

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS MAĢISTRA STUDIJU PROGRAMMA

**KARNITĪNA PALMITOILTRANSFERĀZES-1 LOMA
MILDRONĀTA DARBĪBAS MEHĀNISMOS**

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Aija Homka**

Stud. apl. ad06041

Darba vadītājs: Dr. Farm. **Edgars Liepiņš**

Recenzents: Dr. Biol., doc. **Una Riekstiņa**

RĪGA 2011

1. ANOTĀCIJA

Mildronāts ir zāļu viela, kas samazina karnitīna koncentrāciju audos, kavējot karnitīna biosintēzi un samazinot tā reabsorbciju nierēs. Karnitīns piedalās garķēžu taukskābju enerģijas metabolismā. Līdz šim nebija izpētīta mildronāta izraisīto karnitīna koncentrāciju samazinājuma ietekme uz KPT-1 aktivitāti un ar to saistīto taukskābju enerģijas metabolismu. Žurkām tika ilgstoši ievadīts mildronāts, kā arī karnitīna-mildronāta kombinācija un mērītas karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācijas. Noteicām KPT-1 ekspresiju, aktivitāti un ar KPT-1 saistīto garķēžu taukskābju metabolismu sirds mitohondrijos. No pētījumu rezultātiem var secināt, ka mildronāta molekulārās darbības mehānisma pamatā ir KPT-1 aktivitātes kavēšana, samazinot karnitīnu koncentrāciju sirds audos, kā rezultātā tiek kavēts taukskābju metabolisms un sasniegts kardioprotektīvais efekts.

2. ATSLĒGVĀRDI

L-karnitīns, KPT-1 – karnitīna palmitoiltransferāze, mildronāts, GBB, enerģijas metabolisms, taukskābju metabolisms.

3. ABSTRACT

Mildronate is a cardioprotective drug which is known to decrease carnitine through inhibition of biosynthesis of carnitine and its reabsorption in the kidneys. Carnitine participates in long chain fatty acid energy metabolism. Thus far the effect of decreased carnitine level by mildronate on CPT-1 activity and its dependent fatty acid metabolism was not fully clarified. This study was carried out to investigate the effects of mildronate treatment on carnitine homeostasis and fatty acid metabolism. Carnitine, GBB and mildronate concentrations, CPT-1 activity and expression, mitochondrial respiration was measured after treatment with mildronate and carnitine-mildronate combination. In conclusion, mechanism of the cardioprotective effect of mildronate is based on the decreased carnitine concentration that decreases CPT-1 activity and inhibits fatty acid metabolism.

4. SATURS

1.	ANOTĀCIJA	2
2.	ATSLĒGVĀRDI	2
3.	ABSTRACT	3
4.	SATURS.....	4
5.	IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI	6
6.	DARBA MĒRĶIS	7
7.	DARBA UZDEVUMI.....	7
8.	IEVADS	8
9.	LITERATŪRAS APSKATS	9
9.1	Karnitīna homeostāze.....	9
9.2	Karnitīna nozīme enerģijas metabolismā	11
9.3	KPT-1	11
9.4	Karnitīna deficīts	13
9.5	KPT-1 deficīts	14
9.6	Samazināta karnitīna koncentrācija zāļu lietošanas ietekmē	14
9.7	Mildronāts	15
10.	MATERIĀLI UN METODES	18
10.1	Dzīvnieki.....	18
10.2	Reaģenti	18
10.3	Izmantotā aparatūra.....	18
10.4	Šķīdumu un paraugu pagatavošana.....	19
10.5	Audu homogenātu iegūšana	19
10.6	Karnitīna, GBB un mildronāta noteikšana.....	20
10.7	Mitohondriju izolēšana	20
10.8	Sirds mitohondriju membrānu izdalīšana	20
10.9	KPT-1 aktivitātes noteikšana	21
10.10	Mitohondriju elpošana	21
10.11	RT-PĶR metode (mRNS izolēšana)	21
10.12	kDNS sintēze	22
10.13	Datu apstrāde	22
11.	REZULTĀTI	23
11.1	Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija	23
11.2	KPT-1 aktivitāte.....	25

11.3 Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija žurku plazmā un audos	25
11.4 KPT-1 aktivitāte	27
11.5 Mitohondriju elpošana	27
11.6 KPT-1A un KPT-1B ekspresija	29
12. DISKUSIJA	31
13. SECINĀJUMI	35
14. PATEICĪBAS	36
15. IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI	37
16. DOKUMENTĀRĀ LAPA	46

5. IZMANTOTIE SAĪSINĀJUMI

Acil-K	Acilkarnitīns
Acil-KoA	Acil-koenzīms A
ATF	Adenozīna trifosfāts
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoscābe)
DTT	Ditiotreitols
EDTA	Etilēndiamīna tetraacetāts
FAT/CD36	taukskābju translokāze
GBB	Gamma butirotetaīns
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazīnetānsulfoskābe
HIV	Cilvēka imūndeficīta vīruss
KAKT	Karnitīna-acilkarnitīna translokāze
karnitīns	L-karnitīns, β -hidroksi- γ -trimetilamonija butirāts
KAT	Karnitīna acetiltransferāze
kDNS	Komplementārā dezoksiribonukleīnskābe
KoA	Koenzīms A
KPT-1	Karnitīna palmitoiltransferāze-1
KPT-1A	Aknu karnitīna palmitoiltransferāzes-1 izoforma
KPT-1B	Skeleta muskuļu palmitoiltransferāzes-1 izoforma
KPT-1C	Smadzeņu palmitoiltransferāzes-1 izoforma
KPT-2	Karnitīna palmitoiltransferāzes-2
KTP	Karnitīna transporta proteīns
mRNS	matrices jeb informācijas ribonukleīnskābe
OKTP2	organisko katjonu/karnitīna transportproteīns 2
PBS	Fosfātu buferšķīdums
PDH	Piruvātdehidrogenāze
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluorīds
RNS	ribonukleīnskābe
RT-PKĀR	reālā laika reversās transkripcijas polimerāžu ķēžu reakcija
SEM	vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda
SLC22A5	OKTP2 proteīnu kodējošais gēns
UPLC/MS/MS	augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija ar sekojošu tandēm-masspektrometriju

6. DARBA MĒRĶIS

Noskaidrot mildronāta, karnitīna un karnitīna-mildronāta kombinācijas ietekmi uz karnitīna koncentrāciju sirds audos un izpētīt karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekmi uz taukskābju metabolismā iesaistīto enzīmu karnitīna palmitoiltransferāzes 1 (KPT-1) ekspresiju un aktivitāti.

7. DARBA UZDEVUMI

1. Apkopot zinātnisko literatūru par karnitīna uzņemšanu, transportu organismā, biosintēzi, karnitīna lomu šūnu enerģijas metabolisma norisēs un taukskābju metabolismā, kā arī par farmakoloģiskajiem efektiem, kas saistīti ar samazinātu karnitīna daudzumu organismā.

2. Izpētīt dažādu mildronāta devu, kā arī karnitīna un mildronāta kombinācijas ilgstošas ievadīšanas ietekmi uz GBB un karnitīna daudzumu sirds audos.

3. Izpētīt dažādu mildronāta devu, kā arī karnitīna un mildronāta kombinācijas ilgstošas ievadīšanas ietekmi uz KPT-1 aktivitāti sirds audos.

4. Izpētīt karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas ievadīšanas ietekmi uz KPT-1 ekspresiju sirds audos.

5. Izpētīt karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efektu uz skābekļa patēriņu mitohondriju elpošanas eksperimentā.

Maģistra darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā.

8. IEVADS

Sirds un asinsvadu sistēmas saslimšanas ir izplatītākais nāves cēlonis ne tikai Latvijā, bet arī Eiropā. Novērojama tendence, ka mirstība no sirds un asinsvadu sistēmas slimībām ir lielāka Austrumeiropas un Viduseiropas valstīs, bet mazāka Rietumeiropas un Ziemeļeiropas valstīs (1). Tādējādi pētījumi, kā uzlabot dzīvildzi un dzīves kvalitāti, profilaktiski novēršot vai ārstējot kardiovaskulārās saslimšanas, joprojām ir aktuāli un nozīmīgi mūsdienu sabiedrībā.

Muskuļu šūnas enerģijas iegūšanai izmanto gan ogļhidrātus, gan taukskābes. Pēc to uzņemšanas šūnās notiek specifiski katabolisma procesi, kuros veidojas šūnu enerģijas avots – adenozīna trifosfāts. Normālos apstākļos enerģiju iegūst galvenokārt taukskābju oksidācijas rezultātā. Tomēr skābekļa trūkuma gadījumā šūnai izdevīgāka ir glikozes oksidēšana nekā taukskābju izmantošana, jo šim procesam nepieciešams mazāks skābekļa daudzums (2, 3). Karnitīns ir viens no vairākiem faktoriem, kas palīdz pārvietot garo ķēžu taukskābes mitohondrijos sirds un skeleta muskulatūrā, lai varētu sekot β -oksidācija, kas ir svarīgs enerģijas avots sirds un muskuļu šūnām (4, 5).

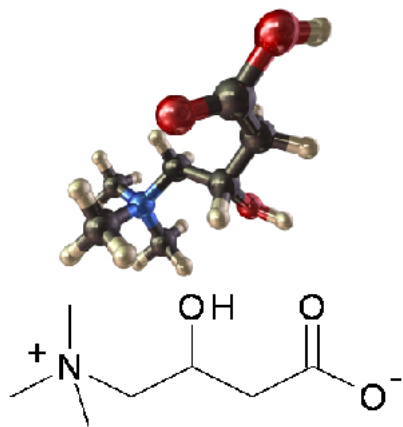
Eksperimenti liecina, ka karnitīna koncentrācijas izmaiņām audos varētu būt divējāds efekts. Nedaudz samazinot karnitīna koncentrāciju sirdī, tās šūnas vieglāk adaptējas išēmijas apstākļiem un pārejošam skābekļa badam (6), kamēr ievērojama karnitīna koncentrācijas samazināšanās varētu izsaukt muskuļu distrofiju (7). Tāpēc ļoti nozīmīgi būtu noskaidrot karnitīna regulācijas farmakoloģiskās un fizioloģiskās sekas, lai labāk izprastu tās izmantošanas iespējas klīnikā sirds-asinsvadu saslimšanu ārstēšanā. Karnitīns tiek uzņemts ar pārtikas produktiem, kā arī tiek sintezēts no lizīna un metionīna aknās, nierēs un sēkliniekos. Fizioloģiskais karnitīna daudzums dažādos audos tiek uzturēts pateicoties kompleksai transporta sistēmai (8, 9). Nepietiekams karnitīna transporteru daudzums izraisa primāro karnitīna deficītu, kas raksturojas ar izmainītu lipīdu uzglabāšanu un muskuļu disfunkciju (10, 11).

Līdz šim nebija izpētīta no devas atkarīga mildronāta ilgstošas ievadīšanas ietekme uz karnitīna homeostāzi un karnitīna palmitoiltransferāze-1 (KPT-1) aktivitāti. Bez tam ļoti nozīmīgi būtu noskaidrot karnitīna regulācijas farmakoloģiskās un fizioloģiskās sekas, lai labāk izprastu tās izmantošanas iespējas klīnikā sirds-asinsvadu saslimšanu ārstēšanā. Maģistra darba pētījumos vēlējāmies noskaidrot vai mildronāta kardioprotektīvā efekta molekulārās darbības mehānisms pamatojas uz karnitīna koncentrācijas samazināšanu un taukskābju metabolisma kavēšanu.

9. LITERATŪRAS APSKATS

9.1 Karnitīna homeostāze

L-karnitīns (β -hidroksi- γ -trimetilamonija butirāts) (tālāk tekstā – karnitīns) pirmo reizi tika izdalīts no muskuļaudu ekstraktiem 1905. gadā, ko paveica latviešu fiziologs un bioķīmiķis profesors Roberts Krimbergs (1874 – 1941). R. Krimbergs karnitīnu izolēja no liellopu gaļas ekstrakta un noskaidroja tā molekulformulu, veica pētījumus par muskuļaudu



9.1.att. L-karnitīns

ekstraktvielu ietekmi uz gremošanas, sirds un asinsvadu sistēmām. Karnitīna nosaukums atvasināts no vārda *carne* (lat. miesa, gaļa), tā norādot uz tā izdalīšanas avotu. 20 gadus vēlāk tika noteikta karnitīna ķīmiskā struktūra. Bioloģiskā aktivitāte piemīt dabā sastopamajam L-karnitīnam, bet otrs optiskais izomērs, D-karnitīns, darbojas pretēji un organismā bloķē L-karnitīna efektus (12).

Karnitīna homeostāze organismā tiek nodrošināta, pateicoties tā absorbcijai no pārtikas, biosintēzei, kā arī intensīvai reabsorbcijai no glomerulu filtrāta nieru proksimālajos kanāliņos (9, 13). Papildus tam normālos apstākļos organisms nodrošina augsti regulētu karnitīna aktīvā transporta sistēmu, kurai pateicoties, karnitīna koncentrācija muskuļu audos (tajā skaitā – sirds audos) ir vairākus desmitus reižu lielāka nekā asinīs (9). No pārtikas karnitīns organismā tiek galvenokārt uzņemts ar gaļas un piena produktiem.

Endogēnās biosintēzes rezultātā, cilvēka organismā dienā veidojas 1 – 2 μ mol karnitīna uz 1 kg ķermeņa masas (13) jeb 23 – 135 mg karnitīna, rēķinot uz vidēju pieaugušu cilvēku (14). Biosintēze pamatā notiek aknās, nierēs un vīriešiem arī sēkliniekos, kur kā starpprodukts veidojas γ -butirotetaīns (GBB) (4). Lai arī karnitīna biosintēzes pirmais tiešais metabolīts ir trimetillizīns, karnitīna biosintēze notiek no aminoskābēm metionīna un lizīna.

Neveģetāras diētas gadījumā apmēram 25% no nepieciešamā karnitīna daudzuma organismā tiek sintezēti, bet 75% cilvēks uzņem ar pārtiku. No pārtikā lietojamiem produktiem visvairāk karnitīnu satur liesa liellopu gaļa un cūkgaļa.

9.1.Tabula. Karnitīna saturs pārtikas produktos (15, 16, 17)

Pārtikas produkts	Karnitīns mg/100g
Aitas gaļa	210
Liellopu gaļa	50-143
Cūkgaļa	17-28
Avokado	8.1
Menca	3.5-6.2
Vistas gaļa	3.5-21
Saldējums	2.65
Govs piens	2-2.9
Sviests	1.3
Olas	0.3-0.8
Baltmaize	0.2
Rīsi (vārīti)	0.0449
Apelsīnu sula	0.0019
Rieksti	0.1

Pēc orālas uzņemšanas karnitīna absorbcija notiek divējādi – pateicoties aktīvajam transportam transportproteīnu ietekmē, kā arī pasīvās difūzijas ceļā (9). Pētījumi pierādījuši, ka karnitīna absolūtā biopieejamība 1-6 g lielas orālās devas gadījumā ir tikai 5-18 %, kamēr ar pārtikas produktiem uzņemtā karnitīna biopieejamība var sasniegt pat 75 % (14). Tāpēc, ja papildus uzņem karnitīnu kā farmakoloģisku līdzekli karnitīna deficīta ārstēšanai vai kā uztura bagātinātāju, jāatceras, ka, jo vairāk karnitīna orāli uzņems, jo salīdzinoši mazāka daļa no tā uzsūksies.

Jāņem vērā arī tas, ka, papildus lietojot karnitīna racemātu (salīdzinoši vienkāršāk rūpnieciski iegūstams un lētāks L- un D-karnitīna maisījums), ne tikai netiks sasniegti iecerētie efekti, jo D-karnitīns bloķē L-karnitīna uzņemšanu organismā, bet varētu tikt novērotas tādas toksiskas blakusparādības, kā miastēnija un sirds aritmijas (18). Perorāli lietojot lielas karnitīna devas (>6 g) parādās nepatīkama ķermeņa smaka, iespējams, palielinoties trimetilamīna koncentrācijai sviedros (19).

Karnitīna ekskrecija notiek galvenokārt nierēs un nedaudz aknās, tomēr no organisma izvadītā karnitīna daudzums veseliem cilvēkiem nepārsniedz 1-5 % no izfiltrētā daudzuma, jo līdz pat 99 % karnitīna tiek reabsorbēts (20, 13). Samazinoties karnitīna saturam pārtikā, tā reabsorbcija nierēs pastiprinās, bet, uzņemot papildus karnitīnu, palielinās izfiltrētā karnitīna daudzums un atpakaļ uzsūkšanās samazinās (13).

9.2 Karnitīna nozīme enerģijas metabolismā

Enerģijas iegūšanai muskuļu šūnas izmanto gan taukskābes, gan ogļhidrātus. Pēc to uzņemšanas šūnās notiek specifiski katabolisma procesi, kuru rezultātā rodas kopīgs metabolīts – acetil-koenzīms A, kas, oksidējoties mitohondrijos noritošajā Krebsa ciklā un tālāk ar elpošanas ķēdes palīdzību, nodrošina šūnas ar enerģiju ATF veidā. Šūna enerģiju iegūst galvenokārt taukskābju oksidācijas rezultātā. Veselā sirdī normālos apstākļos 70 – 90 % taukskābju, kas iekļūst šūnās, tiek pārvērstas par acilkarnitīniem (Acil-K) un nekavējoties oksidētas, bet pārējie 10 – 30 % papildina sirds triglicerīdu krājumus (21, 22). Skābekļa trūkuma apstākļos glikozes oksidēšana šūnai ir izdevīgāka, nekā taukskābju izmantošana, jo šim procesam nepieciešams mazāks skābekļa daudzums (2, 3). Karnitīns ir viens no faktoriem, kas nosaka garo ķēžu taukskābju izmantošanas intensitāti un līdz ar to arī šo taukskābju ieguldījumu šūnu enerģētiskajā metabolismā.

Karnitīns regulē kā garo ķēžu taukskābju transportu mitohondrijos, tā arī acetil-KoA/KoA attiecību un līdz ar to piruvātdehidrogenāzes (PDH) kompleksa aktivitāti (23). Intensīvas fiziskās slodzes apstākļos PDH darbības rezultātā, oksidējot piruvātu, veidojas ļoti daudz acetil-KoA, ko nevar pietiekami efektīvi iesaistīt Krebsa ciklā. Karnitīns, darbojoties enzīmam karnitīna acetiltransferāzei (KAT), stājas KoA vietā, veidojot acetilkarnitīnu. Šādā veidā tiek nodrošināts pietiekams brīva KoA daudzums, lai netraucēti noritētu PDH kompleksa un Krebsa cikla reakcijas (23, 24). Var secināt, ka karnitīnam ir būtiska loma ne tikai garo ķēžu taukskābju oksidācijā, bet arī ogļhidrātu metabolismā. Līdz ar to karnitīna koncentrācijas izmaiņas ļauj tieši modulēt enerģijas iegūšanas procesus audos, ietekmējot taukskābju un ogļhidrātu īpatsvaru ATF sintēzes nodrošināšanā.

9.3 KPT-1

Taukskābes galvenokārt tiek katabolizētas mitohondrijos caur β -oksidācijas ceļu. Garo ķēžu taukskābes ir galvenā taukskābju frakcija, ko piegādā audiem, taču tās nespēj šķērsot mitohondriju membrānu difūzijas ceļā, salīdzinot ar īso ķēžu taukskābēm.

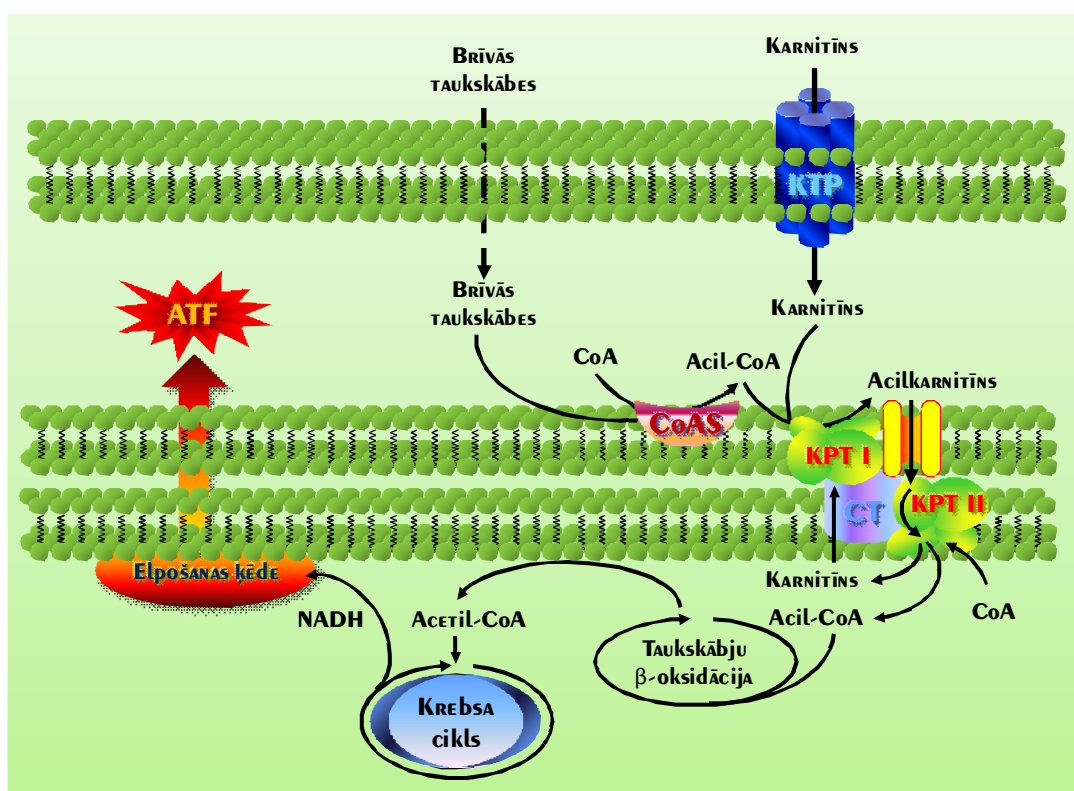
Pēc taukskābju aktivācijas, ko veic garo ķēžu taukskābju acilkoenzīma A (Acil-KoA) sintāze uz ārējās mitohondriālās membrānas, garo ķēžu taukskābes un acil-KoA komplekss, tiek ienests mitohondrija matiksā ar karnitīna palmitoiltransferāzes (KPT) sistēmas palīdzību. Šo enzimatisko kompleksu veido KPT-1 un karnitīna palmitoiltransferāze-2 (KPT-2) (25). Ir identificētas trīs KPT-1 izoformas – aknu, nieru un smadzeņu (26, 27, 28, 29).

Aknu KPT-1 izoformas (KPT-1A) pilna garuma kDNS klons tika izolēts no žurku aknas kā proteīns, kas sastāv no 773 aminoskābēm (30). Vēlāk tika konstatēts, ka KPT-1 proteīns sastāv no viena polipeptīda, kas satur gan inhibitoro, gan katalītisko domēnu. KPT-1A

primārā izoforma ir atrasta aknās, nierēs, plaušās, liesā, zarnās, aizkuņģī, olvados un smadzenēs (25, 31). Nesen tika pierādīta aknu izoformas klātbūtne kardiomiocītos proteīnu līmenī (32)

Skeleta muskuļu KPT-1 izoformas (KPT-1B) kDNS pirmo reizi tika identificēts 1995.gadā žurkās (27). KPT-1B izoforma izoforma dominē skeleta muskulatūrā, sirdī, adipozos audos un sēkliniekos (33).

Smadzeņu KPT-1 izoformas (KPT-1C) proteīni tika atklāti 2002. gadā peles un cilvēku audos (28). Proteīnu primārā struktūra sastāv no 798 aminoskābēm. KPT-1C ekspresija dominē smadzenēs, taču mazākās koncentrācijās arī sēkliniekos, olnīcās, tievajā un resnajā zarnā (28).



9.2. att. Taukskābju metabolisms

Muskuļaudi nav spējīgi sintetēt karnitīnu un uzņem to no asinsrites ar aktīvā transporta palīdzību, izmantojot citoplazmatiskajās membrānās esošos karnitīna transporta proteīnus (KTP) (9). Taukskābju katabolisma sākuma posmā brīvās taukskābes tiek aktivētas, veidojot acil-KoA acil-KoA-ligāžu ietekmē. Tālāk no karnitīna un acil-KoA, ar mitohondriju ārējās membrānas enzīma KPT-1 palīdzību tiek sintezēts atbilstošais acil-K. Pēc tam acil-K transportā iesaistās mitohondriju ārējā membrānā esošā taukskābju translokāze FAT/CD36, kas nogādā acil-K pie nākošā transporta enzīma. Karnitīna-acil-K translokāze (KAKT), kas atrodama mitohondriju iekšējā membrānā, iznes tai cauri acil-K. Nākošais enzīms KPT-2,

veic KPT-1 funkcijai pretēju reakciju, t.i., no acil-K mitohondriju iekšienē atkal izveido acil-KoA, kas tālāk β -oksidācijas reakcijās sašķeļas līdz acetil-KoA. KPT-1 gadījumā nozīmīga loma ir enzīma aktivitātes regulācijai ar malonil-koenzīma A palīdzību, jo tādējādi ietekmē ne tikai taukskābju β -oksidāciju, palielinoties vai samazinoties taukskābju transportam caur mitohondriju iekšējo membrānu, bet arī glikozes metabolisma norises (25, 22).

Lietojot ar ogļhidrātiem bagātu uzturu, palielinās malonil-koenzīma A daudzums, tāpēc tiek nomākta KPT-1 aktivitāte aknās un stimulēta liponeoģenēze. Novēršot malonil-koenzīma A inhibējošo ietekmi uz KPT-1, iespējams stimulēt *de novo* sintezēto taukskābju β -oksidāciju un samazināt šo taukskābju akumulēšanos triglicerīdu veidā, novēršot vai kavējot aknu steatozes rašanos (34).

Pētījumos atklāts, ka, lietojot ar taukiem bagātu uzturu, attīstās hiperleptīnēmija, kas savukārt samazina sirds KPT-1 jutīgumu pret malonil-koenzīmu A, stimulējot sirds enerģijas metabolismu; turklāt šāda ietekme ir gan hroniskai, gan akūtai hiperleptīnēmijai (35). Taukiem bagāts uzturs izraisa insulīna rezistenci, taču ir izpētīts, ka, stimulējot no KPT-1 atkarīgo garo virkņu acil-KoA transportu mitohondrijos, iespējams novērst lipīdu izraisīto insulīna rezistences attīstību muskuļu audos (36).

KPT-1 reakcija ir viens no garo ķēžu taukskābju oksidācijas ātrumu noteicošajiem posmiem, jo, samazinoties karnitīna koncentrācijai, palēninās arī garo ķēžu taukskābju transports mitohondrijos un to tālākā oksidācija. Turpretim īso ķēžu taukskābes ($C_1 - C_8$) cauri mitohondriju membrānām difundē pašas, bez karnitīna palīdzības (Acil-KoA veidā).

9.4 Karnitīna deficīts

Karnitīna deficītu var iedalīt primārajā un sekundārajā deficītā; savukārt sekundārā deficīta gadījumā izšķir ģenētisko un iegūto karnitīna deficītu. Gan primārais, gan sekundārais ģenētiskais karnitīna deficīts tiek pārmantots autosomāli recesīvā veidā.

Primārais karnitīna deficīts ir reti sastopama autosomāli recesīva slimība, kuru izraisa organiskā katjona transportproteīna 2 (OKTP2) trūkums organismā, kas izmaina taukskābju oksidāciju. To izraisa mutācijas OKTP2 kodējošajā gēnā SLC22A5 (37, 38, 11). OKTP2 deficīts ir reta bioķīmiska slimība, kuras klīniskā aina raksturojas ar samazinātu karnitīna daudzumu muskuļos un asinīs (39). ASV un Eiropā slimība nav izplatīta, taču Japānā tā sastopama 1/40 000 jaundzimušajiem (38). Slimība raksturojas ar progresējošu kardiomiopātiju, muskuļu vājumu un pēkšņu hipoglikēmiju, hepatomegāliju ar Reja slimības līdzīgiem sindromiem, kas var novest pie neatgriezeniskiem smadzeņu bojājumiem. Karnitīna koncentrācija audos var būt pat līdz 10 % no normas samazināta, savukārt plazmā tā līmenis var būt zem noteikšanas robežas (40, 41, 42). Lai gan vairumā gadījumu taukskābju

oksidācijas traucējumi ietekmē sirds un skeleta muskuļus un aknas, sirds mazspēja ir viena no biežākajām karnitīna transportproteīna deficīta izpausmēm.

Prognozes, ārstējot pacientus ar karnitīna terapiju, ir labas, taču bez specifiskas ārstēšanas, sirds mazspēja var strauji progresēt un izraisīt nāvi. Karnitīna deva svārstās no 110 līdz 600 mg/kg dienā. Nepieciešamā deva tiek aprēķināta balstoties uz karnitīna nepieciešamību muskuļiem, aknām, sirdij un nierēm. Lai individuāli piemērotu devu, ir nepieciešami plazmas līmeņa mērījumi. Nav ziņots par karnitīna lietošanas blakus efektiem, izņemot neregulāra caureja vai ķermeņa aromāts, kas smaržo pēc zivīm. Dažos gadījumos iesaka arī vidēja garuma triglicerīdu diētu (43).

Sekundārā karnitīna deficīta gadījumā ir samazināts taukskābju oksidācijai nepieciešamais enzīmu daudzums. Karnitīna daudzumu var samazināt malabsorbcija, nepietiekama tā uzņemšana ar uzturu, hemodialīze, acil-K pārmērīga izvadīšana un atsevišķu medikamentu lietošana.

9.5 KPT-1 deficīts

KPT-1 deficīta gadījumā ir zināms tikai KPT-1A (aknu izoformas) deficīts ar 30 zināmām mutācijām (44). KPT-1 deficīts parasti ir saistīts ar karnitīna koncentrācijas palielināšanos plazmā (45, 29) un hipoglikēmiju, paaugstinātu aknu funkcionālo marķieru koncentrāciju un palielinātu brīvo taukskābju līmeni (11). Bērniem no dzimšanas līdz 18 mēnešu vecumam parasti novēro hepatomegāliju un izmainītu mentālo stāvokli. Lai gan bieži saslimšana norit bez simptomiem vai ar viegliem simptomiem, atsevišķos gadījumos ir reģistrēti arī nāves gadījumi, it sevišķi jaundzimušo vidū (46). KPT-1 deficītu diagnosticē, izvērtējot paaugstināto daudzumu ar brīvo un īso ķēžu acil-K, kā arī zemo garo ķēžu acil-K koncentrāciju. Diagnozi apstiprina ar KPT-1 līmeņa noteikšanu fibroblastos, kas parasti ir samazināts par 5-20% no normas.

Terapijai iesaka izvairīties no badošanās, kā arī iesakot diētu ar zemu tauku līmeni, kas satur vidēja garuma triglicerīdus, kuriem nav nepieciešams karnitīns, lai iesaistītos β -oksidācijā aknu mitohondrijos.

9.6 Samazināta karnitīna koncentrācija zāļu lietošanas ietekmē

Samazināts karnitīna daudzums un mitohondriju disfunkcija ir novērota ar HIV inficētiem pacientiem, kas saņem terapijā zidovudīnu, didanozīnu, zalcitabīnu vai stavudīnu (47, 48, 49, 50, 51). Šiem pacientiem novēro arī muskuļu miopātiju, nogurumu, palielinātu seruma kreatīna fosfokināzes līmeni (47, 48). Iespējamie miopātijas iemesli varētu būt

samazinātais karnitīna daudzums, mazākas karnitīna uzņemšanas dēļ. Lai gan iemesls, kāpēc ir samazināts muskuļu karnitīna līmenis nav zināms, daži autori pieņem, ka samazinātā enerģija muskuļu šūnās liek ieslēgt glikolīzes ceļu, kas rezultējas palielinātā laktāta un acetilkoenzīma-A daudzumā. Tas varētu esterificēt brīvo karnitīnu, kas tiktu ekskretēts caur nierēm (48). Cita hipotēze ir, ka mitohondriju disfunkciju (aknu steatoze, miopātija), izraisa nukleozīdu analogu reversās transkriptāzes inhibitoru terapija, kas var samazināt enerģijas atkarīgo karnitīna uzņemšanu audos, un tā rezultātā rodas karnitīna deficīts (52, 48).

Karnitīna deficīts izraisa gastrointestinālo dismotilitāti, ko pavada vemšana, aizkavēta zarnu iztukšošanās un aizcietējumi, kā arī citi simptomi, piemēram, muskuļu vājums, hipotonija, kardiomiopātija, encefalopātija (53). Karnitīna līmeni samazina epilepsijas lēkmju ārstēšanā lietotie medikamenti (54, 55, 56). Bez tam samazinātu karnitīna līmeni serumā var izraisīt tādas zāles, kā fenitoīns, karbamazepīns, fenobarbitāls (57, 58, 59, 60) (pivampicilīns, pivmecilamīns, pivcefaleksīns), un kas var izraisīt karnitīna deficītu (16, 61). Divi ķīmijterapijā lietoti medikamenti, ifosfamīds un cisplatīns, var palielināt karnitīna deficīta risku.

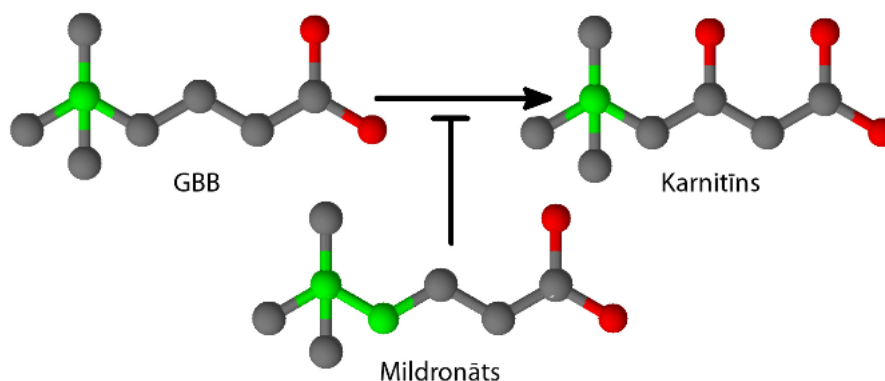
9.7 Mildronāts

Ar karnitīnu saistītās sistēmas farmakoloģiska regulācija un attiecīgi arī sirds enerģijas metabolisma regulācija vairumā gadījumu ir vērsta uz glikozes metabolisma veicināšanu un taukskābju metabolisma kavēšanu. Mildronāta darbības mehānismi saistīti galvenokārt ar ietekmi uz karnitīna koncentrāciju audos un līdz ar to, samazinot taukskābju metabolismu (62, 63). Jāatzīmē, ka mildronāts žurku audu mitohondrijos tieši neinhibē KPT-1, bet gan ietekmē enzīma aktivitāti netieši, jo samazina tā substrāta – karnitīna koncentrāciju. Tādējādi tiek kavēta KPT-1 atkarīgā taukskābju oksidācija, jo tiek samazināts mitohondrijos ieejošo garķēžu taukskābju daudzums (62, 64).

Daudzi pētījumi neapšaubāmi pierāda, ka mildronāts tiešām samazina gan kopējo, gan brīvo karnitīna daudzumu audos, gan eksperimentos ar žurkām (65, 66, 67, 64, 68). Ir parādīts, ka mildronāts samazina karnitīna koncentrāciju arī dzīvnieku asins plazmā (63). Karnitīna samazinājums tiek panākts gan kavējot karnitīna sintēzi no GBB (62) (9.3. attēls), gan kavējot karnitīna reabsorbciju nierēs (65, 67).

Interesanti, lai gan mildronāts ievērojami samazina karnitīna koncentrāciju asinīs un audos, tomēr lielākajā daļā pētījumu tam ir parādītas protektīvas, nevis toksiskas īpašības. Mildronāts pieder pie sirds enerģētiskā metabolisma regulējošajiem medikamentiem. Mildronāts ar dažādiem mehānismiem spēj regulēt karnitīna daudzumu šūnās, tādējādi arī garķēžu taukskābju oksidācijas ātrumu, kam ir nozīmīga loma enerģētiskā metabolisma

regulācijai skābekļa trūkuma apstākļos. Vairākos klīniskajos pētījumos ir pierādīts mildronāta pozitīvais efekts uz sirds un asinsvadu sistēmu, gan išēmisko saslimšanu ārstēšanā, gan arī kā fizisko un garīgo darbību uzlabotājs (69, 70, 71, 72, 73). Daudzajos preklīniskajos pētījumos ir pierādīts mildronāta kardioprotektīvais efekts izolētā žurkas sirds modelī in vitro un in vivo (74, 66, 75, 76). Mildronāts palielina arī glikozes oksidācijas ātrumu un terapijā kopā ar insulīnu, uzlabo žurkām sirds funkciju hipoksijas laikā (74; 77). Nesen tika parādīts, ka mildronāta ievadīšana 100 mg/kg dienā 4 mēnešus būtiski samazina aterosklerotisko plāksniņu veidošanos aortā ApoE^{-/-} un LDLR^{-/-} pelēs (78), kā arī 200 mg/kg 8 nedēļas samazina asins glikozes koncentrāciju un ar diabētu saistītās komplikācijas 2. tipa diabēta G-K žurkās (79).



9.3. att. Mildronāta ietekme uz karnitīna sintēzi

Paralēli pētījumiem par mildronāta ietekmi uz karnitīna koncentrāciju un uz taukskābju metabolismu, ir pētīts arī mildronāta efekts uz alternatīvā enerģijas iegūšanas ceļa – glikozes oksidācijas posmiem. Ir atrasts, ka mildronāts paaugstina glikozes transportu, kā arī oksidācijas ātrumu žurku un peļu izolētās sirdīs (74, 77). Jādomā, ka tas varētu būt viens no kavētas taukskābju oksidācijas kompensatorajiem mehānismiem. Otrs mehānisms ir nesenos pētījumos parādītais fakts, ka karnitīna koncentrācijas samazināšana ar mildronātu izraisa KPT-1 ekspresijas palielināšanos gan sirdī, gan aknās (80, 81, 77). Atrasta arī palielināta KPT-1 aktivitāte, pieliekot papildus karnitīnu (80, 81).

Mildronāts primāri ir pazīstams kā kardioprotektīva zāļu viela, kura darbības pamatā ir karnitīna koncentrācijas samazināšana, kā arī enerģijas metabolisma regulēšana (6). Pēdējos 10 gados notikuši vairāki pētījumi, siastībā ar mildronāta efektiem dažādos sirds infarkta un sirds mazspējas modeļos (65, 75, 76, 78). Pētījumos ir parādīts, ka ilgstoša mildronāta ievadīšana optimizē enerģijas metabolismu. Ir parādīts arī nozīmīgs infarkta lieluma samazinājums izolētā sirds modelī gan in vitro (75), gan in vivo (76). Turklāt mildronāts, kā

kardioprotektīvs aģents darbojās arī diabēta Goto-Kakizaki (G-K) žurkās, kur vienlaikus ar glikozes pazeminošiem efektiem, tika novērots infarkta samazinājums par 30% pie devām 100 un 200 mg/kg (78). Tātad mildronāta terapija efektīvi samazina miokarda infarkta lielumu diabēta G-K žurkām un Wistar līnijas žurkām.

Mildronāta terapijai nav nozīmīga efekta uz hemodinamiskajiem parametriem išēmijas-reperfūzijas laikā, kas norāda uz to, ka novērotie efekti uz infarkta lielumu nav saistīti ar sirds darba slodzi. Tātad mildronāts primāri darbojas kā metabolisma regulators.

Pēdējos gados tiek runāts arī par mildronāta pozitīvo ietekmi uz diabētu. Iespējamais pretidiabēta efekts Wistar līnijas žurkām var tikt sasniegts pie devas, kas ir vismaz 800 mg/kg (80), savukārt G-K līnijas žurkās, kuras izmantotas kā 2.tipa diabēta modelis, pēc 8 nedēļu ilgas mildronāta terapijas, nekrozes zona bija samazinājusies par 30% (79). Kopumā, šie atklājumi norāda, ka mildronāta lietošana diabēta pacientiem ar kardiovaskulārām saslimšanām, var dot pozīvu ieguvumu. To apstiprina arī jauns pētījums, kurā žurkām ar streptozotocīnu inducētu diabetes mellitus, ilgstoša mildronāta ievadīšana samazināja vidējo glikozes līmeni asinīs un glikolizētā hemoglobīna koncentrāciju (82).

Nesenā pētījumā tika salīdzināts mildronāta un metformīna terapijas efekts Zucker žurkās ar palielinātu ķermeņa svaru (83). Šajā pētījumā, mildronāta terapija, tādā pašā mērā kā metformīna ievadīšana, nozīmīgi samazināja glikozes līmeni asinīs tukšā dūšā un pēc ēšanas Zucker žurku modelī. Jāatzīmē, ka mildronāta un metformīna kombinēta ievadīšana izraisīja sinerģiskus efektus, proti, samazinājās insulīna koncentrācija un orālais glikozes tolerances uzrādīja pārliecinošus rezultātus. Turklāt metformīna un mildronāta kombinēta ievadīšana palielināja aknās glikogēna daudzumu, uzlabojot aknu insulīna jutību. Šie rezultāti var tikt izskaidroti ar glikozes metabolismā iesaistīto gēnu palielināto ekspresiju. Palielinātais Zucker žurku svars monoterapijā ar mildronātu un metformīnu ievērojami nemainījās, taču kombinētā metformīna un mildronāta terapija, samazināja palielināto svaru, it īpaši taukaudu īpatsvaru, par 47%. Tātad kombinētai mildronāta un metformīna terapijai varētu būt potenciāls terapeitisks efekts pacientiem ar 2.tipa diabētu un palielinātu ķermeņa svaru. Jāatzīmē, ka viens no metformīna labi zināmiem blakusefektiem ir paaugstināts laktāta līmenis. Šajā pētījumā, mildronāta monoterapija vai kombinētā terapija ar metformīnu, samazināja laktāta koncentrāciju asins plazmā Zucker žurkam ar palielinātu ķermeņa masu, tādējādi mildronāta ievadīšana varētu samazināt metformīna izraisīto laktāta acidozi.

10. MATERIĀLI UN METODEDES

10.1 Dzīvnieki

Eksperimentā izmantotas Wistar līnijas žurkas, ar svaru 200 – 240 g, kas tika iegādātas no Eksperimentālās dzīvnieku laboratorijas, Rīgas Stradiņa universitāte. Dzīvnieki turēti standarta apstākļos (21-23°C, 12 stundu gaismas - tumsas cikls) ar neierobežotu barības (R3 diēta, Lactamin AB, Zviedrija) un ūdens daudzumu. Eksperimenti notika saskaņā ar Eiropas Savienības vadlīnijām, kā arī saskaņoti ar Latvijas dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi un Pārtikas un veterināro dienestu.

Dzīvnieki tika sadalīti 4 eksperimentālās grupās, saņemot mildronātu 100 mg/kg, karnitīnu 100 mg/kg, karnitīna un mildronāta kombināciju 100 mg/kg vai ūdeni (kontrolē). Žurku sirds tika izņemta, skalota aukstā fosfāta buferšķīdumā, daļa sirds tika sasaldēta šķidrā slāpekļī un uzglabāta sasaldētas -80°C, līdz analizēšanas brīdim ar RT-Polimerāzes ķēdes reakcijas metodi. Pārējā sirds daļa izmantota mitohondriju izolēšanas eksperimentos.

Otrajā eksperimentā, dzīvnieki tika sadalīti 4 eksperimentālās grupās, saņemot mildronāta devu 100 (M100), 200 (M200), 400 (M400) mg/kg vai ūdeni (kontrolē). Astoņas žurkas no katras grupas tika ārstētas 4 līdz 8 nedēļas, savukārt 10 žurkas tika ārstētas 12 nedēļas. Asins paraugi tika ņemti no žurkas astes vēnas mikrocaurulītēs ar heparīnu pēc 4, 8 un 12 ārstēšanas nedēļām.

10.2 Reaģenti

Mildronāts (3-(2,2,2-trimetilhidrazīna) propionāts) tika iegūts no A/S Grindeks (Rīga, Latvija). Adenozīna difosfāts (ADF), etilēndiamīna tetraacetāts (EDTA), TRI reaģents tika iegādāts no Sigma (ASV). Malāts, piruvāts, kālija dihidrogēnfosfāts (KH₂PO₄), saharoze, magnija hlorīds (MgCl₂), kālija hlorīds (KCl), Tris HCl, etilēnglikoltetra etiķskābe (EGTA), hloroforms, izopropilspirts tika iegādāts no Acros Organics (Beļģija). Reaģenti RevertAid H Minus First Strand kDNS vienas virknes sintēzei tika iegādāti no Fermentas. Praimeri tika iegādāti no Metabion International AG. RT² qPCR Master Mix tika iegādāts no Super Array.

10.3 Izmantotā aparatūra

Mi-730 Oxygen Electrode (Microelectrodes INC, ASV), datu apstrāde izmantota programma Lab Chart Pro 6. (AdInstruments, Austrālija). Homogenizētājs IKA T10 Basic Ultra-Turrax (IKA, Vācija). Centrifugēšana tika veikta ar Biofuge Stratos 75005289R centrifūgu (Heraeus, Lielbritānija). Šūnu istabā paraugu samaisīšana tika veikta ar Biosan Multi spin MSC-6000, temperatūras vide kontrolēta ar Biosan CH-100 termostatu.

Polimerāzes ķēdes reakciju veic Applied Biosystems Prism 7500 Real Time PCR System iekārtā.

Reaģenti tika šķīdināti ar Genius 3 (IKA) vorteksa palīdzību. UPLC analīzes tika veiktas, izmantojot Waters Acquity UPLC sistēmu. MS/MS analīzes tika veiktas izmantojot Micromass Quatro MicroTM tandēma mass-spektrometru. Paraugu samaisīšanai 96 lauciņu platītē, tika izmantots Biosan termokratītājs PST-60HL-4.

10.4 Šķīdumu un paraugu pagatavošana

• *Homogenizācijas bufera pagatavošana (250 ml 100mM Tris, 10mM EDTA, 5mM MgCl₂, 5 mM DTT (ditiotretols), 0,1 mM PMSF, 1:1000 Mix, 1:500 Pepst.A, 1mM NaF)*

Nosver 3,0275 g Tris, 10,5 mg NaF, 0,193 g DTT. Nomēra un pievieno 25 ml 100 mM EDTA, 1,042 ml 1,2 M MgCl₂, 250 µl 100 mM PMSF, 250 µl Mix (leupeptīns 1 mM, aprotinīns 10 mg/ml), 500µl 1 mg/ml pepstatīna A metilspirtā, uzpilda ar attīrītu ūdeni līdz 250 ml.

• *Saharozes buferšķīdums*

Pagatavo saharozes buferšķīdumu ar pH 7.4 no 0.25 M saharozes, 1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl un 0.1 % etanola.

• *Karnitīna palmitoiltransferāzes-1 aktivitātes noteikšanas šķīdums*

Pagatavo 50 µl buferšķīduma no 0.675 mM DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoscābe)), 125 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazīnētānsulfonskābe), 2.5 mM EDTA (etilēndiaminatetraacetāts), 25 µl attīrīta ūdens un 50 µl palmitoilkoenzīma-A.

• *Mitohondriju izolēšanas buferšķīdums*

Pagatavo mitohondriju izolēšanas buferšķīdumu 4°C ar pH 7.7, kas sastāv no 180 mM KCl, 10 mM Tris HCl un 1 mM EGTA.

• *Mitohondriju resuspendēšanas buferšķīdums*

Pagatavo mitohondriju resuspendēšanas buferšķīdumu 4°C ar pH 7.35, kas sastāv no 180 mM KCl un 20 mM Tris HCl.

• *Mitohondriju elpošanas buferšķīdums*

Pagatavo mitohondriju elpošanas buferšķīdumu 37°C ar pH 7.2, kas sastāv no 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl un 5 mM KH₂PO₄.

10.5 Audu homogenātu iegūšana

Sirds audi tika homogenizēti ar Cole Parmer 130 vatu ultraskaņas ierīci 15 sekundes pie 40 kHz, maisījumā ar Milli-Q aparāta ledusaukstu ūdeni, attiecībā 1:10. Homogenātu

centrifugēja 10 minūtes 4°C pie apgriezieniem 15000xg. Supernatanta šķīdums tika savākts un izmantots tālākiem karnitīna, GBB un mildronāta, kā arī KPT-1 aktivitātes mērījumiem.

10.6 Karnitīna, GBB un mildronāta noteikšana

Lai noskaidrotu mildronāta ilgstošas ievadīšanas ietekmi uz karnitīna, GBB un mildronāta koncentrāciju izmaiņām sirds audos un asins plazmā, izmantoja UPLC/MS/MS metodi, kā iekšējo standartu izmantojot 3-(2,2-dimeil-2-prop-1-il-hidrazīnija)propionātu. Proteīnu izgulsnēšanai no analizējamā parauga (asins plazma un sirds audi) tika izmantots metanola/acetonitrila maisījums. Iegūtos 50-200 µl smadzeņu ekstrakta samaisīja ar 1.0 ml iekšējās standartvielas šķīdumu acetonitrila/metanola šķīdumā (3:1, vol/vol). Iegūtais šķīdums tika centrifugēts 20 minūtes pie 10000xg. Supernatantu tālāk izmantoja UPLC/MS/MS analīzēm. UPLC analīzes tika veiktas, izmantojot Waters Acquity UPLC sistēmu, kolonas - Waters Acquity HILIC BEH 1.7 µm 2.1x100 mm, injekcijas tilpums 5 µl, eluēja ar 10 mM amonija acetātā šķīdumu (pH 4), plūsma 0.2 ml/min. MS/MS analīzes tika veiktas izmantojot Micromass Quatro MicroTM tandēma mass-spektrometru. Datu apstrādei tika izmantota QuanLynx software (Waters) programmatūra. Karnitīna, GBB un mildronāta daudzuma noteikšana tika veikta sadarbībā ar Dr. chem. O. Pugoviču un Dr. chem. S. Grīnbergu.

10.7 Mitohondriju izolēšana

Sirds paraugu skalo aukstā 0.9% KCl šķīdumā, sagriež ar šķērēm mazos gabaliņos, resuspendē mitohondriju izolēšanas buferšķīdumā. Šķīdumu homogenizē attiecībā 1:9 (1 daļa audu un 9 daļas buferšķīduma) ar teflonstikla homogenizētāju, to iepriekš atdzesējot. Homogenātu centrifugē 750xg 5 minūtes 4°C, supernatantu pārnes jaunā ependorfā. Savākto supernatantu centrifugē 6800xg 10 minūtes 4°C. Nogulsnes, kurās atrodas mitohondriji, pēc centrifugēšanas resuspendē 500 µl mitohondriju resuspendēšanas buferšķīdumā. Nomēra mitohondriju proteīna koncentrāciju pēc Lowry metodes.

10.8 Sirds mitohondriju membrānu izdalīšana

Žurku sirds paraugu homogenizē attiecībā 1:10 ar saharozes buferšķīdumu. Homogenizēšanu veic ar Turrax homogenizētāju 2-3 minūtes. Homogenātu centrifugē 10 minūtes 4°C 600xg. Supernatantu pārnes jaunā ependorfā un centrifugē 10 minūtes 4°C 600xg. Supernatantu pārnes jaunā ependorfā un centrifugē 10 minūtes 4°C 3670xg. Nogulsnes resuspendē 1 ml saharozes buferšķīdumā un centrifugē 10 minūtes 4°C 3670xg. Lai iegūtu mitohondriju membrānas, nogulsnes resuspendē 1 ml 10 mM KH₂PO₄ šķīdumā ar pH 7.0 un

sasaldē -20°C. Pēc 1 stundas paraugus atkausē un centrifugē 20 minūtes 4°C 28 000xg. Nogulsnes resuspendē 300 µl saharozes buferšķīdumā.

10.9 KPT-1 aktivitātes noteikšana

KPT-1 aktivitāte sirds mitohondriju membrānās tika noteikta, mērot absorbciju pie viļņa garuma – 412 nm. Atbrīvotā KoA daudzums tika noteikts, izmantojot tiola reaģentu DTNB. Eksperimenta nosacījumi bija 0.675 mM DTNB, 125 mM HEPES, 2.5 mM EDTA, mitohondriju membrānas ar proteīnu koncentrāciju 1 mg/ml, un 50 µM palmitoil-KoA ar kopējo reaģentu tilpumu 200 µl. Karnitīna koncentrācija ir atkarīga no eksperimenta grupas, proti, kontroles – 700 µM, mildronāta – 200 µM, karnitīna – 900 µM, karnitīna un mildronāta – 600 µM.

10.10 Mitohondriju elpošana

Elpošanas mērījumi tika veikti 1 ml elpošanas buferšķīdumā, 37°C temperatūrā. Ar katru paraugu veic 3 eksperimentus, ievadot mitohondriju elpošanas sistēmā attiecīgos substrātus.

1. Eksperimentā – KPT-1, kā substrātu izmanto 40 µM palmitoil-KoA un attiecīgo karnitīna daudzumu (kontrolē 700 µM, mildronāts 200 µM, karnitīns 900 µM, karnitīns un mildronāts 600 µM).

2. Eksperiments – KAKT, kā substrātu izmanto 36 µM palmitoil-karnitīna. Oksidatīvās fosforilēšanas novērtēšanai izmantoja 1 mM ADF.

3. Eksperiments – piruvāts un malāts. Kā substrātu izmanto 5 mM piruvāta un 5 mM malāta. Oksidatīvās fosforilēšanas novērtēšanai izmantoja 1 mM ADF.

10.11 RT-PĶR metode (mRNS izolēšana)

Nosver audu paraugu, sasmalcina ar šķērītēm un tilpuma attiecībā 1:10 ar TRI reaģentu, homogenizē 30 sekundes. Paraugus samaisa un inkubē istabas temperatūrā 10 minūtes, pēc tam centrifugē 12 000xg, 10 minūtes, 4°C. 500 µl supernatanta pārnes jaunā ependorfā un pievieno 200 µl hloroforma. Paraugus samaisa, inkubē istabas temperatūrā 10 minūtes un centrifugē 12 000xg, 10 minūtes, 4°C. Maisījums sadalās 3 slāņos, proti, bezkrāsainais ūdens slānis, kas satur RNS, starpslānis, kas satur DNS un sarkans organiskais slānis, kas satur proteīnus.

Bezkrāsaino ūdens slāni pārnes jaunā ependorfā, pievieno 300 µl izopropilspirta un samaisa. Inkubē 60 minūtes -20°C, līdz izkrīt baltas nogulsnes, tad centrifugē 12 000xg, 10 minūtes, 4°C. Nogulsnēm pievieno 1 ml 75 % etilspirta, samaisa un centrifugē 7500xg, 10

minūtes, 4°C. Atkārtoti pievieno 0.5 ml 96 % etilspirta. Nogulsnēm noņem spirtu, velkmes skapī izžāvē un izšķīdina 50 µl ūdens, samaisa.

10.12 kDNS sintēze

Izolētajam RNS spektrometriski nosaka daudzumu un kvalitāti, atšķaidot paraugus 1:20 (10 µl paraugs un 190 µl ūdens), un mērot absorbciju pie 230 nm, 260 nm un 280 nm. Paraugus atšķaida ar ūdeni, lai to koncentrācija būtu 0.5 µg/ml. Pagatavo reaģentu maisījumu kDNS sintēzes reakcijai, kas sastāv no 2 µl 10xRT buferšķīduma, 0.8 µl 25x dNTP MIX, 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl RNāzes inhibitora, 1 µl MultiScribe™ reversās transkriptāzes un 3.2 µl nukleāžu brīva ūdens. Platītē iepilina sagatavoto MIX reaģentu maisījumu 10 µl un pievieno 10 µl parauga, samaisa ar ependorfu maisītāju. Paraugus ievieto termostatā, inkubē 10 minūtes, 25°C temperatūrā, pēc tam 120 minūtes, 37°C temperatūrā. kDNS sintēzes reakciju apstādina, karsējot paraugus 5 minūtes, 85°C temperatūrā.

Paraugus atšķaida attiecībā 1:10 (20 µl kDNS un 180 µl ūdens), samaisa un šo maisījumu izmanto PĶR reakcijai. Sagatavo reaģentu maisījumu no 10 µl SYBR Green master Mix, 6 µl nukleāžu brīva ūdens un 2 µl praimeru MIX(R+F) un pievieno 2 µl uzsintezētā kDNS parauga. Reakcijai izmanto sekojošu gēnu praimerus: KPT-1A izoformu, KPT-1B izoformu, GLUT-4, piruvātdehidrogenāzes (PDH) kompleksu, PDH B kompleksu, kā arī β-aktīnu kā kontroli. RT-PĶR reakcijas veic Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System.

10.13 Datu apstrāde

Datu apkopošanā un statistiskajā analīzē tika izmantota programma Microsoft Excel 2003 un GraphPad Prism 3.00 (GraphPad Software, Inc.). Rezultātu ticamība tika pārbaudīta ar ANOVA un *2-tailed* t-testu un rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja *p* vērtība ir bijusi mazāka par 0.05.

11.REZULTĀTI

11.1 Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija

Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija žurkas plazmā ir parādīta 11.1. Tabulā. Mildronāta ārstēšana parāda nozīmīgu devas atkarīgu karnitīna koncentrācijas samazināšanos plazmā. Pēc 4 nedēļu ārstēšanas ar 100, 200 un 400 mg/kg mildronāta devu, tika novērota nozīmīga karnitīna koncentrācijas samazināšanās, kas bija attiecīgi 3, 5 un 13 reizes (11.1. tabula). Pēc 8 un 12 nedēļu ārstēšanas kursa, karnitīna koncentrācija turpināja samazināties tikai tām žurkām, kuru deva bija 400 mg/kg, sasniedzot 20 reižu mazāku karnitīna daudzumu, salīdzinot ar kontroli 8 nedēļā, un 35 reizes mazāku karnitīna koncentrāciju pēc 12 nedēļu ilgas mildronāta terapijas. Wistar žurku sirds audos ilgstoša mildronāta ievadīšana, karnitīna koncentrāciju samazināja atkarībā no devas lieluma, bet ievadīšanas ilguma ietekme uz karnitīna koncentrācijas samazinājumu netika novērota, ja mildronāta deva bija 200 mg/kg. Pie devas 100 mg/kg, karnitīna samazinājums sirds audos bija vidēji 2.6 reizes visu terapijas laiku. Krasi atšķiras karnitīna koncentrācijas samazinājums 12 nedēļā, proti, sirds audos samazinājums pie devas 200 un 400 mg/kg bija attiecīgi 5 un 15 reizes,. Pēc 4 nedēļu ārstēšanas ar 100, 200 un 400 mg/kg mildronāta devu, karnitīna koncentrācijas samazinājums sirdī bija attiecīgi 2.6, 4 un 12 reizes, respektīvi, pēc 12 nedēļu ilgas ārstēšanas, samazinājums bija attiecīgi 2.5, 6 un 15 reizes (11.1. tabula).

Mildronāta ārstēšana izraisa GBB koncentrācijas palielināšanos asins plazmā, tomēr šīs izmaiņas neietekmēja ne terapijas ilgums, ne deva. (11.1. tabula). Plazmā GBB koncentrācija pēc 4 nedēļu ilgas terapijas palielinājās 6 reizes pie visām trīs devām. Pēc 8 nedēļu ilgas mildronāta ievadīšanas, GBB koncentrācija palielinājās 8 reizes, salīdzinot ar kontroli. Savukārt 12 nedēļā, pie mildronāta devas 100mg/kg, GBB koncentrācijas pieaugums bija 14 reizes, 200mg/kg devas – 10 reizes, bet 400mg/kg devas – 8 reizes. Sirds audos GBB koncentrācija pie 100 un 200 mg/kg devas, salīdzinot ar kontroli, palielinās 7 reizes, bet pie devas 400 mg/kg pat 10 reizes (11.2. tabula).

11.1. tabula Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija plazmā

	Kontrole	M 100	M 200	M 400
4 nedēļas				
Karnitīns, μM	56.9 \pm 2.8	17.2 \pm 1.6*	10.3 \pm 1.0*	4.2 \pm 0.3*
GBB, μM	1.3 \pm 0.1	7.9 \pm 0.9*	8.4 \pm 0.9*	8.2 \pm 0.9*
Mildronāts, μM	0	19.6 \pm 4.0	30.6 \pm 4.0	54.9 \pm 8.5
8 nedēļas				
Karnitīns, μM	52.9 \pm 2.6	11.9 \pm 0.8*	6.0 \pm 0.8*	2.5 \pm 0.2*
GBB, μM	0.8 \pm 0.1	8.1 \pm 0.8*	7.2 \pm 0.4*	5.8 \pm 0.4*
Mildronāts, μM	0	19.8 \pm 3.6	25.8 \pm 2.4	40.0 \pm 5.5
12 nedēļas				
Karnitīns, μM	64.0 \pm 3.8	15.1 \pm 1.8*	7.6 \pm 1.6*	1.8 \pm 0.3*
GBB, μM	0.7 \pm 0.1	9.9 \pm 1.0*	7.5 \pm 1.0*	5.8 \pm 0.7*
Mildronāts, μM	0	27.0 \pm 3.7	30.7 \pm 3.6	47.8 \pm 5.4

Kontroles un ar mildronātu ārstētās žurkas (100 līdz 400 mg/kg) tika novērotas pēc 4, 8 un 12 nedēļām. Karnitīna, GBB un mildronāta daudzums tika noteikts asins plazmā, kā aprakstīts nodaļā Materiāli un Metodes. Dotas vidējās \pm SEM vērtības no 8 līdz 10 dzīvniekiem. *Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas $P < 0.05$.

11.2. tabula Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija sirdī

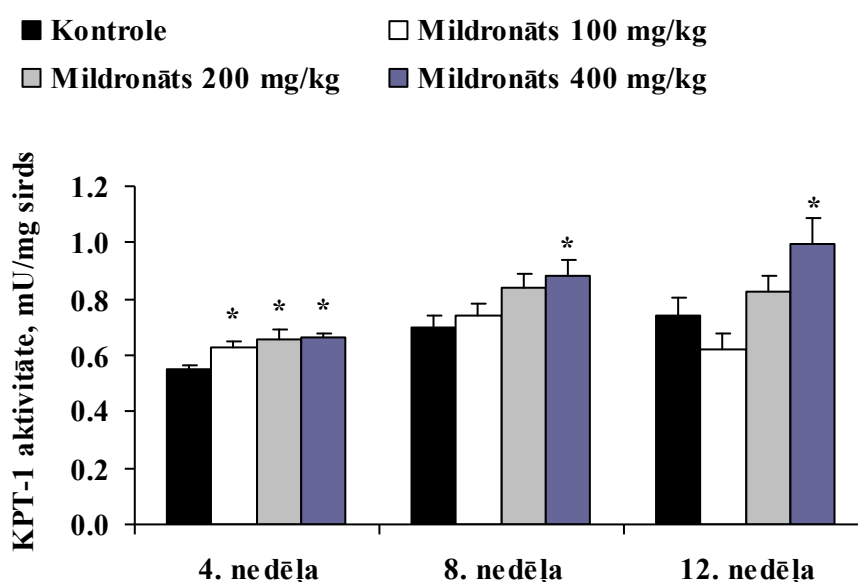
	Koncentrācija sirdī (nmol/g)			
	Kontrole	M 100	M 200	M 400
4 nedēļas				
Karnitīns	1123 \pm 37	431 \pm 29*	251 \pm 39*	91 \pm 11*
GBB	25 \pm 1	184 \pm 17*	206 \pm 16*	197 \pm 17*
Mildronāts	0	640 \pm 48	948 \pm 63	1528 \pm 165
8 nedēļas				
Karnitīns	935 \pm 98	381 \pm 37*	199 \pm 21*	116 \pm 22*
GBB	30 \pm 3	230 \pm 9*	255 \pm 11*	228 \pm 16*
Mildronāts	0	758 \pm 37	1283 \pm 85	1653 \pm 102
12 nedēļas				
Karnitīns	963 \pm 45	365 \pm 36*	164 \pm 22*	61 \pm 7*
GBB	20 \pm 1	226 \pm 9*	234 \pm 10*	196 \pm 7*
Mildronāts	0	782 \pm 33	1337 \pm 90	1894 \pm 40

Kontroles un ar mildronātu ārstētās žurkas (100 līdz 400 mg/kg) tika novērotas pēc 4, 8 un 12 nedēļām. Karnitīna, GBB un mildronāta daudzums tika noteikts sirds audos, kā aprakstīts nodaļā Materiāli un Metodes. Dotas vidējās \pm SEM vērtības no 8 līdz 10 dzīvniekiem. *Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

11.2 KPT-1 aktivitāte

Mildronāta terapijas efekts uz KPT-1 (bez papildus pievienota karnitīna) aktivitāti sirds audu homogenātā ir parādīts 11.1. attēlā. Kontroles aktivitāte 4 nedēļu kontroles grupai bija 0,55 mU/mg. Savukārt 8 un 12 nedēļu kontrolēs tā palielinājās līdz attiecīgi 0,7 mU/mg un 0,8 mU/mg sirds. Pēc 4 nedēļu mildronāta ievadīšanas, bazālā KPT-1 aktivitāte ir palielinājusies par 16% grupā ar mildronāta devu 100mg/kg, savukārt ar devu 200 mg/kg, KPT-1 aktivitātes pieaugums bija 23%.

Pēc 8 nedēļu ilgas mildronāta ievadīšanas, KPT-1 aktivitāte ir palielinājusies vidēji par 23%. Jāatzīmē, ka pie 400 mg/kg mildronāta devas, KPT-1 aktivitātes pieaugums ir 32%. Pēc 12 nedēļu terapijas, KPT-1 aktivitāte pie 200 mg/kg devas palielinājās par 27%, bet pie 400 mg/kg devas - par 53%.

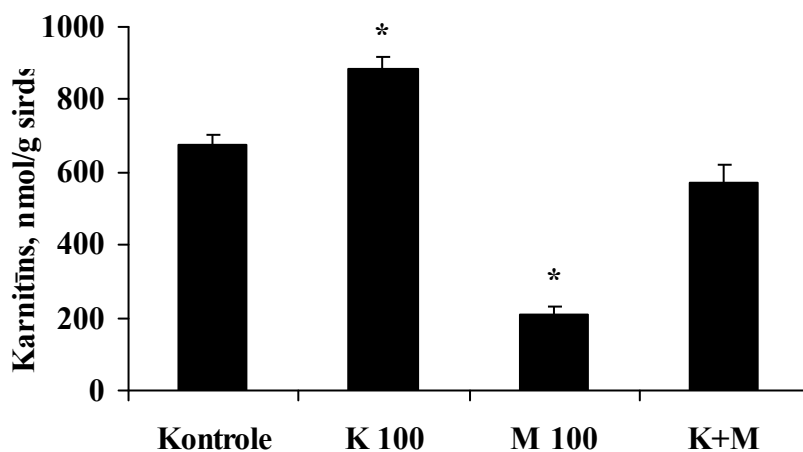


11.1. att. Mildronāta efekts uz KPT-1 aktivitāti sirds audos. Kontrole un ar mildronātu (100-400 mg/kg) ārstētās žurkas tika novērotas pēc 4, 8 un 12 nedēļām. KPT-1 aktivitāte tika noteikta bez papildus karnitīna pievienošanas kā aprakstīts nodaļā Materiāli un Metodes. Vērtības parāda vidējo \pm SEM no 6 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

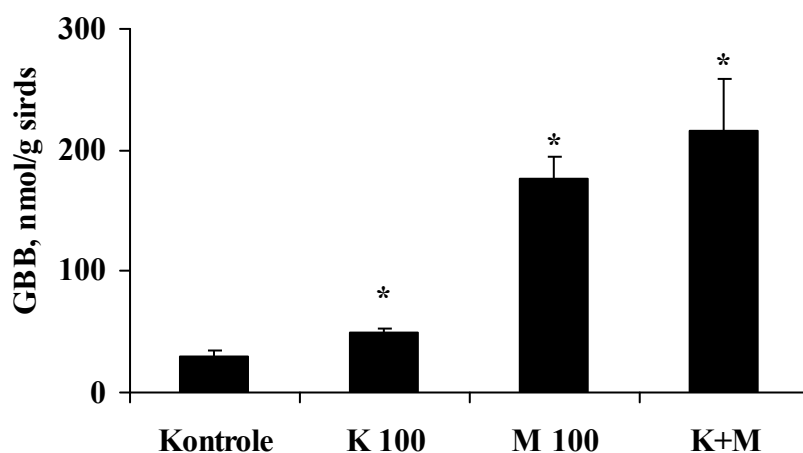
11.3 Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrācija žurku plazmā un audos

Karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efekts uz karnitīna koncentrāciju sirds audos ir parādīts 11.2. attēlā. Kontroles grupā karnitīna koncentrācija bija 674 nmol/g sirds. Karnitīna (K100) grupā, karnitīna koncentrācija bija pieaugusi līdz 886 nmol/g sirds, tātad sirds audos karnitīna ievadīšana palielina tā koncentrāciju par 31%. Mildronāta (M100) terapijas grupā, karnitīna koncentrācija sirds audos bija samazinājusies

par 69 %, salīdzinot ar kontroles grupu. Kombinētai karnitīna un mildronāta (K+M) ievadīšanai, nebija statistiski nozīmīgas ietekmes uz karnitīna koncentrāciju sirds audos.



11.2. att. **Karnitīna koncentrācija sirds audos.** Žurkām tika ievadīta karnitīna (100 mg/kg, K100), mildronāta (100 mg/kg, M100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (100 un 100 mg/kg, K+M) terapija 2 nedēļas. Vērtības parāda vidējo \pm SEM no 5 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

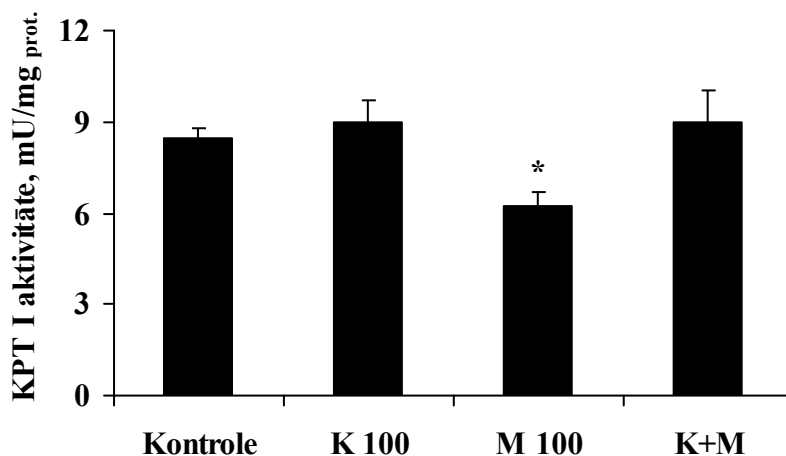


11.3. att. **GBB koncentrācija sirds audos.** Žurkām tika ievadīts karnitīns (100 mg/kg, K100), mildronāts (100 mg/kg, M100) un karnitīna-mildronāta kombinācija (100 un 100 mg/kg, K+M) 2 nedēļas. Vērtības parāda vidējo \pm SEM no 5 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

Karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efekts uz GBB koncentrāciju sirds audos ir parādīts 11.3. attēlā. Kontroles grupā vidējā GBB koncentrācija bija 30 nmol/g sirds. GBB koncentrācija sirds audos pēc karnitīna (K100) ievadīšanas pieauga 2 reizes. Mildronāta (M100) un karnitīna-mildronāta kombinēta (K+M) ievadīšana, palielināja GBB koncentrāciju sirds audos attiecīgi 6 un 7 reizes.

11.4 KPT-1 aktivitāte

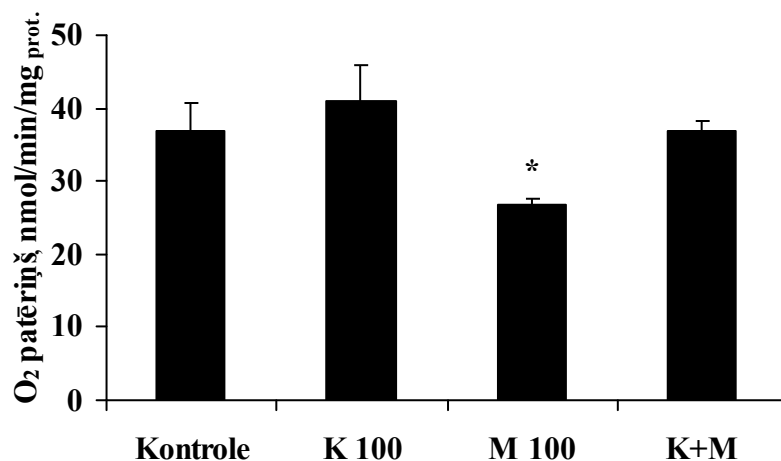
Karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efekts uz KPT-1 aktivitāti ir parādīts 11.4. attēlā. Kontroles grupā KPT-1 aktivitāte bija 8.43 mU/mg. Karnitīna (K100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (K+M) grupā KPT-1 aktivitātes pieaugums nebija statistiski nozīmīgi izmainījies, un pieauga attiecīgi līdz 8.98 mU/mg un 8.96 mU/mg. KPT-1 aktivitāte bija statistiski nozīmīgi samazināta par 26% mildronāta (M100) grupā, salīdzinot ar kontroli.



11.4. att. KPT-1 aktivitāte sirds audos. Karnitīna (100 mg/kg, K100), mildronāta (100 mg/kg, M100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (100 un 100 mg/kg, K+M) 2 nedēļu ievadīšanas efekti uz KPT-1 aktivitāti, pie karnitīna koncentrācijām 700 μ M kontroles grupā, 900 μ M K100, 200 μ M un 600 μ M attiecīgi K+M grupā. Vērtības parāda vidējo \pm SEM no 5 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

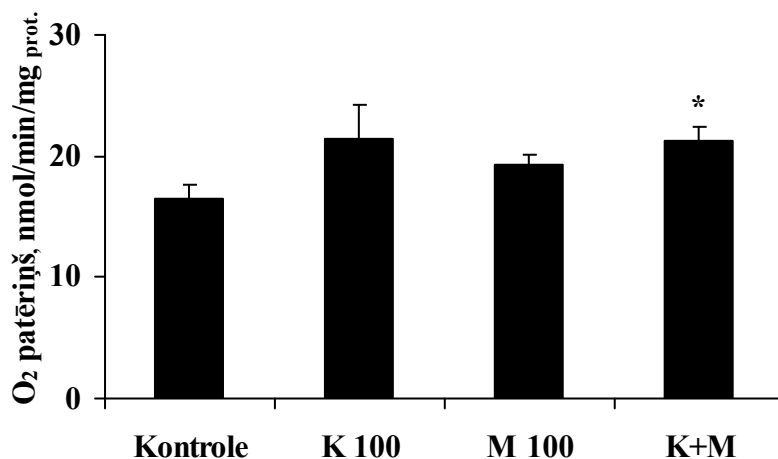
11.5 Mitohondriju elpošana

Karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efekts uz skābekļa patēriņu mitohondriju elpošanas eksperimentā, izmantojot palmitoil-KoA substrātu, attēlots 11.5. attēlā. Kontroles grupā skābekļa patēriņš bija 36.9 nmol O_2 /min/mg proteīna. Karnitīna (K100) terapijas grupā skābekļa patēriņš palielinājās līdz 41.0 nmol O_2 /min/mg proteīna. Karnitīna-mildronāta kombinācijas (K+M) grupā skābekļa patēriņa izmaiņas nebija nozīmīgas. Pēc mildronāta (M100) terapijas mitohondriju elpošana ar substrātu palmitoil-KoA, bija samazināta par aptuveni 27 %, salīdzinot ar kontroles grupu.



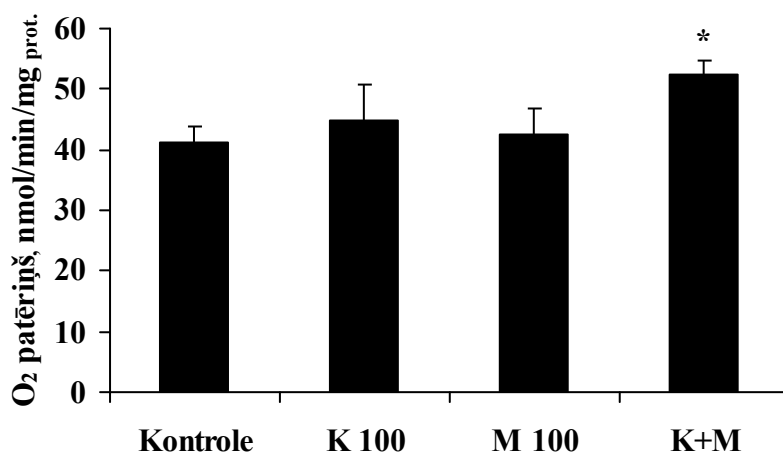
11.5. att. Izolētu sirds mitohondriju skābekļa patēriņš ar pamitoil-KoA substrātu. Karnitīna (100 mg/kg, K100), mildronāta (100 mg/kg, M100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (100 un 100 mg/kg, K+M) 2 nedēļu terapijas efekts, kā elpošanas substrātu izmantojot 40 μ M palmitoil-KoA, pie karnitīna koncentrācijām sirds audos 700 μ M kontroles grupā, 900 μ M K100 grupā, 200 μ M M100 grupā un 600 μ M K+M grupā. Vērtības parāda vidējo \pm SEM no 6 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

Karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efekts uz skābekļa patēriņu mitohondriju elpošanas eksperimentā, izmantojot palmitoil-karnitīna substrātu, attēlots 11.6. attēlā. Kontroles grupā skābekļa patēriņš bija 16.4 nmol O₂/min/mg proteīna. Mildronāta (M100) terapijas grupā skābekļa patēriņš palielinājās līdz 19.2 nmol O₂/min/mg proteīna. Karnitīna (K100) terapijas grupā skābekļa patēriņš palielinājās līdz 21.4 nmol O₂/min/mg proteīna. Pēc karnitīna un mildronāta kombinācijas (K+M) terapijas, mitohondriju elpošana ar palmitoil-karnitīna substrātu, bija palielinājusies par 29 %, salīdzinot ar kontroles grupu.



11.6. att. Izolētu sirds mitohondriju skābekļa patēriņš ar pamitoil-karnitīna substrātu. Karnitīna (100 mg/kg, K100), mildronāta (100 mg/kg, M100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (100 un 100 mg/kg, K+M) 2 nedēļu terapijas efekts, kā elpošanas substrātu

izmantojot 36 μM palmitoil-karnitīnu, pie karnitīna koncentrācijām sirds audos 700 μM kontroles grupā, 900 μM K100 grupā, 200 μM M100 grupā un 600 μM K+M grupā. Vērtības parāda vidējo $\pm\text{SEM}$ no 6 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

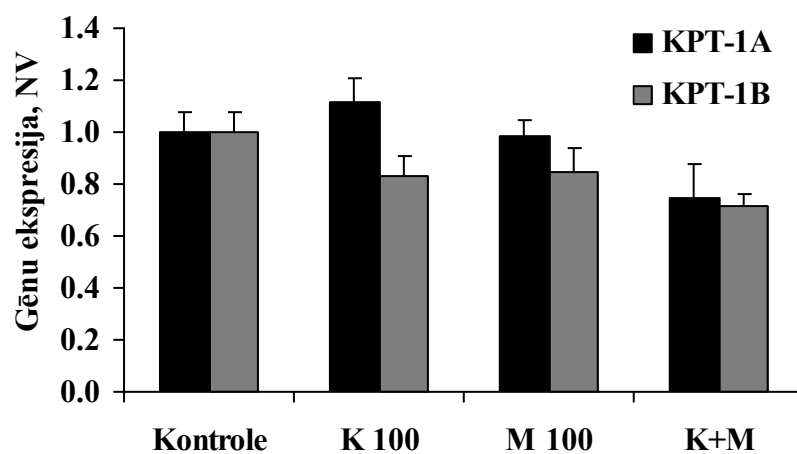


11.7. att. Izolētu sirds mitohondriju skābekļa patēriņš ar piruvāta un malāta substrātu. Karnitīna (100 mg/kg, K100), mildronāta (100 mg/kg, M100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (100 un 100 mg/kg, K+M) 2 nedēļu terapijas efekts, kā elpošanas substrātu izmantojot 5mM piruvātu un 5mM malātu, pie karnitīna koncentrācijām sirds audos 700 μM kontroles grupā, 900 μM K100 grupā, 200 μM M100 grupā un 600 μM K+M grupā. Vērtības parāda vidējo $\pm\text{SEM}$ no 6 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

Karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efekts uz skābekļa patēriņu mitohondriju elpošanas eksperimentā, izmantojot piruvāta un malāta substrātu, attēlots 11.7. attēlā. Mildronāta (M100) terapijai un karnitīna (K100) terapijai nebija nozīmīgas ietekmes uz mitohondriju elpošanu, proti, attiecīgi 42.6 nmol O_2 /min/mg un 44.7 nmol O_2 /min/mg proteīna, salīdzinot ar kontroles grupu – 41.3 nmol O_2 /min/mg proteīna. Pēc karnitīna un mildronāta kombinācijas (K+M) terapijas, mitohondriju elpošana ar piruvāta un malāta substrātu, bija palielinājusies par 27 %.

11.6 KPT-1A un KPT-1B ekspresija

Karnitīna, mildronāta un karnitīna-mildronāta kombinācijas efekts uz KPT-1A un KPT-1B izoformas gēnu ekspresiju, attēlots 11.8. attēlā. Kontroles grupā gēnu ekspresija bija 1.00 NV, gan KPT-1A izoformai, gan KPT-1B izoformai. Statistiski nozīmīgas atšķirības mRNS ekspresijā starp KPT-1A un KPT-1B izoformām, netika novērotas nevienā terapijas grupā, salīdzinot ar kontroli.



11.8. att. **KPT-1A un KPT-1B gēnu ekspresija.** Karnitīna (100 mg/kg, K100), mildronāta (100 mg/kg, M100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (100 un 100 mg/kg, K+M) 2 nedēļu terapijas efekts uz KPT-1A izoformas un KPT-1B izoformas gēnu ekspresiju. Vērtības parāda vidējo \pm SEM no 6 dzīvniekiem. * Statistiski atšķirīgs no kontroles grupas. $P < 0.05$.

12. DISKUSIJA

Karnitīns piedalās taukskābju un glikozes enerģijas metabolisma regulēšanas mehānismos sirds un skeleta muskuļos un organismā karnitīna homeostāze tiek nodrošināta pateicoties kompleksai transporta sistēmai. Mildronāts ir pazīstams kā karnitīna koncentrāciju pazeminošs aģents (62), kas kavē gan karnitīna biosintēzi, gan samazina tā reabsorbciju nierēs (63). Mildronāta terapija saistīta ar ievērojamu karnitīna pieejamības samazinājumu, kas izraisa vismaz daļēju taukskābju oksidācijas kavēšanu (62, 84). Kavējot biosintēzi, mildronāts palielina karnitīna prekursora GBB koncentrāciju gan asinīs, gan audos (75). Arī mūsu pētījumā mildronāta ilgstoša ievadīšana izraisa nozīmīgu - no devas atkarīgu karnitīna koncentrācijas samazināšanos asins plazmā un sirds audos (11.1. un 11.2. Tabula). Kā jau bija sagaidāms, visizteiktāko efektu izraisīja 400 mg/kg mildronāta ievadīšana 4 līdz 12 nedēļas ilgi, kad karnitīna koncentrācija sirds audos samazinājās 10 reizes, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem (11.2. tabula). Ja ievadītā deva bija 200 mg/kg 4 līdz 12 nedēļas, mildronāts pazemināja karnitīna koncentrāciju audos 3-4 reizes, kas ir apmēram līdzīgs samazinājums kā citos pētījumos, ievadot to pašu devu 3 līdz 6 nedēļas (84, 85). Līdz ar to var secināt, ka mildronāts karnitīna koncentrāciju pazemina no devas atkarīgā veidā un, ka karnitīna pazeminājums sasniedz plato līmeni pēc 4 nedēļu terapijas, un ilgāka mildronāta ievadīšana karnitīna līmeni sirds audos būtiski nepazemināja. Kā kavētas karnitīna sintēzes marķieris tika atrasta GBB koncentrācijas palielināšanās gan asins plazmā, gan sirds audos. Pirmo reizi parādīts, ka atšķirībā no karnitīna, GBB koncentrācijas palielinājums veselās žurkās nav no devas atkarīgs, kā arī tā koncentrācija nav atkarīga no 4-12 nedēļu terapijas ilguma.

Jāuzsver, ka papildus mūsu veiktajiem mērījumiem, visos laika punktos tika veiktas sirds un aknu funkcionālās pārbaudes (dati nav parādīti) un, lai gan mildronāta terapija nozīmīgi samazināja karnitīna koncentrāciju sirdī un aknās (dati nav parādīti), tas neizraisīja nekādus nozīmīgus funkcionālus traucējumus vai sarežģījumus (dati nav parādīti). Literatūra savukārt ir pretrunīga informācija par mildronāta ietekmi uz aknu funkcionalitāti pēc ilgstošas ievadīšanas. Ir publikācijas, kur samazināta karnitīna koncentrācija pēc 6 nedēļu ilgas mildronāta ievadīšanas devā 200 mg/kg, izraisa aknu steatozi (84). Tajā pašā laikā ir noskaidrots, ka tikai badinātām žurkām aknās akumulējas lipīdi, ja karnitīna koncentrācija ir izteikti samazināta (80). Lai pēc mildronāta (100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas ievadīšanas (4, 8 un 12 nedēļas) pārbaudītu samazinātās karnitīna koncentrācijas ietekmi uz aknu funkcionalitāti, histoķīmiski analizēja aknu audu griezumus, noteica triglicerīdu un taukskābju koncentrāciju aknu audos, kā arī lipīdu profilu un aknu funkcionalitātes marķierus asins plazmā (dati nav parādīti). Aknu audu griezumu histoķīmiskā analīze neuzrādīja lipīdu

infiltrācijas pazīmes (dati nav parādīti), bet triglicerīdu koncentrācija statistiski ticami palielinājās par 10-20 % tikai lielākās mildronāta devas gadījumā (dati nav parādīti). Taukskābju koncentrācija aknu audos ticami palielinājās tikai pēc 12 nedēļām, nepārsniedzot 15 %, salīdzinājumā ar kontroles grupu (dati nav parādīti). Karnitīna koncentrācijas samazinājums būtiski neietekmēja arī asins plazmas lipīdu profilu. Atšķirīgie rezultāti par mildronāta samazinātās karnitīna koncentrācijas ietekmi uz aknu funkcionalitāti, iespējams, ir saistīti ar pētījumos (*Spaniol M. ar kolēģiem*) izmantotā 3-(2,2,2-trimetil-hidrazīnija)-propionāta jeb mildronāta izcelsmi. *Spaniol M. ar kolēģiem* izmantojuši pašu sintezētu vielu, kas, balstoties uz metodes aprakstu un pētījumiem par mildronāta attīrīšanu no sintēzes blakusproduktiem (86), varētu saturēt tādus toksiskus piemaisījumus kā 1,1,1-trimetilhidrazīnija sāļi un citi hidrazīnija atvasinājumi. Mūsu un *Degrace P. ar kolēģiem* pētījumos izmantots AS „Grindeks” ražotais 3-(2,2,2-trimetil-hidrazīnija)-propionāts jeb mildronāts un toksiski efekti nav novēroti. Kopumā jāsecina, ka ilgstoša mildronāta ievadīšana inducē nozīmīgu karnitīna koncentrācijas samazināšanos asins plazmā, sirds un aknu audos, tomēr, pateicoties kompensējošajiem mehānismiem tas neizraisa sirds un aknu funkcionālus traucējumus.

Karnitīns enzīma KPT-1 ietekmē ar garķēžu taukskābēm veido acil-K, kurus tad ir iespējams transportēt mitohondrijos. Līdz ar to, ir nozīmīgi apskatīt, kā izmainās KPT-1 aktivitāte samazinātas karnitīna koncentrācijas apstākļos. Samazināta karnitīna koncentrācija audos izraisa izmaiņas enerģijas metabolismā, īpaši garķēžu taukskābju mitohondriālo oksidāciju. Parasti, sarežģījumi, ko rada karnitīna deficīts sirdī, ir saistīti ar samazinātu KPT-1 aktivitāti, kā arī samazinātu taukskābju oksidācijas ātrumu (87), jo tipiskos karnitīna deficīta simptomus novēro arī KPT-1 deficīta gadījumā (88). Mūsu pētījumu rezultāti rāda, ka ievadot žurkām lielākas mildronāta devas (200 un 400mg/kg) KPT-1 aktivitāte sirdī ne tikai nav samazināta, bet ir nozīmīgi paaugstināta un no devas atkarīga, pat neskatoties uz līdz pat 10 reizēm mildronāta ievadīšanas ietekmē pazemināto karnitīna līmeni (11.1. attēls). Šīs izmaiņas viennozīmīgi saistītas ar KPT-1 ekspresijas palielināšanos sirdī, turklāt līdzīgi efekti novēroti arī citos pētījumos (80, 77). Iegūtie rezultāti liecina, ka KPT-1 aktivitāte un mRNS daudzuma izmaiņas pēc mildronāta ievadīšanas ir atkarīgas no tā, cik ilgstošs vai nozīmīgs ir bijis karnitīna samazinājums. Kopumā jāsecina, ka KPT-1 proteīna paaugstināta ekspresija kompensē samazināto karnitīna pieejamību šūnā un izmaiņas enerģijas metabolismā.

Salīdzinoši mazākā devā (100 mg/kg) pēc 2 nedēļu ilgas mildronāta ievadīšanas, nenovēroja arī KPT-1A un KPT-1B gēnu ekspresijas izmaiņas (11.8. attēls) un tā kā karnitīna koncentrācija bija ievērojami samazināta, KPT-1 aktivitāte sirdī samazinājās par 26%, salīdzinot ar kontroles grupu (11.4. attēls). Līdzīgi samazinājās KPT-1 atkarīgais palmitāta

transports un tā oksidācija mitohondrijos. Interesanti, ka ir nepieciešams vismaz 60-70% karnitīna koncentrācijas samazinājums, lai samazinātu KPT-1 atkarīgo garķēžu taukskābju transportu un oksidāciju par 27% (11.5. attēls). Pēc kombinētās karnitīna un mildronāta ievadīšanas, karnitīna koncentrācija un KPT-1 aktivitāte bija līdzīga kontroles grupai (11.2. un 11.4. attēls). No tā var secināt, ka samazinātā karnitīna koncentrācija, ir galvenais mildronāta kardioprotektīvais mehānisms. Ja pēc mildronāta ilgstošas ievadīšanas mitohondriju elpošanas eksperimentos kā substrātu izmantoja palmitoil-karnitīnu, kuram, lai iekļūtu mitohondrijos, nav nepieciešams karnitīns un KPT-1, tika novērots stimulēts taukskābju metabolisms. Tas nozīmē, ka mildronāta izraisītās karnitīna koncentrācijas samazinājums tieši saistīts ar KPT-1 kā būtiskāko iedarbības vietu taukskābju metabolismā.

Nesen publicētā pētījumā parādīts, ka ilgstoša mildronāta ievadīšana samazina karnitīna koncentrāciju peļu sirds audos un atvieglo glikozes uzņemšanu šūnā, kā arī palielina glikozes metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju (77). Vēl izteiktāks glikozes samazinājums asins plazmā tika novērots 2. tipa diabēta G-K žurkās. Savukārt mūsu pētījumā ar veselām žurkām, glikozes koncentrācija praktiski nesamazinājās (dati nav parādīti). Jādomā, ka mildronāta terapija nevis tieši stimulē, bet drīzāk atvieglo glikozes metabolismu, un šis efekts ievērojami mainās atkarībā no dažādu substrātu pieejamības, kā arī enerģijas nepieciešamības. Gadījumos, kad taukskābju oksidācija ir relatīvi samazināta, paātrināts glikozes metabolisms varētu būt vēl viens nozīmīgs kompensējošais mehānisms, kas nodrošinātu šūnu ar nepieciešamo enerģiju. Savukārt 2. tipa diabēta gadījumā, taukskābju oksidācijas samazināšanai varētu būt terapeitisks efekts. Bez tam 2. tipa diabēts bieži tiek saistīts ar palielinātu triglicerīdu un brīvo taukskābju cirkulāciju asinsritē. Savukārt, palielinātā taukskābju koncentrācija ievērojami kavē glikozes metabolismu, kas noved pie pārāk liela taukskābju izmantošanas un samazinātas glikozes izmantotās enerģijas ražošanai. Turpretim, karnitīna daudzuma samazinājums varētu pasargāt šūnas no lipīdu pārslodzes, un tādā veidā atvieglot glikozes metabolismu. Kopumā var secināt, ka mildronāts ietekmē glikozes metabolismu diabēta žurkās, bet praktiski neietekmē veselos dzīvniekus.

Vairākos pētījumos ir informācija, ka gan karnitīna koncentrācijas palielināšana, gan arī samazināšana var samazināt išēmijas izraisīto sirds šūnu bojājumu. Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā vienlaicīgi ar ietekmi uz karnitīna koncentrāciju, KPT-1 aktivitāti un mitohondriju elpošanas eksperimentiem tika salīdzināta karnitīna (100 mg/kg), mildronāta (100 mg/kg) un abu vielu kombinācijas (100 un 100 mg/kg) 14 dienu ilgstošas ievadīšanas aizsargājošā ietekme uz sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu. Ir publikācijas par to, ka karnitīna ievadīšana samazina infarkta lielumu pēc paliekošas sirds kreisās koronārās artērijas oklūzijas (89), bet neietekmē išēmijas-reperfūzijas izsuktā nekrotiskā bojājuma lielumu (90).

Tajā pašā laikā ir zināms, ka karnitīna samazinājums, ko izraisījusi ilgstoša mildronāta ievadīšana ir kardioprotektīva (6, 75, 76). Iepriekšējos pētījumos arī atrasts, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts korelē ar karnitīna biosintēzes prekursora GBB koncentrācijas palielināšanos (75). Mildronāta 14 dienu ilga ievadīšana samazināja karnitīna koncentrāciju sirds audos par 69 %, kā arī statistiski ticami samazināja infarkta lielumu par 34 %. Ievadot mildronāta-karnitīna kombināciju, karnitīna koncentrācija sirds audos nesamazinājās, bet infarkta lielums bija praktiski līdzīgs kā kontroles grupā (dati nav parādīti). Sirdsdarbības parametri starp grupām bija vienādi gan normoksijas, gan išēmijas un reperfūzijas laikā, kas liecina, ka vielu ietekme uz infarkta lielumu nav saistāma ar izmaiņām sirds veiktajā darbā. Iegūtie rezultāti liecina, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts ir saistāms ar izmaiņām sirds enerģijas metabolismā, ko izraisa karnitīna koncentrācijas samazināšanās un nevis GBB koncentrācijas palielināšanās. Karnitīna koncentrācijas samazinājums izraisa ne tikai KPT-1 aktivitātes samazināšanos, kas kavē taukskābju metabolismu, bet, ņemot vērā iepriekšējo pētījumu rezultātus, stimulē arī glikozes izmantošanu, jo kompensatori palielinās tās metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresija un aktivitāte (91, 77). Tāpēc var secināt, ka mildronāta izraisītais karnitīna koncentrācijas samazinājums sirds audos ir pamatā mildronāta izraisītajam enerģijas metabolisma izmaiņām un ar tām saistīto kardioprotektīvo efektu išēmijas apstākļos.

13. SECINĀJUMI

1. Ilgstoša mildronāta ievadīšana samazina karnitīna koncentrāciju Wistar žurku asins plazmā un sirds audos no devas atkarīgā veidā, tuklāt pat 30 reižu karnitīna koncentrācijas samazinājums neizraisa sirds un aknu funkcionālus traucējumus un audu bojājumus.

2. Ilgstoša mildronāta ievadīšana līdz pat 10 reizes palielina GBB koncentrāciju asins plazmā un sirds audos, tomēr šis efekts nav atkarīgs ne no devas, ne arī no terapijas ilguma.

3. Mildronāta ilgstoša ievadīšana devā 100mg/kg neizmaina, bet lielākās devās stimulē KPT-1 ekspresiju sirds audos.

4. Mildronāta ilgstošas ievadīšanas izraisītais karnitīna koncentrācijas samazinājums audos kavē KPT-1 enzīma aktivitāti un no tās atkarīgo taukskābju transportu mitohondrijos.

5. Mildronāta izraisītais karnitīna koncentrācijas samazinājums sirds audos ir pamatā mildronāta izraisītajām enerģijas metabolisma izmaiņām un ar tām saistīto kardioprotektīvo efektu išēmijas apstākļos.

14.PATEICĪBAS

Pateicība Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītājai Dr. Farm. Maijai Dambrovai par iespēju izstrādāt maģistra darbu.

Izsaku pateicību darba vadītājam Dr. Farm. Edgaram Liepiņam par atkārtoto uzņemšanos vadīt šoreiz jau maģistra darbu, kļūdu labošanu, motivēšanu un atsaucību.

Paldies Elīnai Škaparei par uzraudzību laboratorijas lietās un veiksmīgo sadarbību šūnu istabā.

Paldies Jānim Kūkam un Marinai Makreckai par veiksmīgajiem mitohondriju elpošanas eksperimentiem.

15. IZMANTOTĀ LITERATŪRA UN AVOTI

1. **Müller-Nordhorn, J., Binting, S., Roll, S., Willich, S.N.** An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J*, 2008, 29(10), p. 1316-1326.
2. **Taegtmeyer, H., King, L.M., Jones, B.E.** Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. *Am J Cardiol*, 1998, 82, p. 54-60.
3. **Schofield, R.S., Hill, J.A.** Role of metabolically active drugs in the management of ischemic heart disease. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2001, 1, p. 23-35.
4. **Bieber, L.L.** Carnitine. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57, p. 261-83.
5. **Foster, D.W.** The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1033, p. 1-16.
6. **Dambrova, M., Liepinsh, E., Kalvinsh, I.** Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12, p. 275-279.
7. **Georges, B., Le Borgne, F., Galland, S., Isoir, M., Ecosse, D., Grand-Jean, F., Demarquoy, J.** Carnitine transport into muscular cells. Inhibition of transport and cell growth by mildronate. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(11), p. 1357-1363.
8. **Rebouche, C.J., Mack, D.L.** Sodium gradient-stimulated transport of L-carnitine into renal brush border membrane vesicles: kinetics, specificity, and regulation by dietary carnitine. *Arch Biochem Biophys*, 1984, 235, p. 393-402.
9. **Ramsay, R.R., Gandour, R.D., van der Leij, F.R.** Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1546, p. 21-43.
10. **Paulson, D.J.** Carnitine deficiency-induced cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*, 1998, 180, p. 33-41.
11. **Longo, N., Amat di San Filippo, C., Pasquali, M.** Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006, 142, p. 77-85.
12. **Dambrova, M., Liepiņš, E., Kūka, J., Medne, R.** Karnitīna 100 gadi. No atklāšanas līdz klīniskajiem pielietojumiem. *Doctus*, 2007, 11, 4. -8.lpp.
13. **Rebouche, C.J.** Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1033, p. 30-41.
14. **Evans, A.M., Fornasini, G.** Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42, p. 941-967.
15. **Leibovitz, E.B.** *L-Carnitine. The energy nutrient*. Los Angeles : Keets Publishing, 1999, 11-12 p.

16. **Rebouche, C. J.** Carnitine. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, vol.9., p. 505-512.
17. **Demarquoy, J., Georges, B., Rigault, C., Royer, M.C., Clairet, A., Soty, M., Lekounougou, S., Le Borgne, F.** Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chem*, 2004, 86(1), p. 137-142
18. **Spasov, A.A., Iezhitsa, I.N.** Stereopharmacology of carnitine. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2005, 91, p. 1469-1480.
19. **Hathcock, J.N., Shao, A.** Risk assessment for carnitine. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006, 46, p. 23-28.
20. **Calvani, M., Benatti, P., Mancinelli, A., D'Iddio, S., Giordano, V., Koverech, A., Amato, A., Brass, E.P.** Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1033, p. 52-66
21. **Stanley, W.C., Recchia, F.A., Lopaschuk, G.D.** Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 2005, 85(3), p. 1093-1129.
22. **Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D., Jaswal, J.S., Stanley, W.C.** Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 2010, 90(1), p. 207-258
23. **Lopaschuk, G.D.** Optimizing cardiac energy metabolism: how can fatty acid and carbohydrate metabolism be manipulated? *Coron Artery Dis*, 2001, 12, p. 8-11.
24. **Stephens, F.B., Constantin-Teodosiu, D., Greenhaff, P.L.** New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol*, 2007, 581, p. 431-444.
25. **McGarry, J.D., Brown, N.F.** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, 1997, 244, p. 1-14.
26. **Britton, C.H., Schultz, R.A., Zhang, B., Esser, V., Foster, D.W., McGarry, J.D.** Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92, p. 1984-1988.
27. **Yamazaki, N., Shinohara, Y., Shima, A., Yamanaka, Y., Terada, H.** Isolation and characterization of cDNA and genomic clones encoding human muscle type carnitine palmitoyltransferase I. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1307, p. 157-161.
28. **Price, N., van der Leij, F., Jackson, V., Corstorphine, C., Thomson, R., Sorensen, A., Zammit, V.** A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*, 2002, 80, p. 433-442.

29. **Bonnefont, J.P., Djouadi, F., Prip-Buus, C., Gobin, S., Munnich, A., Bastin, J.** Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*, 2004, 25, p. 495-520.
30. **Esser, V., Britton, C.H., Weis, B.C., Foster, D.W., McGarry, J.D.** 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*, 1993, 268, p. 5817-5822.
31. **Brown, N.F., Hill, J.K., Esser, V., Kirkland, J.L., Corkey, B.E., Foster, D.W., McGarry, J.D.** Mouse white adipocytes and 3T3-L1 cells display an anomalous pattern of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I isoform expression during differentiation. Inter-tissue and inter-species expression of CPT I and CPT II enzymes. *Biochem J*, 1997, 327, p. 225-231.
32. **Distler, A.M., Kerner, J., Hoppel, C.L.** Mass spectrometric demonstration of the presence of liver carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) in heart mitochondria of adult rats. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(3), p. 431-437.
33. **Esser, V., Brown, N.F., Cowan, A.T., Foster, D.W., McGarry, J.D.** Expression of a cDNA isolated from rat brown adipose tissue and heart identifies the product as the muscle isoform of carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT I). M-CPT I is the predominant CPT I isoform expressed in both white (epididymal) and brown adipocytes. *J Biol Chem*, 1996, 271, p. 6972-6977.
34. **Akkaoui, M., Cohen, I., Esnous, C., Lenoir, V., Sournac, M., Girard, J., Prip-Buus, C.** Modulation of the hepatic malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase 1A partnership creates a metabolic switch allowing oxidation of de novo fatty acids. *Biochem J*, 2009, 420(3), p. 429-438.
35. **Guzmán-Ruiz, R., Somoza, B., Gil-Ortega, M., Merino, B., Cano, V., Attané, C., Castan-Laurell, I., Valet, P., Fernández-Alfonso, M.S., Ruiz-Gayo, M.** Sensitivity of cardiac carnitine palmitoyltransferase to malonyl-CoA is regulated by leptin: similarities with a model of endogenous hyperleptinemia. *Endocrinology*, 2010, 151(3), p. 1010-1018.
36. **Bruce, C.R., Hoy, A.J., Turner, N., Watt, M.J., Allen, T.L., Carpenter, K., Cooney, G.J., Febbraio, M.A., Kraegen, E.W.** Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*, 2009, 58(3), p. 550-558.
37. **Nezu, J., Tamai, I., Oku, A., Ohashi, R., Yabuuchi, H., Hashimoto, N., Nikaido, H., Sai, Y., Koizumi, A., Shoji, Y., Takada, G., Matsuishi, T., Yoshino, M., Kato, H.,**

- Ohura, T., Tsujimoto, G., Hayakawa, J., Shimane, M., Tsuji, A.** Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet*, 1999, 21, p. 91-94.
38. **Koizumi, A., Nozaki, J., Ohura, T., Kayo, T., Wada, Y., Nezu, J., Ohashi, R., Tamai, I., Shoji, Y., Takada, G., Kibira, S., Matsuishi, T., Tsuji, A.** Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mol Genet*, 1999, 8, p. 2247-2254.
39. **Cano, A., Ovaert, C., Vianey-Saban, C., Chabrol, B.** Carnitine membrane transporter deficiency: a rare treatable cause of cardiomyopathy and anemia. *Pediatr Cardiol*, 2008, 29, p. 163-165.
40. **Wang, Y., Ye, J., Ganapathy, V., Longo, N.** Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5), p. 2356-2360.
41. **Wang, Y., Kelly, M.A., Cowan, T.M., Longo, N.** A missense mutation in the OCTN2 gene associated with residual carnitine transport activity. *Hum Mutat*, 2000, 15(3), p. 238-245.
42. **Flanagan, J.L., Simmons, P.A., Vehige, J., Willcox, M.D., Garrett, Q.** Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*, 2010, 7, p. 30-43.
43. **Angelini, C., Federico, A., Reichmann, H., Lombes, A., Chinnery, P., Turnbull, D.** Task force guidelines handbook: EFNS guidelines on diagnosis and management of fatty acid mitochondrial disorders. *Eur J Neurol*, 2006, 13, p. 923-929.
44. **Rajakumar, C., Ban, M.R., Cao, H., Young, T.K., Bjerregaard, P., Hegele, R.A.** Carnitine palmitoyltransferase IA polymorphism P479L is common in Greenland Inuit and is associated with elevated plasma apolipoprotein A-I. *J Lipid Res*, 2009, 50(6), p. 1223-1228.
45. **Korman, S.H., Waterham, H.R., Gutman, A., Jakobs, C., Wanders, R.J.** Novel metabolic and molecular findings in hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *Mol Genet Metab*, 2005, 86, p. 337-343.
46. **Greenberg, C.R., Dilling, L.A., Thompson, G.R., Seargeant, L.E., Haworth, J.C., Phillips, S., Chan, A., Vallance, H.D., Waters, P.J., Sinclair, G., Lillquist, Y., Wanders, R.J., Olpin, S.E.** The paradox of the carnitine palmitoyltransferase type Ia P479L variant in Canadian Aboriginal populations. *Mol Genet Metab*, 2009, 96(4), p. 201-207.

47. **Dalakas, M.C., Illa, I., Pezeshkpour, G.H., Laukaitis, J.P., Cohen, B., Griffin, J.L.** Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy. *N Engl J Med*, 1990, 322, p. 1098-1105.
48. **Dalakas, M.C., Leon-Monzon, M.E., Bernardini, I., Gahl, W.A., Jay, C.A.** Zidovudine-induced mitochondrial myopathy is associated with muscle carnitine deficiency and lipid storage. *Ann Neurol*, 1994, 35, p. 482-487.
49. **Walter, E.B., Drucker, R.P., McKinney, R.E., Wilfert, C.M.** Myopathy in human immunodeficiency virus-infected children receiving long-term zidovudine therapy. *J Pediatr*, 1991, 119, p. 152-155.
50. **Simpson, D.M.** Neuromuscular complications of human immunodeficiency virus infection. *Semin Neurol*, 1992, 12, p. 34-42.
51. **Campos, Y., Arenas, J.** Muscle carnitine deficiency associated with zidovudine-induced mitochondrial myopathy. *Ann Neurol*, 1994, 36, p. 680-681.
52. **Brinkman, K., ter Hofstede, H.J., Burger, D.M., Smeitink, J.A., Koopmans, P.P.** Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS*, 1998, 12, p. 1735-1744.
53. **Shuper, A., Gutman, A., Mimouni, M.** Intractable epilepsy. *Lancet*, 1999, 353, p. 1238.
54. **Campistol, J., Chavez, B., Vilaseca, M.A., Artuch, R.** Antiepileptic drugs and carnitine. *Rev Neurol*, 2000, 30, p. 105-109.
55. **Castro-Gago, M., Eiris-Punal, J., Novo-Rodriguez, M.I., Couceiro, J., Camina, F., Rodriguez-Segade, S.** Serum carnitine levels in epileptic children before and during treatment with valproic acid, carbamazepine, and phenobarbital. *J Child Neurol*, 1998, 13, p. 546-549.
56. **Zelnik, N., Fridkis, I., Gruener, N.** Reduced carnitine and antiepileptic drugs: cause relationship or co-existence? *Acta Paediatr*, 1995, 84, p. 93-95.
57. **Verrotti, A., Greco, R., Morgese, G., Chiarelli, F.** Carnitine deficiency and hyperammonemia in children receiving valproic acid with and without other anticonvulsant drugs. *Int J Clin Lab Res*, 1999, 29, p. 36-40.
58. **Camina, M.F., Rozas, I., Castro-Gago, M., Paz, J.M., Alonso, C., Rodriguez-Segade, S.** Alteration of renal carnitine metabolism by anticonvulsant treatment. *Neurology*, 1991, 41, p. 1444-1448.
59. **Ohtani, Y., Endo, F., Matsuda, I.** Carnitine deficiency and hyperammonemia associated with valproic acid therapy. *J Pediatr*, 1982, 101, p. 782-785.

60. **Opala, G., Winter, S., Vance, C., Vance, H., Hutchison, H.T., Linn, L.S.** The effect of valproic acid on plasma carnitine levels. *Am J Dis Child*, 1991, 145, p. 999-1001.
61. **Hendler, S. S., Rorvik, D. R.** *PDR for Nutritional Supplements*. Montvale : Medical Economics Company, Inc., 2001. -700.p.
62. **Simkhovich, B.Z., Shutenko, Z.V., Meirena, D.V., Khagi, K.B., Mezapuke, R.J., Molodchina, T.N., Kalvins, I.J., Lukevics, E.** 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma- butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37, p. 195-202.
63. **Spaniol, M., Brooks, H., Auer, L., Zimmermann, A., Solioz, M., Stieger, B., Krahenbuhl, S.** Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. *Eur J Biochem*, 2001, 268, p. 1876-87.
64. **Tsoko, M., Beauseigneur, F., Gresti, J., Niot, I., Demarquoy, J., Boichot, J., Bezard, J., Rochette, L., Clouet, P.** Enhancement of activities relative to fatty acid oxidation in the liver of rats depleted of L-carnitine by D-carnitine and a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 1995, 49, p. 1403-10.
65. **Hayashi, Y., Tajima, K., Kirimoto, T., Miyake, H., Matsuura, N.** Cardioprotective effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on cardiac dysfunction induced by ischemia/reperfusion in isolated rat hearts. *Pharmacology*, 2000, 61, p. 238-243.
66. **Kirimoto, T., Nobori, K., Asaka, N., Muranaka, Y., Tajima, K., Miyake, H.** Beneficial effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on energy metabolism in ischemic dog hearts. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1996, 331, p. 163-78.
67. **Kuwajima, M., Harashima, H., Hayashi, M., Ise, S., Sei, M., Lu, K., Kiwada, H., Sugiyama, Y., Shima, K.** Pharmacokinetic analysis of the cardioprotective effect of 3-(2,2, 2- trimethylhydrazinium) propionate in mice: inhibition of carnitine transport in kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 289, p. 93-102.
68. **Yonekura, K., Eto, Y., Yokoyama, I., Matsumoto, A., Sugiura, S., Momomura, S., Kirimoto, T., Hayashi, Y., Omata, M., Aoyagi, T.** Inhibition of carnitine synthesis modulates protein contents of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and hexokinase type I in rat hearts with myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*, 2000, 95, p. 343-8.
69. **Skarda, I., Klincare, D., Vītols, A., Kalniņš, U., Dinne, I., Urbāne, D., Dzērve, V., Kalviņš, I.** Mildronāta ietekme uz sirds funkcionēšanu, fiziskām darbspējām un dzīves kvalitāti slimniekiem ar hronisku sirds mazspēju. *Latvijas ārsts*, 1995, 12, 17.-24. lpp.

70. **Недошивин, А.О., Петрова, Н.Н., Кутузва, А.Е., Перепеч, Н.Б.** Качество жизни больных с хронической сердечной недостаточностью. Эффект лечения милдронатом. *Терапевт. Архив*, 1999, 71, с. 10-12.
71. **Бойцов, С.А., Овчинников, Ю.Б., Захарова, А.И., Булыко, Т.М.** Применение милдроната для лечения хронической недостаточности кровообращения I стадии у мужчин 40-50. *Клинич. Медицина и патофизиология*, 1998, 1-2, с. 25-29
72. **Стеблева, Т.Ф., Войтович, А.В., Мамаева, Е.Г., Лапшангская, Е.Е., Семиголовский, Н.Ю., Лебединский, К.М.** Механизмы оптимизации кислородного бюджета организма под влиянием мафусола и милдроната при экстренном эндопротезировании тазобедренного сустава. *Вестн. Хирургии*, 2000, 159, с. 57-60
73. **Семиголовский, Н.Ю.** Применение антигипоксантов в остром периоде инфаркта миокарда. *Анестезиология и реаниматология*, 1998, 2, с. 56-59
74. **Asaka, N., Muranaka, Y., Kirimoto, T., Miyake, H.** Cardioprotective profile of MET-88, an inhibitor of carnitine synthesis, and insulin during hypoxia in isolated perfused rat hearts. *Fundam Clin Pharmacol*, 1998, 12, p. 158-163.
75. **Liepinsh, E., Vilskersts, R., Loca, D., Kirjanova, O., Pugovichts, O., Kalvinsh, I., Dambrova, M.** Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 48, p. 314-319.
76. **Sesti, C., Simkhovich, B.Z., Kalvinsh, I., Kloner, R.A.** Mildronate, a novel fatty acid oxidation inhibitor and antianginal agent, reduces myocardial infarct size without affecting hemodynamics. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47, p. 493-499.
77. **Liepinsh, E., Vilskersts, R., Skapare, E., Svalbe, B., Kuka, J., Cirule, H., Pugovics, O., Kalvinsh, I., Dambrova, M.** Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*, 2008, 83, p. 613-619.
78. **Vilskersts, R., Liepinsh, E., Mateuszuk, L., Grinberga, S., Kalvinsh, I., Chlopicki, S., Dambrova, M.** Mildronate, a regulator of energy metabolism, reduces atherosclerosis in apoE/LDLR^{-/-} mice. *Pharmacology*, 2009, 83, p. 287-293.
79. **Liepinsh, E., Vilskersts, R., Zvejniece, L., Svalbe, B., Skapare, E., Kuka, J., Cirule, H., Grinberga, S., Kalvinsh, I., Dambrova, M.** Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(8), p. 1549-1556.

80. **Degrace, P., Demizieux, L., Du, Z.Y., Gresti, J., Caverot, L., Djaouti, L., Jourdan, T., Moindrot, B., Guillard, J.C., Hocquette, J.F., Clouet, P.** Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem*, 2007, 282, p. 20816-20826.
81. **Degrace, P., Demizieux, L., Gresti, J., Tsoko, M., Andre, A., Demaison, L., Clouet, P.** Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. *Mol Cell Biochem*, 2004, 258, p. 171-182.
82. **Sokolovska, J., Isajevs, S., Sugoka, O., Lauberte, L., Svirina, D., Rostoka, E., Sjakste, N.** Correction of glycaemia and GLUT1 level by mildronate in rat streptozotocin diabetes mellitus model. *Cell Biochem Funct.*, 2011, 29 (1), p. 55-63.
83. **Liepinsh, E., Skapare, E., Svalbe, B., Makrecka, M., Cirule, H., Dambrova, M.** Anti-diabetic effects of mildronate alone or in combination with metformin in obese Zucker rats. *Eur. J Pharmacol.*, 2011, 658, p. 277-283.
84. **Spaniol, M., Kaufmann, P., Beier, K., Wuthrich, J., Torok, M., Scharnagl, H., Marz, W., Krahenbuhl, S.** Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res*, 2003, 44, p. 144-153.
85. **Zaugg, C.E., Spaniol, M., Kaufmann, P., Bellahcene, M., Barbosa, V., Tolnay, M., Buser, P.T., Krahenbuhl, S.** Myocardial function and energy metabolism in carnitine-deficient rats. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60, p. 767-775.
86. **Hmelnickis, J., Pugovics, O., Kazoka, H., Viksna, A., Susinskis, I., Kokums, K.** Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(3), p. 649-656.
87. **Uenaka, R., Kuwajima, M., Ono, A., Matsuzawa, Y., Hayakawa, J., Inohara, N., Kagawa, Y., Ohta, S.** Increased expression of carnitine palmitoyltransferase I gene is repressed by administering L-carnitine in the hearts of carnitine-deficient juvenile visceral steatosis mice. *J Biochem*, 1996, 119, p. 533-540.
88. **IJlst, L., Mandel, H., Oostheim, W., Ruiter, J.P., Gutman, A., Wanders, R.J.** Molecular basis of hepatic carnitine palmitoyltransferase I deficiency. *J Clin Invest*, 1998, 102, p. 527-531.
89. **Mouhieddine, S., de Leiris, J.** Cardioprotective effect of L-carnitine in rats submitted to permanent left coronary artery ligation. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1993, 101(6), p. 411-416.
90. **Briet, F., Keith, M., Leong-Poi, H., Kadakia, A., Aba-Alkhail, K., Giliberto, J.P., Stewart, D., Errett, L., Mazer, C.D.** Triple nutrient supplementation improves

survival, infarct size and cardiac function following myocardial infarction in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008, 18(10), p. 691-699.

91. **Broderick, T.L.** Hypocarnitinaemia induced by sodium pivalate in the rat is associated with left ventricular dysfunction and impaired energy metabolism. *Drugs R D*, 2006, 7, p. 153-161.

16.DOKUMENTĀRĀ LAPA

Maģistra darbs „Karnitīna palmitoiltransferāzes-1 loma mildronāta darbības mehānismos” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē, farmācijas maģistra studiju programmā.

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

Autors: Aija Homka.

12.05.2011.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. Farm. Edgars Liepiņš

12.05.2011.

Recenzents: Dr. Biol., doc. Una Riekstiņa

Darbs iesniegts Medicīnas fakultātē

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

Komisijas sekretāre: