)

2014. gadā veica pētījumu, kurā tika iekļauts 61 pacients, kuri tika sadalīti 3 grupās: normāla glikozes tolerance, prediabēts, otrā tipa cukura diabēts. Vairāku garo ķēžu acilkarnitīnu līmeņi bija izteikti palielināti pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu un prediabētu. (Zhang et al., 2014)

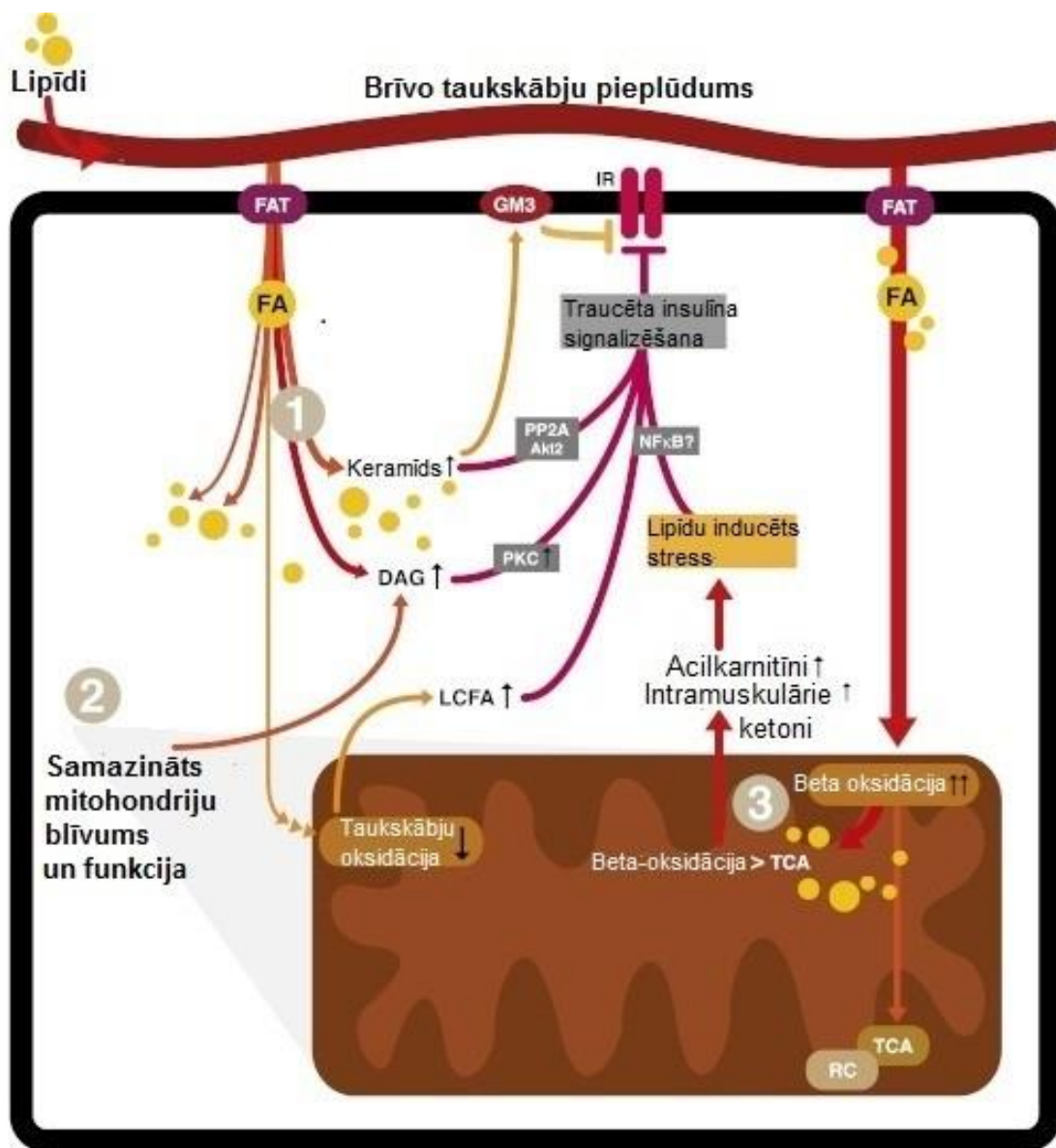
2016. gada pētījumā novēroja, ka paaugstināts acilkarnitīnu līmenis plazmā ir neatkarīgi asociēts ar kardiovaskulāro slimību un insulta riska palielinājumu pacientiem, ar augstu kardiovaskulāro slimību risku. Papildus tam tika secināts, ka iejaukšanās ar Vidusjūras diētas palīdzību, var samazināt nelabvēlīgo asociāciju starp augstiem acilkarnitīna līmeņiem un kardiovaskulārām slimībām. (Guasch-Ferré et al., 2016)

Ahmad *et al.* 2016 pētījumā tika iekļauti 453 pacienti ar hronisku kreisās sirds puses mazspēju (kreisā kambara izsviedes frakcija $<35\%$). 41 no pacientiem, kam bija sirds mazspējas gala stadija, tika veikta mehāniskas cirkulācijas palīgierīces implantēšana kreisajā kambarī. Visi

pacienti tika randomizēti divās grupās: pacienti ar sirds mazspējas standarta terapiju un pacienti, kas papildus veica slodzes treniņus. Asins plazmas paraugi, metabolītu noteikšanai, tika ņemti pirms randomizācijas, pirms, un 90 dienas pēc, kreisā ventrikuļa cirkulācijas palīgierīces implantācijas.

Pētījumā noskaidroja, ka garo ķēžu acilkarnitīna līmeņi plazmā bija neatkarīgi asociēti ar sliktiem klīniskiem iznākumiem (jebkāda iemesla mirstība, jebkāda iemesla hospitalizācija, kardiovaskulāra iemesla hospitalizācija un mirstība). Garo ķēžu acilkarnitīna līmeņi bija ievērojami augstāki pacientiem ar sirds mazspējas beigu stadiju un ievērojami samazinājās pēc palīgierīces implantācijas. (Ahmad et al., 2016)

Audu un plazmas acilkarnitīna līmeņi ir saistīti ar traucētu enerģijas metabolismu un 2. tipa cukura diabēta attīstību. Metil-gamma-butirobeatīns (metil-GBB) ir spēcīgs L-karnitīna biosintēzes un transporta inhibitors, kas samazina acilkarnitīna koncentrāciju sirdī. 2015. gada pētījumā tika pētīta metil-GBB ietekme uz pelēm, kas predisponētas uz aterosklerozi. Tika izvērtēta aterosklerozes progresēšanu un acilkarnitīnu līmeņi vaskulārajos audos. Metil-GBB terapijas rezultātā acilkarnitīnu līmeņi aortas audos samazinājās 17 reizes (70 ± 11 nmol/g kontroles grupai pret 4 ± 1 nmol/g pelēm, kas saņēma metil-GBB terapiju). Aterosklerozes pangu izmēri samazinājās par 36% un tika novērota samazināta makrofāgu un monocītu akumulācija pangās. (Vilskersts et al., 2015)



2.2. att. Lipīdu inducētas insulīna rezistences mehānisms

(adaptēts pēc Schooneman et al., 2013)

Apzīmējumi: FAT – taukskābju transportproteīni, FA – taukskābes, TCA – Krebsa cikls, RC – respiratorā ķēde, LCFA – garo ķēžu taukskābes, DAG – diacilglicerols, IR – insulīna receptors

2.3. Acilkarnitīni un citas slimības

Acilkarnitīnu metabolisma saistība ar citām slimībām ir pierādīta vairākos pētījumos. Tas norāda uz plašu šī metabolisma iesaisti organisma funkcijās.

2016. gada pētījumā tika pētīti L-karnitīna, acetilkarnitīna un 34 dažādu acilkarnitīnu līmeņi cilvēka serumā pacientiem ar Alcheimera slimību vai risku uz tās attīstību. Atklāja, ka acetilkarnitīna un daudzu acilkarnitīnu koncentrācijas progresīvi samazinājās, pacientu grupām progresējot no subjektīvām sūdzībām par atmiņu, vājam kognitīvo funkciju traucējumam un Alcheimera slimībai. Atšķirības šo metabolītu koncentrācijās bij ļoti izteiktas starp veselīgiem pacientiem un pacientiem ar vāju kognitīvo funkciju traucējumu, kā arī starp vāju kognitīvo traucējumu un Alcheimera slimību. (Cristofano et al., 2016)

2015. gada pētījumā salīdzināja HIV – negatīvus un HIV – pozitīvus pacientus ar un bez depresijas. Atklājās, ka acilkarnitīnu (propionilkarnitīna, izobutirilkarnitīna, izovalerilkarnitīna, 2-metilbutirilkarnitīna) līmeņi bija pazemināti pacientiem ar depresiju (gan HIV pozitīvajā, gan negatīvajā grupā) salīdzinājumā ar pacientiem bez depresijas simptomiem. Šis acilkarnitīnu līmeņa izmaiņas korelē ar depresijas simptomu smaguma pakāpi. (Cassol et al., 2015)

2011. gada pētījumā tika analizēti plazmas karnitīnu un acilkarnitīnu līmeņi 20 pacientiem ar iekaisīgo zarnu slimību un salīdzināti ar kontroles grupu. Tika konstatēti zemi līmeņi dažiem acilkarnitīniem (izovaleril-karnitīna, tigilil-karnitīna, oktenoilkarnitīna un dekanoil-karnitīna). (Danese et al., 2011)

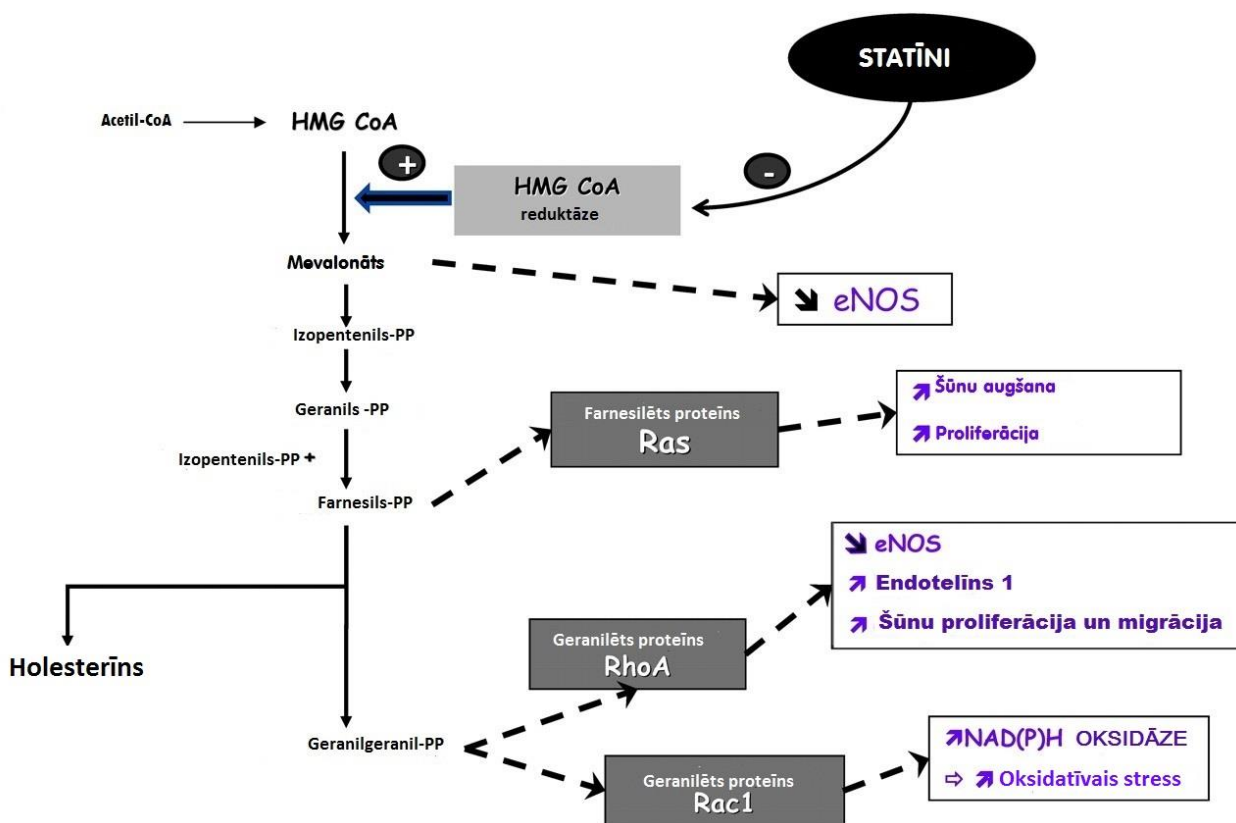
2006. gada pētījumā tika salīdzināti plazmas karnitīna un acilkarnitīnu līmeņi 20 pacientiem ar normālu nieru funkciju, 65 pacientiem ar hronisku nieru slimību (HNS) un 29 pacientiem, kam tiek veikta dialīze. Nebija sakarības starp plazmas karnitīna līmeņiem un glomerulu filtrācijas ātrumu (GFR) šajās grupās. Acilkarnitīnu līmenis pacientiem ar HNS un pacientiem ar dialīzi bija paaugstināts un apgriezti korelē ar GFR. Pētījuma autori to skaidroja ar traucēto nieru ekskrecijas funkciju. (Fouque et al., 2006)

2.4. Statīnu darbības mehānisms

HMG-CoA reduktāzes inhibitori, vairāk pazīstami kā statīni, uz doto brīdi ir spēcīgākie holesterīnu mazinošie medikamenti, kas pieejami. Klīniskajos un eksperimentālajos pētījumos ir pierādīts statīnu anti aterosklerotiskais efekts. Aterosklerozi mazinošais efekts lielā mērā tiek panākts ar zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna līmeņu pazemināšanu, bet nozīmīga loma ir arī statīnu pleiotropajiem darbības mehānismiem. Statīnu darbības mehānisms skatāms attēlā 2.3.

Statīni nomāc endogēno holesterīna sintēzi, inhibējot enzīmu HMG-CoA reduktāze. Tomēr holesterīna endogēnās sintēzes procesā arī veidojas izoprenoīdi. Tie ir lipīdi, kas nepieciešami vairākiem proteīniem, kas iesaistīti metabolisma un signālu pārvades funkcijās. Tas nozīmē, ka statīni izraisa daudzus efektus, ne tikai holesterīnu mazinošos. Tie veicina endoteliālā NO veidošanos un nomāc vaskulāro iekaisumu. Zināms, ka statīni samazina cirkulējošos iekaisuma biomarķierus, piemēram, hs-CRP (augstas jutības C reaktīvais proteīns). (Babelova et al., 2013; Melmed, 2016)

Pētījumos uz dzīvniekiem noskaidrots, ka statīni veicina pangas regresiju, daļēji samazinot makrofāgu skaitu pangā. Pacientiem, veicot intravaskulārās sonogrāfijas izmeklējumus, noskaidrots, ka statīnu terapija samazina pangas izmēru, samazinot nekrotisko, lipīdiem bagāto pangas kodolu. Tomēr šis efekts tika panākts, ja statīnus deva pietiekošās devās (piemēram, >10 mg atorvastatīna) un ja ZBLH tika samazināts zem 100 mg/dL (2,59 mmol/L). (Babelova et al., 2013)



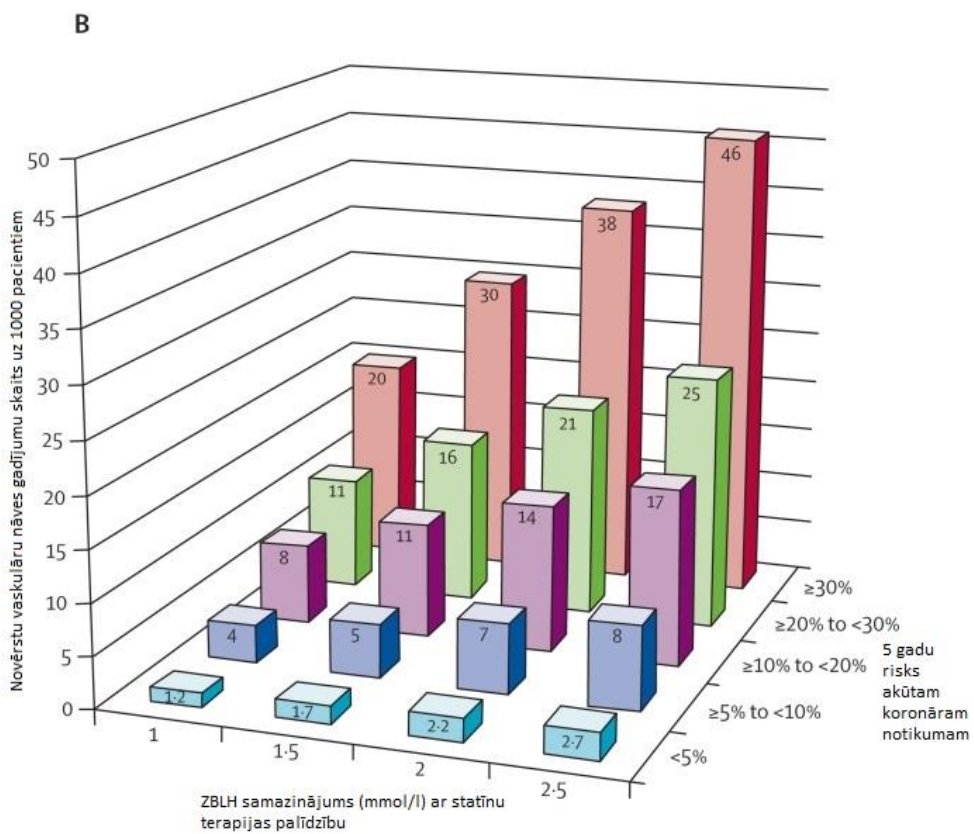
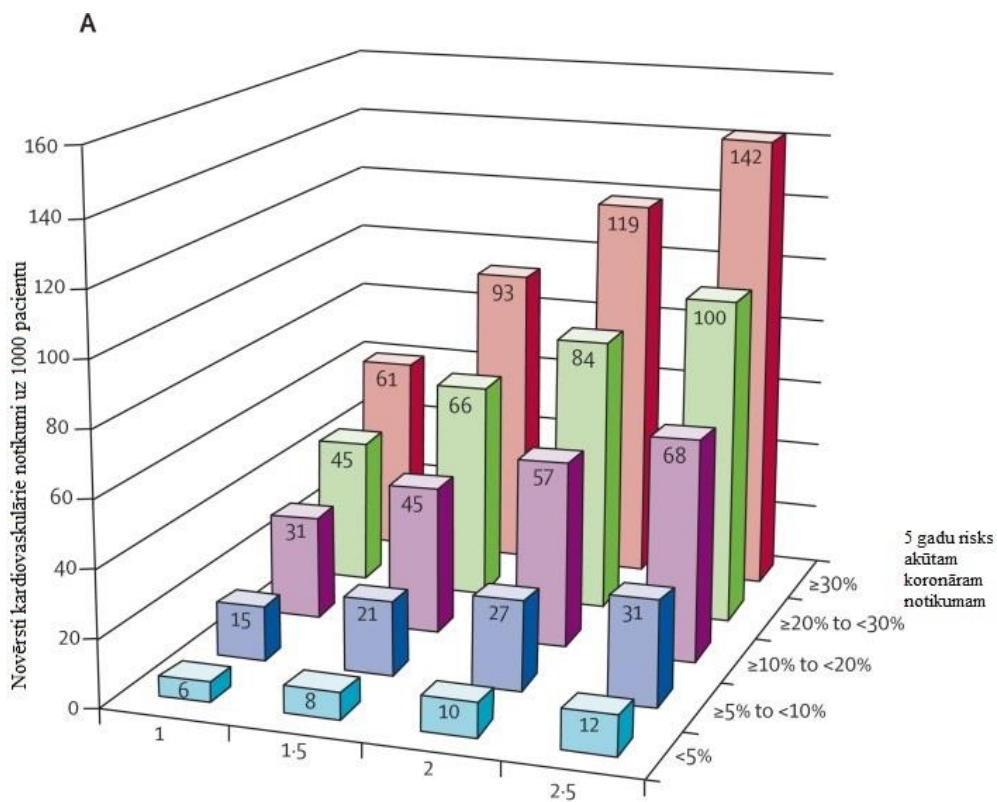
2.3. att. Statīnu darbības mehānisms (adaptēts pēc Bardou et al., 2010)

Apzīmējumi: eNOS – endoteliālā slāpekļa oksīda sintāze, NADPH – nikotīnamīda adenīndinukleotīda fosfāts

2.5. Metanalīzes par statīnu efektivitāti kardiovaskulārajā profilaksē

Metanalīzē, kurā tika iekļauti 27 randomizēti pētījumi, centās noskaidrot zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna (ZBLH) samazināšanas efektus ar statīniem, pacientiem ar zemu kardiovaskulāro risku. 22 no pētījumiem (n=134 537) salīdzināja statīnus pret kontroles grupu, piecos pētījumos (n= 39 612) salīdzināja mazākas statīnu devas pret lielākām.

Starp visiem 27 pētījumu pacientiem, par katru 1 mmol/L ZBLH samazinājuma, kardiovaskulāro notikumu risks samazinājās par 21% un mirstība no vaskulāriem cēloņiem samazinājās par 12%. Attēlā 3.2. redzams kardiovaskulāro notikumu samazinājums attiecībā pret ZBLH samazinājumu, kas sadalīts pa pacientu riska grupām. (Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaborators, 2012)



2.4. att. Kardiovaskulāro notikumu un nāves gadījumu samazinājums attiecībā pret ZBLH samazinājumu (adaptēts pēc Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaborators, 2012)

2006. gadā veiktā metanalīzē pētīja statīnu efektivitāti kardiovaskulāro notikumu primārajā profilaksē. Tika iekļauti 7 pētījumi (n=42 848). Deviņdesmit procentiem dalībnieku anamnēzē nebija datu par kardiovaskulārām saslimšanām. Statīnu terapija samazināja koronāro notikumu RR par 29,2% (95% CI, 16,7%-39,8%) (P<0,001), cerebrovaskulāro notikumu RR par 14,4% (95% CI, 2,8%-24,6%) (P = 0,02) un revaskularizācijas par 33,8% (95% CI, 19,6%-45,5%) (P<0,001). (Thavendiranathan et al., 2006)

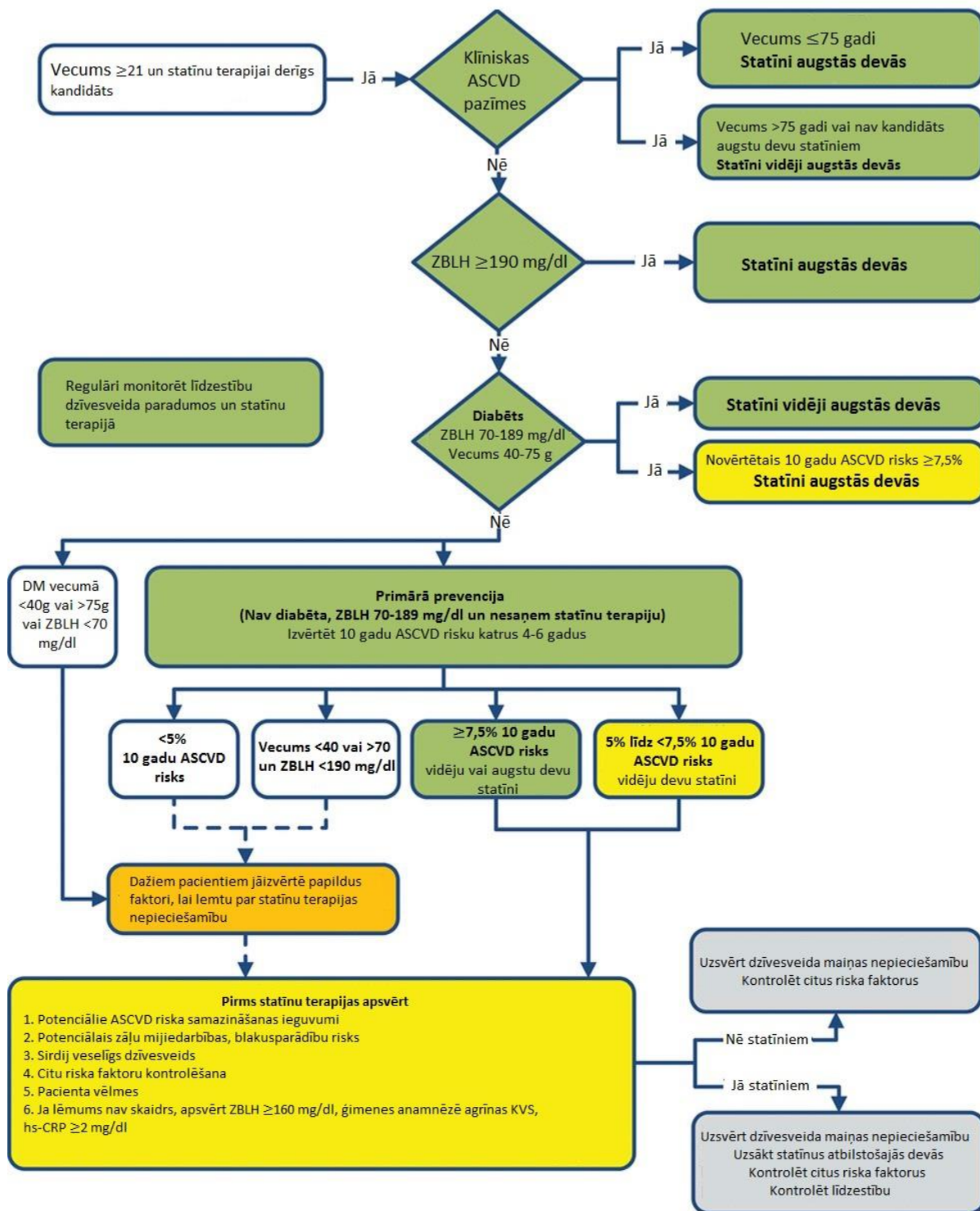
2010. gadā metanalīzē tika iekļauts 21 pētījums (n=129 526) ar statīniem pret kontroli, un 5 pētījumi (n=39 612) ar intensīvāku statīnu terapiju pret mazāk intensīvu.

Salīdzinājumā ar mazāk intensīvo terapiju, augstākas intensitātes statīnu terapija sniedza 15% samazinājumu vaskulārajos notikumos (95% CI 11–18; p<0,0001), kas sastāvēja no 13% samazinājuma koronāra cēloņa nāvēs un nefatāla miokarda infarkta (95% CI 7–19; p<0,0001), koronāro revaskularizāciju samazinājuma 19% (95% CI 15–24; p<0,0001) un išēmiska insulta samazinājuma par 16% (95% CI 5–26; p=0,005). Visos pētījumos kopā, jebkāda cēloņa mirstība samazinājās par 10% uz katru 1 mmol/L ZBLH samazinājuma. (Collaboration, C.T.T. (CTT), 2010)

2.6. 2013. gada ACC/AHA vadlīnijas par statīnu terapiju holesterīna un kardiovaskulārā riska mazināšanā

Vadlīnijas uzskaita četras pacientu grupas, kurām stingri ieteikts uzsākt statīnu terapiju, jo aterosklerotiskās kardiovaskulārās slimības (ASCVD) riska mazināšana atsver jebkādu citu risku. Šīs pacientu grupas ir: 1) sekundārā prevencija indivīdiem ar klīnisku ASCVD, 2) primārā prevencija indivīdiem ar primāri paaugstinātu ZBLH ≥ 190 mg/dL ($\geq 4,9$ mmol/L), 3) primārā prevencija 40 līdz 75 gadus veciem indivīdiem ar diabētu un ZBLH 70 – 189 mg/dL, 4) primārā prevencija 40 līdz 75 gadus veciem indivīdiem bez diabēta, 10 gadu ASCVD risku $\geq 7,5\%$ un ZBLH 70 – 189 mg/dL. Pētījumi vidējā līmenī atbalsta statīnu lietošanu primārai prevencijai 40 līdz 75 gadus veciem pacientiem ar 10 gadu risku 5 – 7,5% un ZBLH 70 – 189 mg/dL.

Primārai prevencijai pacientam ar ZBLH 70 – 189 mg/dL par statīnu nepieciešamību būtu jāvadās pēc absolūtā 10 gadu ASCVD riska. Gadījumos, kad uz 10 gadu risku balstīti lēmumi ir neskaidri, papildus faktori var ietekmēt lēmumu. Tie ir ZBLH ≥ 160 mg/dL, ģenētiskas hiperlipidēmijas, ģimenes anamnēzē pirmās pakāpes radniekam priekšlaicīga ASCVD (vīrietim <55 g., sievietei <65g.), augstas jutības CRO >2 mg/L, etniskā piederība, potītes-brahiālais indekss <0,9. Attēlā 3.3. sniegts algoritms statīnu terapijas uzsākšanai. (Stone et al., 2013)



2.5. att. Statīnu terapijas uzsākšanas algoritms (adaptēts pēc Stone et al., 2013)

2.7. 2016. gada ESC/EAS vadlīnijas dislipidēmijas ārstēšanai

Tā kā ateroskleroze ir multifaktoriāla slimība, Eiropas vadlīnijas balstās uz pacienta kopējā kardiovaskulārā riska izvērtēšanu, izmantojot SCORE (*Systemic Coronary Risk Estimation*) sistēmu. SCORE vērtēšanas kritērijos tiek iekļauts dzimums, vecums, smēķēšana, sistoliskais asinsspiediens un kopējais holesterīns. Attēlā 2.6. attēlota medikamentozās terapijas nepieciešamība dislipidēmijas ārstēšanai, atkarībā no SCORE riska un ZBLH līmeņiem.

Kopējais KV risks (SCORE) %	ZBLH līmeņi				
	<70 mg/dL <1.8 mmol/L	70 to <100 mg/dL 1.8 to <2.6 mmol/L	100 to <155 mg/dL 2.6 to <4.0 mmol/L	155 to <190 mg/dL 4.0 to <4.9 mmol/L	≥190 mg/dL ≥4.9 mmol/L
<1	Dzīvesveida ieteikumi	Dzīvesveida ieteikumi	Dzīvesveida ieteikumi	Dzīvesveida ieteikumi	Dzīvesveida ieteikumi, apsvērt medikamentozu terapiju
Class/Level	I/C	I/C	I/C	I/C	IIa/A
≥1 to <5	Dzīvesveida ieteikumi	Dzīvesveida ieteikumi	Dzīvesveida ieteikumi, apsvērt medikamentozu terapiju	Dzīvesveida ieteikumi, apsvērt medikamentozu terapiju	Dzīvesveida ieteikumi, apsvērt medikamentozu terapiju
Class/Level	I/C	I/C	IIa/A	IIa/A	I/A
≥5 to <10, or high-risk	Dzīvesveida ieteikumi	Dzīvesveida ieteikumi, apsvērt medikamentozu terapiju	Dzīvesveida ieteikumi un medikamentozā terapija	Dzīvesveida ieteikumi un medikamentozā terapija	Dzīvesveida ieteikumi un medikamentozā terapija
Class/Level	IIa/A	IIa/A	IIa/A	I/A	I/A
≥10 or very high-risk	Dzīvesveida ieteikumi, apsvērt medikamentozu terapiju	Dzīvesveida ieteikumi un medikamentozā terapija	Dzīvesveida ieteikumi un medikamentozā terapija	Dzīvesveida ieteikumi un medikamentozā terapija	Dzīvesveida ieteikumi un medikamentozā terapija
Class/Level	IIa/A	IIa/A	I/A	I/A	I/A

2.6. att. Medikamentozās terapijas nepieciešamība dislipidēmijas ārstēšanā atkarībā no SCORE un ZBLH (adaptēts pēc Catapano et al., 2016)

2.8. Statīnu ietekme uz acilkarnitīnu līmeni

Karnitīna-acilkarnitīna translokāze ir proteīns, kas nodrošina karnitīna un tā esterificētās formas šķērsošanu caur mitohondriālo membrānu. Tā ir svarīga sastāvdaļa taukskābju oksidācijas procesā. 2009. gadā veiktā pētījumā tika noskaidrots, ka statīni veicina karnitīna-acilkarnitīna translokāzi kodējošā gēna ekspresiju. (Iacobazzi et al., 2009)

1996. gadā tika pētīts lovastatīna efekts uz plazmas karnitīna un acilkarnitīnu līmeņiem trušos. Pēc 16 nedēļu kursa ar lovastatīnu 30 mg/dienā seruma brīvais karnitīns ($24,0 \pm 2,6$ pret $29,4 \pm 3,1$ microM) un totālais seruma karnitīna līmenis ($35,1 \pm 4,7$ pret $52,8 \pm 8,8$ microM) bija ievērojami paaugstinājušies. Totālā karnitīna pieaugums bija pārsvarā uz seruma acilkarnitīna rēķina ($12,7 \pm 3,1$ pret $26,5 \pm 5,7$ microM). (Bhuiyan and Seccombe, 1996)

Šobrīd starptautiski citējamās avotos nav atrodami pētījumi par statīnu ietekmi uz acilkarnitīnu koncentrācijām cilvēka organismā.

3. MATERIĀLI UN METODES

Iekļaušanas kritēriji

1. Pacients, kam ārstējošais ārsts ir rekomendējis uzsākt statīna terapiju atbilstoši klīniskajām vadlīnijām;
2. Pētījumā var tikt iekļauti pacienti, kam tiek nozīmēts jebkurš statīns jebkādā devā;
3. Pacients iepriekš pēdējo sešu nedēļu laikā nav saņēmis statīnus;
4. Vecums 18-80 gadi;
5. Pacients piekrīt piedalīties pētījumā, parakstot informēto piekrišanu.
6. Pacients piekrīt, ka pētījuma vizīšu dienās un dienās pirms vizītēm nelietos zivis un zivju produktus.
7. Pacients pēdējo 1 nedēļu nav lietojis karnitīnu vai to saturošus preparātus vai dzērienus, un piekrīt to(s) nelietot pētījuma laikā.

Datu iegūšanas metodes

Iekļaujамie pacienti tika meklēti un atlasīti PSKUS Sirds un asinsvadu kateterizācijas laboratorijas dienas stacionārā. Tika iegūta pacienta informēta rakstiska piekrišana par piedalīšanos pētījumā. Informācija par pacientu tika ierakstīta speciālās anketās. Kopumā tika veiktas 4 vizītes.

Pirmā vizīte (V1) – iekļaušanas vizīte, kurā tika reģistrēti sākotnējie pamatdati – identifikācijas dati, dzimums un vecums, pacienta ķermeņa masa un augums, informācija par kaitīgiem ieradumiem, kardiovaskulārā un cita anamnēze, diētas un dzīvesveida paradumi. Šīs vizītes dienas vakarā pacients uzsāka lietot statīnu atbilstoši ārsta rekomendētajam statīna veidam un devai. Otrā vizīte (V2) tika veikta nedēļu, trešā (V3) mēnesi un ceturrtā (V4) trīs mēnešus pēc statīnu terapijas uzsākšanas.

Visa pētījuma norise bija tikai novērojoša un farmakoterapija netika mainīta. Tomēr pētījuma ietvaros veikto asins bioķīmisko izmeklējumu rezultāti pacientam un ārstējošam ārstam bija pieejami.

Vizītēs V1, V3 un V4 tika veiktas asins bioķīmiskās analīzes: alanīna aminotransferāze (ALAT), tiešais bilirubīns (TB) un netiešais bilirubīns (NTB), kreatinīns, kopējais holesterīns, augsta blīvuma lipoproteīnu holesterīns (ABLH), zema blīvuma lipoproteīnu holesterīns (ZBLH),

triglicerīdi (TG), kreatīnkināze (CK jeb KFK). Pacienti tika analizēti elektrokardiogramma (EKG) V1 vizītē.

Katrā vizītē visiem pacientiem no vēnas tika paņemti asins plazmas paraugi ilgtermiņa uzglabāšanai ultrazemās temperatūrās: katrā reizē šim nolūkam ieguva 6 ml asins parauga EDTA stobriņā, kas nekavējoties tika centrēts un saglabāts saldētavā pie -80 līdz -85°C. Šajos paraugos tika analizēti glikozes, C-peptīda, acilkarnitīnu un citu bioloģisko vielu sastāvs.

Izmeklējuma dienā un dienu pirms vizītes pacientiem tika lūgts nelietot zivis un zivis saturošus produktus, kā arī nelietot omega-3 taukskābju (TS) preparātus, to skaitā uztura bagātinātājus.

Izmantotie materiāli

- EDTA stobriņi- trīs 3 ml un viens 6 ml
- Mikromēģenes plazmas un seruma uzglabāšanai (micro tube 1.5 ml)
- Pipete (finnpipette 200 - 1000 µL)
- Centrifūga (EBA 20 Hettich)
- Saldētava (eppendorf CryoCube F570h)

Datu statistiskā apstrāde tika veikta ar SPSS programmu. Par statistiski ticamiem rezultātiem tika uzskatīti rezultāti ar p vērtību <0,05. Kvantitatīvie mainīgie tika raksturoti ar vidējo aritmētisko un standartdeviāciju, bet kategoriskie mainīgie ar skaitu un procentiem. Kvantitatīvo mainīgo salīdzinājums tika veikts ar neparametriskajiem testiem: pēc *Wilcoxon Signed Ranks test* starp pāru grupām un pēc *Spearman* testa, lai noskaidrotu korelācijas starp dažādiem mainīgajiem.

4. REZULTĀTI

4.1. Pētāmās pacientu grupas objektīvais raksturojums, kardiovaskulārie riska faktori un statīnu terapijas režīms

Pētījumā šobrīd ir iekļauti 35 pacienti – 20 vīrieši (57%) un 15 sievietes (43%), kas piekrita piedalīties un atbilst iekļaušanas kritērijiem. No šiem dalībniekiem, diplomdarba rakstīšanas brīdī, 28 pacientiem ir noteiktas bioķīmijas un acilkarnitīnu analīzes pirmajā un otrajā vizītē, 25 pacientiem analīzes noteiktas arī trešajā vizītē, bet tikai 20 pacientam ir noteiktas acilkarnitīnu un bioķīmiskās analīzes visās četrās vizītēs. Pieciem pacientiem, šo 20 pacientu vidū, atkārtoto vizīšu laikā plazmā netika atrastas statīnu koncentrācijas, kas liecina par nelīdzestību. Diplomdarbā tika analizēti 15 pacienti, kuriem pieejami visu vizīšu analīžu rezultāti un kuriem ir pierādīta līdzestība statīnu lietošanā.

15 pacienti, kas tiek analizēti, sastāv no 7 sievietēm un 8 vīriešiem. Dalībnieku raksturojumu un kardiovaskulāros riska faktorus var skatīt 4.1. tabulā. Tabulā 4.2. redzams pacientu lietotais statīnu veids un deva.

4.1. tabula

Pētāmās pacientu grupas objektīvie raksturlielumi, kardiovaskulārie riska faktori un slimības

Analizētie parametri	V1 (n=15)	V2 (n=15)	V3 (n=15)	V4 (n=15)
Sievietes (%)	7 (47%)			
Vīrieši (%)	8 (53%)			
Vecums, vidējais \pm SD	60,2 \pm 9,04			
Augums, vidējais \pm SD (m)	1,71 \pm 0,09			
Svars, vidējais \pm SD, kg	83,47 \pm 15,09	83,80 \pm 14,98	83,00 \pm 14,54	83,33 \pm 14,34
KMI, vidējais \pm SD kg/m ²	28,09 \pm 4,68	28,50 \pm 4,54	28,21 \pm 4,20	28,34 \pm 4,24
Vidukļa apkārtmērs, vidējais \pm SD, cm	96,20 \pm 11,17	96,47 \pm 11,09	96,47 \pm 10,96	96,47 \pm 10,96

Slimības un kardiovaskulārie riska faktori				
Cukura diabēts	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Tukšas dūšas hiperglikēmija anamnēzē	2 (13,3%)	3 (20%)	3 (20%)	3 (20%)
Arteriālā hipertenzija	13 (86,7%)	13 (86,7%)	14 (93,3%)	14 (93,3%)
Smēķēšana	1 (6,7%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)
Stabila slodzes stenokardija	10 (66,7%)	10 (66,7%)	10 (66,7%)	10 (66,7%)
Miokarda infarkts anamnēzē	1 (6,7%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)
KAŠ anamnēzē	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PCI anamnēzē	0 (0%)	0 (0%)	2 (13,3%)	3 (20%)
Insults anamnēzē	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Veikta digitālā koronārā angiogrāfija	10 (66,7%)	10 (66,7%)	10 (66,7%)	10 (66,7%)
Miega artēriju ateroskleroze	4 (26,7%)	4 (26,7%)	4 (26,7%)	4 (26,7%)
HSM	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

4.2. tabula

Dalībnieku lietoto statīnu veidi un devas

	20mg	40mg	80mg	Kopā
Atorvastatīns	0 (0%)	3 (20%)	1 (6,7%)	4 (26,7%)
Rosuvastatīns	6 (40%)	5 (33,3%)	0 (0%)	11 (73,3%)

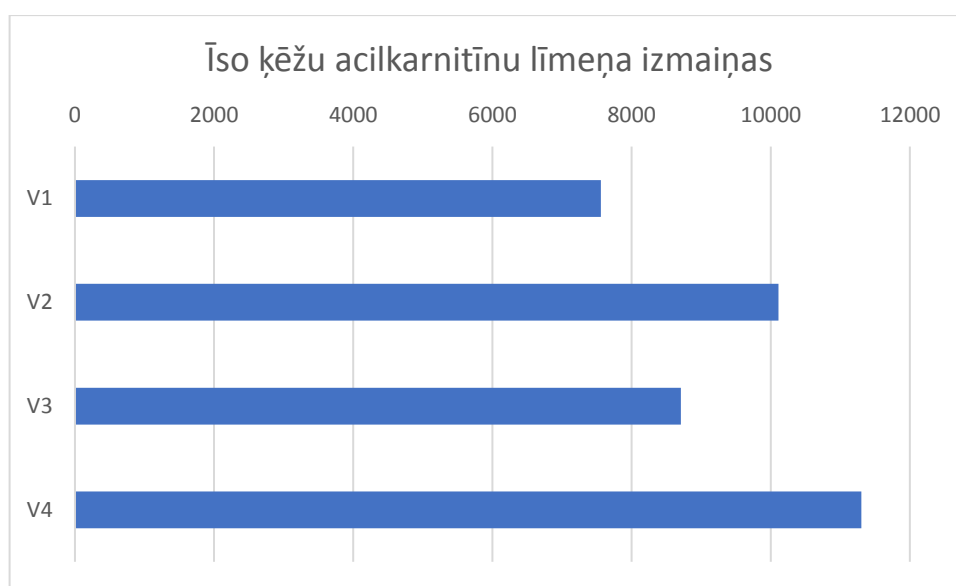
4.2. Plazmas acilkarnitīnu izmaiņas statīnu terapijas laikā

Analizējot plazmas īso ķēžu acilkarnitīnu mediāno vērtību izmaiņas noskaidrojās, ka ir statistiski ticams ($p=0,027$) acilkarnitīnu līmeņa pieaugums no pirmās līdz otrajai vizītei par 2550,65 pmol/ml un statistiski ticams ($p=0,003$) pieaugums no pirmās līdz ceturtajai vizītei par 3740,90 pmol/ml. Pieaugumā no pirmās līdz trešajai vizītei nebija vērojama statistiska ticamība. Īso ķēžu acilkarnitīnu izmaiņas skatāmas tabulā 4.3. un to grafiskais atainojums skatāms attēlā 4.1.

4.3. tabula

Plazmas īso ķēžu acilkarnitīnu izmaiņas pētījuma laikā

	V1(n=15)	V2(n=15)	V3(n=15)	V4(n=15)	Absolūtās izmaiņas mediānā	P vērtība
Īso ķēžu acilkarnitīnu līmeņa izmaiņas, mediāna (IQR)	7560,68 (6000,64-10471,39)	10111,33 (8653,15-11857,58)			+2550,65	0,027
	7560,68 (6000,64-10471,39)		8709,95 (6195,35-11134,54)		+1149,27	0,369
	7560,68 (6000,64-10471,39)			11301,58 (9897,52-12935,22)	+3740,90	0,003



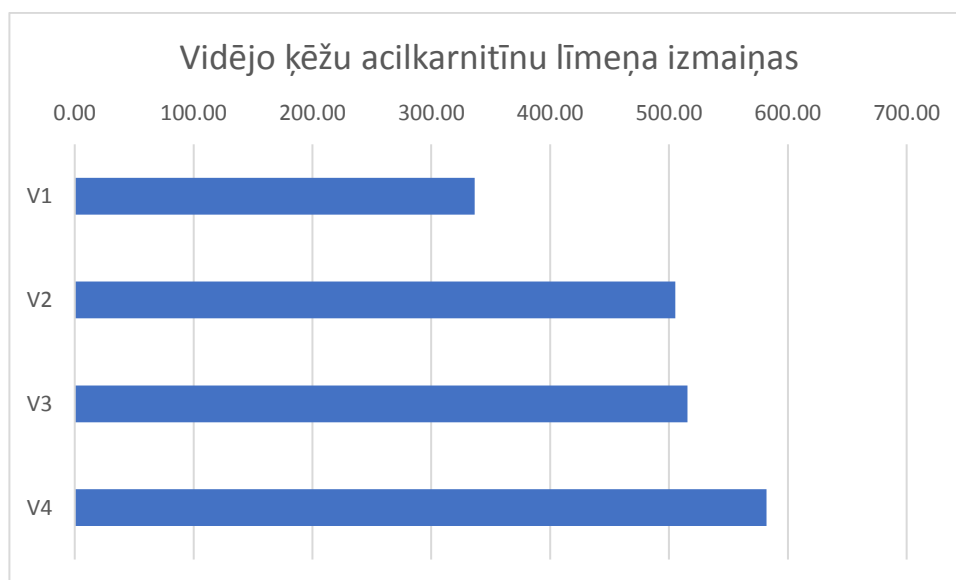
4.1.att. Īso ķēžu acilkarnitīnu līmeņa izmaiņas pētījuma laikā

Vidēja garuma ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijā ir vērojams statistiski ticams pieaugums no statīnu uzsākšanas līdz otrajai vizītei par 168,95 pmol/ml ($p=0,027$). Trešajā vizītē šis pieaugums jau bija 179,10 pmol/ml ($p=0,020$), bet ceturtajā vizītē 245,74 pmol/ml ($p=0,004$). Vidējo ķēžu acilkarnitīnu izmaiņas skatāmas tabulā 4.4. un to grafiskais atainojums skatāms attēlā 4.2.

4.4. tabula

Plazmas vidējo ķēžu acilkarnitīnu izmaiņas pētījuma laikā

	V1(n=15)	V2(n=15)	V3(n=15)	V4(n=15)	Absolūtās izmaiņas mediānā	p vērtība
Vidējo ķēžu acilkarnitīnu līmeņa izmaiņas, mediāna (IQR)	336,43 (279,99-460,74)	505,38 (439,64-692,03)			+168,95	0,027
	336,43 (279,99-460,74)		515,53 (432,86-728,61)		+179,10	0,020
	336,43 (279,99-460,74)			582,17 (426,55-648,83)	+245,74	0,004



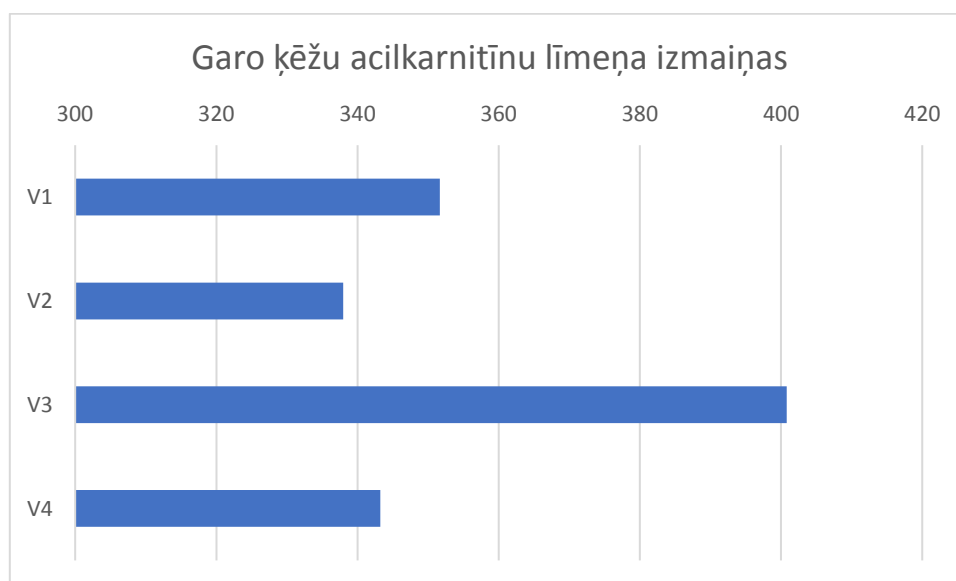
4.2.att. Vidējo ķēžu acilkarnitīnu līmeņa izmaiņas pētījuma laikā

Garu ķēžu acilkarnitīnu mediānu vērtībās nebija vērojamas statistiski nozīmīgas izmaiņas vizīšu laikā. No statīnu uzsākšanas brīža, garu ķēžu acilkarnitīnu vērtības līdz otrajai vizītei samazinājās. Trešajā vizītē bija vērojams straujš, statistiski nenozīmīgs, garu ķēžu acilkarnitīnu koncentrāciju pieaugums, kas ceturtajā vizītē bija atkal samazinājies. Garu ķēžu acilkarnitīnu izmaiņas skatāmas tabulā 4.5. un to grafiskais atainojums skatāms attēlā 4.3.

4.5. tabula

Plazmas garu ķēžu acilkarnitīnu izmaiņas pētījuma laikā

	V1(n=15)	V2(n=15)	V3(n=15)	V4(n=15)	Absolūtās izmaiņas mediānā	p vērtība
Garu ķēžu acilkarnitīnu līmeņa izmaiņas, mediāna (IQR)	351,64 (256,82-491,85)	337,97 (280,76-419,55)			-13,67	0,496
	351,64 (256,82-491,85)		400,80 (299,29-445,75)		+49,16	0,609
	351,64 (256,82-491,85)			343,22 (288,80-384,25)	-8,42	0,776



4.3.att. Garu ķēžu acilkarnitīnu līmeņa izmaiņas pētījuma laikā

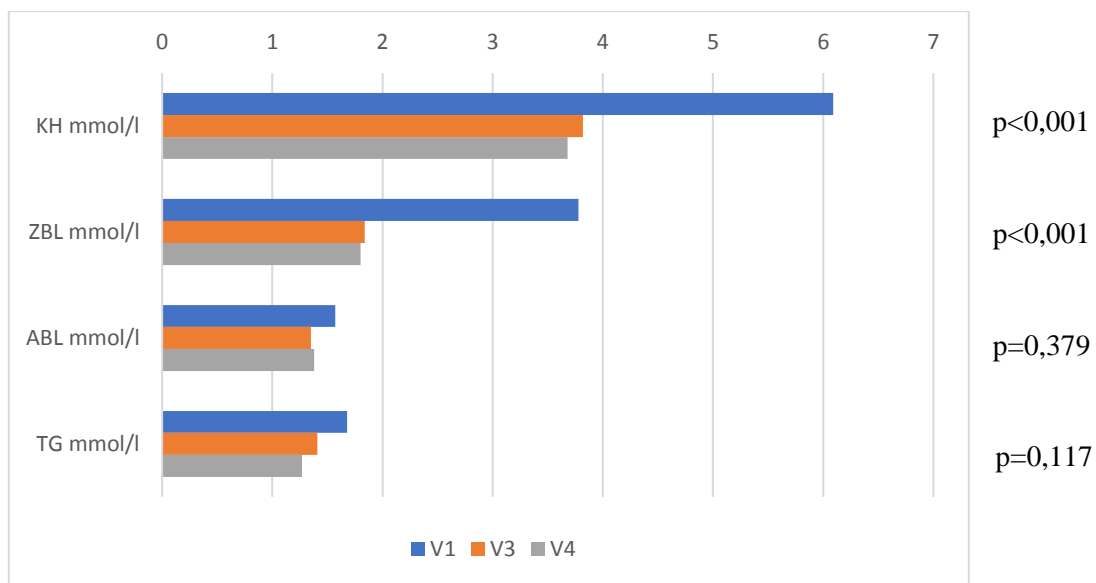
4.3. Asins bioķīmisko rādītāju izmaiņas statīnu terapijas laikā

Dalībnieku kopējā holesterīna vidējā vērtība no statīnu uzsākšanas brīža līdz trešajai vizītei statistiski ticami samazinājās par 2,27 mmol/l ($p < 0,001$). Novērojama bija arī zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna samazināšanās par 1,94 mmol/l ($p < 0,001$). Augsta blīvuma lipoproteīnu un triglicerīdu līmeņu izmaiņās nebija statistiskas ticamības. Statistiski ticami pieauga gan ALAT, gan kreatinīna, gan kreatīnkināzes koncentrācijas. Bioķīmisko rādītāju apkopotās izmaiņas skatāmas tabulā 4.6. un attēlos 4.4., 4.5.

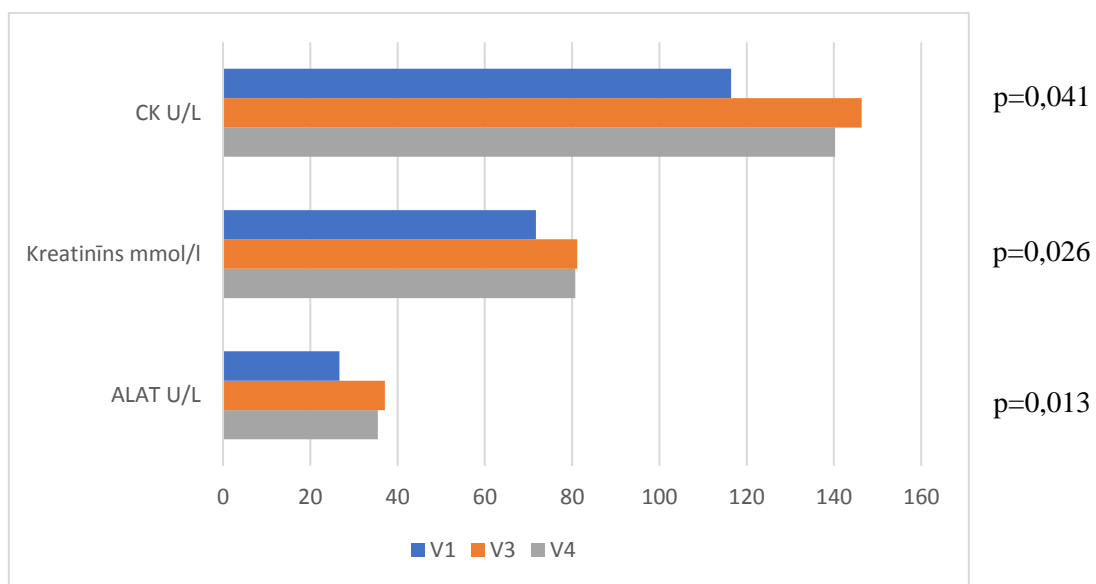
4.6. tabula

Seruma bioķīmisko rādītāju izmaiņas

Bioķīmiskais parametrs	V1	V3	Absolūtās izmaiņas	p vērtība	V1	V4	Absolūtās izmaiņas	P vērtība
KH mmol/l, vidējais ±SD	6,09 ±1,33	3,82 ±1,01	-2,27	0,001	6,09 ±1,33	3,86 ±0,83	-2,23	0,001
ZBLH mmol/l, vidējais ±SD	3,78 ±0,68	1,84 ±0,62	-1,94	0,001	3,78 ±0,68	1,80 ±0,59	-1,98	0,001
ABLH mmol/l, vidējais ±SD	1,57 ±0,76	1,35 ±0,45	-0,22	0,379	1,57 ±0,76	1,38 ±0,35	-0,19	0,865
TG mmol/l, vidējais ±SD	1,68 ±1,25	1,41 ±0,72	-0,27	0,117	1,68 ±1,25	1,27 ±0,64	-0,41	0,013
ALAT U/L, vidējais ±SD	26,67 ±12,13	37,07 ±21,42	+10,40	0,013	26,67 ±12,13	35,47 ±19,67	+8,8	0,018
Kreatinīns mmol/l, vidējais ±SD	71,71 ±13,26	81,17 ±16,36	+9,46	0,026	71,71 ±13,26	80,75 ±12,79	+9,04	0,026
CK U/L, vidējais ±SD	116,47 ±63,84	146,36 ±116,26	+29,89	0,041	116,47 ±63,84	140,27 ±97,12	+23,8	0,029



4.4.att. Plazmas lipīdu izmaiņas pētījuma laikā



4.5.att. ALAT, kreatinīna un kreatīnkināzes izmaiņas pētījuma laikā

4.4. Bioķīmisko rādītāju izmaiņu korelācija ar acilkarnitīnu izmaiņām

Analizējot korelācijas starp pirmās līdz trešās vizītes acilkarnitīnu izmaiņām un seruma bioķīmisko rādītāju izmaiņām, tika noskaidrots, ka pastāv statistiski ticama korelācija starp KH un garo ķēžu acilkarnitīnu izmaiņām, starp CK un vidējo ķēžu acilkarnitīnu izmaiņām, kā arī kreatinīna izmaiņas korelēja gan ar gara, gan vidēja, gan īsa garuma acilkarnitīnu izmaiņām. Korelācijas starp pirmās un trešās vizītes bioķīmisko rādītāju un acilkarnitīnu izmaiņām skatāmas tabulā 4.7. Netika atrastas statistiski ticamas korelācijas starp ZBL, ABL, TG, ALAT izmaiņām un acilkarnitīnu izmaiņām starp pirmo un trešo vizīti.

Starp pirmās un ceturtās vizītes seruma bioķīmisko rādītāju izmaiņām un acilkarnitīnu izmaiņām netika novērotas statistiski ticamas korelācijas.

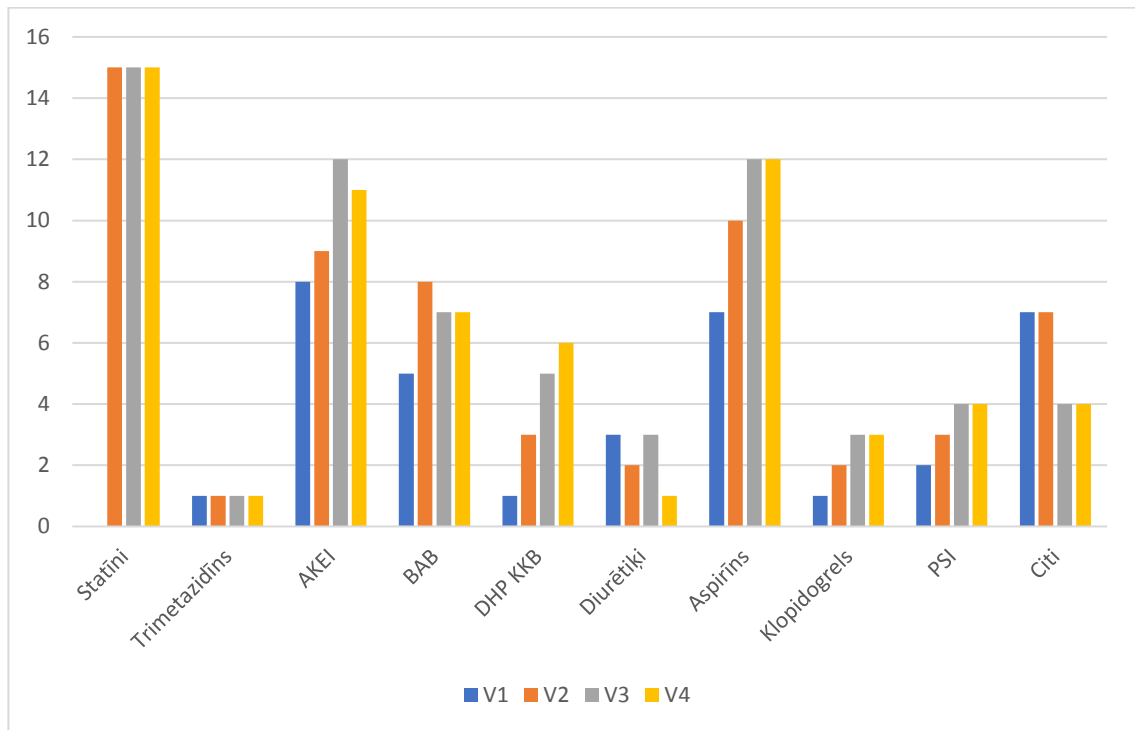
4.7. tabula

Korelācijas starp seruma bioķīmisko rādītāju un acilkarnitīnu izmaiņām mēnesi pēc statīnu terapijas uzsākšanas

	Īso ķēžu AK		Vidējo ķēžu AK		Garo ķēžu AK	
	Korelācijas koeficients	p vērtība	Korelācijas koeficients	p vērtība	Korelācijas koeficients	p vērtība
KH	0,432	0,108	0,318	0,248	0,518	0,048
ZBLH	0,304	0,271	0,079	0,781	0,296	0,283
ABLH	-0,500	0,058	-0,214	0,443	-0,279	0,315
TG	0,182	0,516	0,382	0,159	0,080	0,776
ALAT	-0,323	0,240	-0,490	0,064	-0,402	0,138
Kreatinīns	0,715	0,013	0,579	0,062	0,879	0,001
CK	0,202	0,470	0,622	0,013	0,261	0,348

4.5. Lietotie medikamenti

Pētījuma dalībnieku lietotie medikamenti apkopoti attēlā 4.6. Biežākie no citiem medikamentiem, kas tika lietoti, bija D3 vitamīns, polivitamīni, kalcijs, magnijs. Viens dalībnieks lietoja budezonīda/formoterola inhalatoru bronhiālās astmas dēļ, kāds cits pacients lietoja tramadolu, hronisku sāpju kupēšanai.



4.6.att. Dalībnieku lietotie medikamenti pētījuma laikā

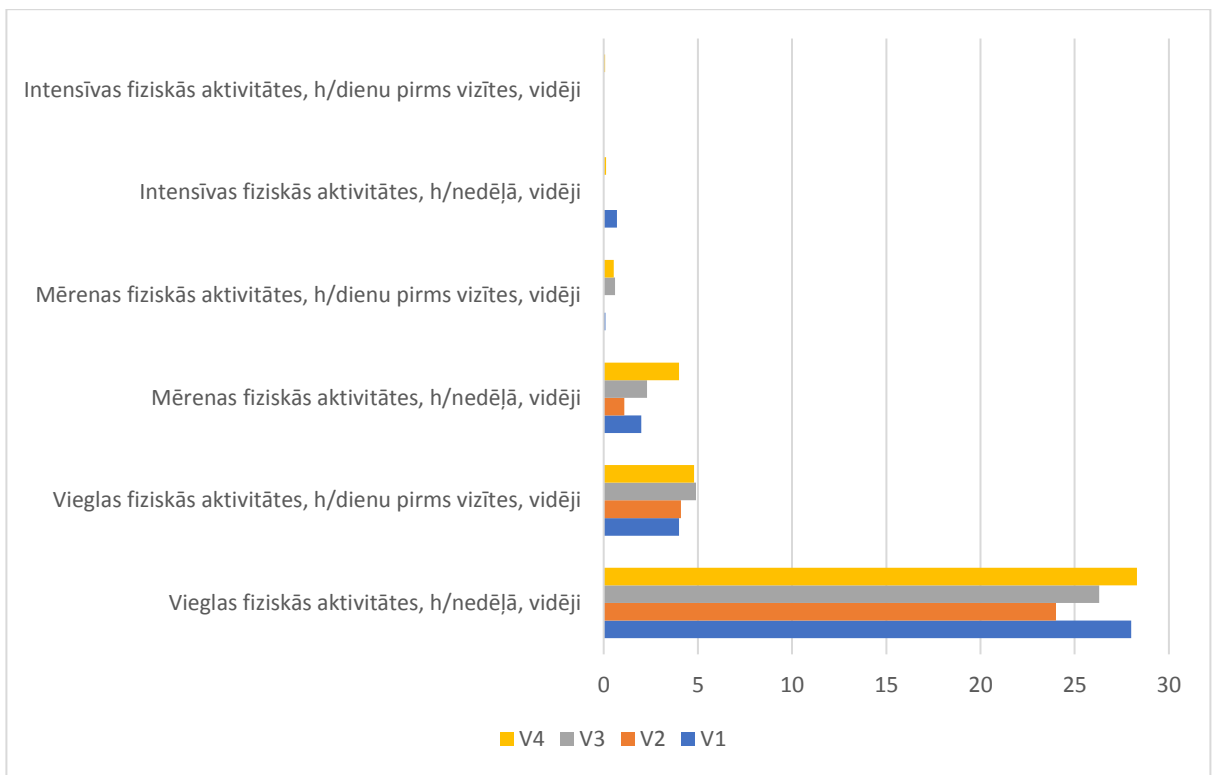
4.6. Pētāmo pacientu uzturs un fiziskās aktivitātes

Dati par pētījuma dalībnieku uzturu ir apkopoti 4.8. tabulā. Pētījuma dalībnieku fizisko aktivitāšu intensitāte un apjoms atainoti attēlā 4.7. Netika atrastas ticamas korelācijas starp dalībnieku fizisko aktivitāšu intensitāti, PREDIMED skalas kopējo rezultātu un acilkarnitīnu koncentrācijām.

4.8. tabula

Pētījuma dalībnieku uztura paradumi

Analizētie parametri	V1 (n=15)	V2 (n=15)	V3 (n=15)	V4 (n=15)
Lieto uzturā zivis, n(%)	14 (93,3%)	15 (100%)	15 (100%)	15 (100%)
Cik reizes nedēļā, vidējais ±SD	1,60 ±1,12	2,20 ±1,47	2,60 ±1,60	2,73 ±1,28
Lieto uzturā sarkano gaļu, n(%)	10 (66,7%)	9 (60%)	10 (78,6%)	10 (78,6%)
Cik reizes nedēļā, vidējais ±SD	1,20 ±1,47	1,07 ±1,16	1,27 ±1,22	1,20 ±1,26
Lieto uzturā putna gaļu, n(%)	11 (73,3%)	11 (73,3%)	11 (73,3%)	11 (73,3%)
Cik reizes nedēļā, vidējais ±SD	2,13 ±1,64	2,33 ±1,80	1,80 ±1,37	2,27 ±2,02
Lieto uzturā olas, n(%)	14 (93,3%)	12 (80%)	12 (80%)	12 (80%)
Cik reizes nedēļā, vidējais ±SD	2,13 ±1,46	1,47 ±1,30	1,47 ±1,06	1,13 ±0,83
PREDIMED skala kopā, vidējais ±SD	5,53 ±1,81	5,40 ±1,88	5,27 ±2,15	5,60 ±2,32



4.7.att. Dalībnieku fizisko aktivitāšu apjoms un intensitāte

5. DISKUSIJA

Pētījuma galvenais mērķis (noskaidrot, vai statīnu terapija ietekmē plazmas acilkarnitīnu koncentrācijas) tika sasniegts. Pētījuma preeliminārajos rezultātos pierādījās, ka īsu un vidēju ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas plazmā statistiski ticami palielinās pēc statīnu terapijas uzsākšanas, kas sakrīt ar darbā izvirzīto hipotēzi.

Kā iespējamu skaidrojumu acilkarnitīnu koncentrāciju pieaugumam varētu uzskatīt aknu un muskuļu metabolisma izmaiņas, kas atspoguļojas arī ALAT un CK pieaugumā, statīnu terapijas ietekmē. Lai gan ALAT koncentrāciju pieaugums nekorelēja ar acilkarnitīnu pieaugumu, korelācija bija novērojama starp CK un vidēju ķēžu acilkarnitīnu pieaugumu. Šī korelācija vedina apsvērt šādu skaidrojumu.

Paliek neskaidrs jautājums, kāpēc garo ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijās nebija vērojamas līdzīgas izmaiņas kā vidēja un īsa garuma acilkarnitīnos. Nedēļu pēc terapijas uzsākšanas garo ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas bija samazinājušās. Vizītē pēc mēneša, to koncentrācijas bija palielinājušās, bet pēc trim mēnešiem – samazinājušās. Tomēr šajās izmaiņās nebija vērojama statistiska ticamība.

Skaidri redzama seruma KH un ZBLH samazināšanās mēnesi pēc statīnu terapijas uzsākšanas. KH izmaiņu korelācija ar garo ķēžu acilkarnitīnu izmaiņām norāda uz daļēju acilkarnitīnu korelāciju ar statīnu hipolipidimizējošo efektu. Tika arī novērota statistiski ticama paaugstināšanās bioķīmiskajos rādītājos, kas asociēti ar statīnu terapiju (ALAT, kreatinīns, CK), kā arī CK un kreatinīna izmaiņu korelācija ar acilkarnitīnu izmaiņām mēnesi pēc terapijas uzsākšanas. Neskaidrs paliek tas, kāpēc netika atrastas korelācijas starp šiem pašiem rādītājiem trīs mēnešus pēc terapijas uzsākšanas. Kā iespējamie skaidrojumi varētu būt metabolisma adaptācija vai nejaušības faktors.

Acilkarnitīnu izmaiņu korelācija ar seruma kreatinīna izmaiņām iespējams norāda uz acilkarnitīnu saikni ar nieru ekskretoro funkciju. Pētījumos bijis pierādīts, ka pacientiem ar HNS acilkarnitīnu līmenis plazmā apgriezti korelē ar GFR – jo sliktāka nieru funkcija, jo augstāki acilkarnitīnu līmeņi plazmā. (Fouque et al., 2006)

No pētījuma priekšrocībām minams, ka tas bija prospektīvs pētījums, pacientiem asinīs tika noteiktas statīnu koncentrācijas, lai pārlicinātos par līdzestību un tas, ka līdz šim starptautiski citējamās avotos nav atrodams pētījums par to, kā statīnu terapija cilvēkam ietekmētu acilkarnitīnu līmeņus plazmā.

Kā pētījuma trūkumi minami salīdzinoši mazs pētāmo skaits un kontrolgrupas trūkums. Kontrolgrupas ieviešana pētījumā ļautu labāk noteikt atšķirību starp statīnu terapijas un citu faktoru ietekmi uz acilkarnitīnu koncentrācijām un to korelācijām ar bioķīmiskajiem rādītājiem. Pētījumu plānots turpināt, kā rezultātā tiks iegūta plašāka pētāmo cilvēku populācija, palielināta pētījuma statistiskā jauda un iegūti ticamāki novērojumi.

6. SECINĀJUMI

1. Analizējot prelimināros datus no pirmajiem 15 pētījuma dalībniekiem tika secināts, ka trīs mēnešus pēc statīnu terapijas uzsākšanas īsa un vidēja garuma ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas palielinās un pirmās izmaiņas jau vērojamas nedēļu pēc statīnu terapijas uzsākšanas.
2. Garo ķēžu acilkarnitīnu koncentrācijās nav vērojamas statistiski ticamas izmaiņas.
3. Mēnesi pēc statīnu terapijas uzsākšanas ir vērojama KH, CK un kreatinīna izmaiņu korelācija ar acilkarnitīnu izmaiņām.
4. Neizdevās pierādīt ZBLH, ABLH, TG, ALAT koncentrāciju izmaiņu korelāciju ar acilkarnitīnu izmaiņām.

PATEICĪBAS

Vissirsnīgāko pateicību izsaku saviem vecākiem un vecmammai par atbalstu un mīlestību, ko man sniedza.

Izsaku milzīgu pateicību profesoram G. Latkovskim par zināšanām un atbalstu, kas tika sniegts, diplomdarba izstrādāšanas procesā.

Jānis Feldmanis

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Adams, S.H., Hoppel, C.L., Lok, K.H., Zhao, L., Wong, S.W., Minkler, P.E., Hwang, D.H., Newman, J.W., Garvey, W.T., 2009. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *J. Nutr.* 139, 1073–1081. doi:10.3945/jn.108.103754
2. Ahmad, T., Kelly, J.P., McGarrah, R.W., Hellkamp, A.S., Fiuzat, M., Testani, J.M., Wang, T.S., Verma, A., Samsky, M.D., Donahue, M.P., Ilkayeva, O.R., Bowles, D.E., Patel, C.B., Milano, C.A., Rogers, J.G., Felker, G.M., O'Connor, C.M., Shah, S.H., Kraus, W.E., 2016. Prognostic Implications of Long-Chain Acylcarnitines in Heart Failure and Reversibility With Mechanical Circulatory Support. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67, 291–299. doi:10.1016/j.jacc.2015.10.079
3. Babelova, A., Sedding, D.G., Brandes, R.P., 2013. Anti-atherosclerotic mechanisms of statin therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13, 260–264. doi:10.1016/j.coph.2013.01.004
4. Bardou, M., Barkun, A., Martel, M., 2010. Effect of statin therapy on colorectal cancer. *Gut* 59, 1572–1585. doi:10.1136/gut.2009.190900
5. Bhuiyan, J., Secombe, D.W., 1996. The effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition on tissue levels of carnitine and carnitine acyltransferase activity in the rabbit. *Lipids* 31, 867–870.
6. Cassol, E., Misra, V., Morgello, S., Kirk, G.D., Mehta, S.H., Gabuzda, D., 2015. Altered monoamine and acylcarnitine metabolites in HIV-positive and HIV-negative subjects with depression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1999 69, 18–28. doi:10.1097/QAI.0000000000000551
7. Catapano, A.L., Graham, I., Backer, G.D., Wiklund, O., Chapman, M.J., Drexel, H., Hoes, A.W., Jennings, C.S., Landmesser, U., Pedersen, T.R., Reiner, Ž., Riccardi, G., Taskinen, M.-R., Tokgozoglul, L., Verschuren, W.M.M., Vlachopoulos, C., Wood, D.A., Zamorano, J.L., 2016. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Atherosclerosis* 253, 281–344. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.018
8. Cholesterol Treatment Trialists (CTT) Collaborators, 2012. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet* 380, 581–590. doi:10.1016/S0140-6736(12)60367-5

9. Christie, W., Carnitine and Acylcarnitines - AOCS Lipid Library. Pieejams:
<http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39299> (skatīts 18.02.2017.)
10. Collaboration, C.T.T. (CTT), 2010. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials. *The Lancet* 376, 1670–1681. doi:10.1016/S0140-6736(10)61350-5
11. Cristofano, A., Sapere, N., La Marca, G., Angiolillo, A., Vitale, M., Corbi, G., Scapagnini, G., Intrieri, M., Russo, C., Corso, G., Di Costanzo, A., 2016. Serum Levels of Acyl-Carnitines along the Continuum from Normal to Alzheimer’s Dementia. *PLoS ONE* 11. doi:10.1371/journal.pone.0155694
12. Danese, C., Cirene, M., Colotto, M., Aratari, A., Amato, S., Di Bona, S., Curione, M., 2011. Cardiac involvement in inflammatory bowel disease: role of acylcarnitine esters. *Clin. Ter.* 162, e105-109.
13. David N. Nelson, Michael M. Cox *Lehninger Principles of Biochemistry.*, Chapter 17. Fatty acid catabolism., sixth edition., (2013)., W.H. Freeman and Company, (634-636)
14. Fouque, D., Holt, S., Guebre-Egziabher, F., Nakamura, K., Vianey-Saban, C., Hadj-Aïssa, A., Hoppel, C.L., Kopple, J.D., 2006. Relationship between serum carnitine, acylcarnitines, and renal function in patients with chronic renal disease. *J. Ren. Nutr. Off. J. Counc. Ren. Nutr. Natl. Kidney Found.* 16, 125–131. doi:10.1053/j.jrn.2006.01.004
15. Guasch-Ferré, M., Zheng, Y., Ruiz-Canela, M., Hruby, A., Martínez-González, M.A., Clish, C.B., Corella, D., Estruch, R., Ros, E., Fitó, M., Dennis, C., Morales-Gil, I.M., Arós, F., Fiol, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Hu, F.B., Salas-Salvadó, J., 2016. Plasma acylcarnitines and risk of cardiovascular disease: effect of Mediterranean diet interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 103, 1408–1416. doi:10.3945/ajcn.116.130492
16. Iacobazzi, V., Convertini, P., Infantino, V., Scarcia, P., Todisco, S., Palmieri, F., 2009. Statins, fibrates and retinoic acid upregulate mitochondrial acylcarnitine carrier gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 643–647. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.008
17. Melmed, S., 2016. *Williams Textbook of Endocrinology.* Elsevier Health Sciences.
18. Mihalik, S.J., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E., Chace, D.H., Vockley, J., Toledo, F.G.S., DeLany, J.P., 2010. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipototoxicity. *Obes. Silver Spring Md* 18, 1695–1700. doi:10.1038/oby.2009.510

19. Reuter, S.E., Evans, A.M., 2012. Carnitine and Acylcarnitines: Pharmacokinetic, Pharmacological and Clinical Aspects. *Clin. Pharmacokinet.* 51, 553–572.
doi:10.2165/11633940-000000000-00000
20. Schooneman, M.G., Vaz, F.M., Houten, S.M., Soeters, M.R., 2013. Acylcarnitines. *Diabetes* 62, 1–8. doi:10.2337/db12-0466
21. Stone, N.J., Robinson, J., Lichtenstein, A.H., Merz, C.N.B., Blum, C.B., Eckel, R.H., Goldberg, A.C., Gordon, D., Levy, D., Lloyd-Jones, D.M., McBride, P., Schwartz, J.S., Shero, S.T., Smith, S.C., Watson, K., Wilson, P.W.F., 2013. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *Circulation* 01.cir.0000437738.63853.7a.
doi:10.1161/01.cir.0000437738.63853.7a
22. Thavendiranathan, P., Bagai, A., Brookhart, M.A., Choudhry, N.K., 2006. Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch. Intern. Med.* 166, 2307–2313. doi:10.1001/archinte.166.21.2307
23. Vilskersts, R., Kuka, J., Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Makarova, E., Sevostjanovs, E., Cirule, H., Grinberga, S., Dambrova, M., 2015. Methyl- γ -butyrobetaine decreases levels of acylcarnitines and attenuates the development of atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* 72, 101–107. doi:10.1016/j.vph.2015.05.005
24. Zhang, X., Zhang, C., Chen, L., Han, X., Ji, L., 2014. Human serum acylcarnitine profiles in different glucose tolerance states. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 104, 376–382.
doi:10.1016/j.diabres.2014.04.013

ĒTIKAS KOMITEJAS ATZINUMS



Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas
Attīstības biedrības
KLĪNISKĀS IZPĒTES ĒTIKAS KOMITEJA

Darbojas saskaņā ar SHK LKP noteikumiem
ATZINUMS Nr.010715-7L

1. Protokola nosaukums: Statīnu terapijas ietekme uz trimetilamīna N-oksīda un acilkarnitīnu koncentrāciju asinīs
2. Protokola numurs: n/a
3. Darba vadītājs
3.1. Asoc. prof. – Gustavs Latkovskis – VSIA „Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīca” Pilsoņu 13, Rīga, LV-1002, Latvija;
4. Izskatītie un apstiprinātie dokumenti:
 - 4.1. Akadēmiskā darba protokols;
 - 4.2. Pacientu informācijas un informētās piekrisānas veidlapa;
 - 4.3. Darba vadītāja CV.
5. Ētikas komitejas atzinums - pozitīvs
6. Ētikas komitejas locekļi, kuri piedalījās balsošanā:

Pēteris Stradiņš - kardiķirurģs	Aigars Pētersons – bērnu ķirurģs
Dainis Krieviņš – asinsvadu ķirurģs	Santa Purviņa – farmakologs
Biruta Kupča - psihiatrs	Inga Vīgante – filologs
Valdis Pīrāgs - endokrinologs	Daina Biseniece – ķīmiķe
Andrejs Ērglis – kardiologs	Pēteris Ersts - jurists
Juris Pokrotņieks - gastroenterologs	

7. Atzinuma izdošanas datums: 2015.gada 01.jūlijs

Ētikas komitejas priekšsēdētājs:



Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas Attīstības biedrība
Pilsoņu 13, Rīga, LV- 1002, Tel. +371 26380055 fakss +371 67069946; E – pasts: etikas-komiteja@stradini.lv

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Diplomdarbs „Statīnu ietekme uz acilkarnitīnu koncentrācijām asinīs” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Jānis Feldmanis _____

(vārds, uzvārds)

(paraksts)

(datums)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. Med., Prof. Gustavs Latkovskis _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Recenzents: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____

(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____

(paraksts)

Diplomdarbs aizstāvēts II līmeņa profesionālās augstākās izglītības studiju programmas „Ārstniecība” Valsts pārbaudījumu komisijas sēdē _____ 2017., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)