

468154

doi:10.25143/prom-rsu_2011-19_pd



RĪGAS
STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Rīgas Stradiņa universitāte

Karnitīna sistēmas regulācijas loma kardioprotekcijā

Jānis Kūka

PROMOCIJAS DARBS FARMĀCIJAS DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI

·Specialitāte – Farmācijas ķīmija

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. pharm. **Maija Dambrova**

Latvijas Organiskās sintēzes institūta

Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītāja

Dr. chem. **Renāte Medne**

Rīgas Stradiņa universitātes

Farmācijas ķīmijas katedras vadītāja



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

Rīga, 2011

0221007422

468154

2011



RĪGAS
STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Rīgas Stradiņa universitāte

Karnitīna sistēmas regulācijas loma kardioprotekcijā

Jānis Kūka

PROMOCIJAS DARBS FARMĀCIJAS DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI

•Specialitāte – Farmācijas ķīmija

0221007422

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. pharm. **Maija Dambrova**

Latvijas Organiskās sintēzes institūta

Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītāja

Dr. chem. **Renāte Medne**

Rīgas Stradiņa universitātes

Farmācijas ķīmijas katedras vadītāja



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

Rīga, 2011

Satura rādītājs

Izmantotie saīsinājumi	5
Ievads	7
Darba mērķis	8
Darba uzdevumi	8
Darba zinātniskā novitāte	8
1. Literatūras apskats	10
1.1. Karnitīna sistēma	10
1.1.1. Karnitīna uzņemšana, transports un eliminācija organismā	10
1.1.2. Karnitīna biosintēze	12
1.1.3. Karnitīna aciltransferāžu sistēma	14
1.2. Karnitīna loma šūnu enerģijas metabolisma norisēs	17
1.2.1. Galvenie enerģijas avoti sirds šūnās	17
1.2.2. Taukskābju metabolisms	17
1.2.3. Glikozes metabolisms	19
1.2.4. Enerģijas metabolisma izmaiņas skābekļa bada apstākļos, karnitīna deficīts	20
1.3. Karnitīna sistēmas farmakoloģiska regulācija	23
1.3.1. Karnitīns klīnikā un eksperimentālos modeļos	23
1.3.2. Karnitīna sistēmas farmakoloģiska regulācija, izmantojot mildronātu	25
2. Materiāli un metodes	30
2.1. Dzīvnieki	30
2.2. <i>In vitro</i> metodes	30
2.2.1. Karnitīna, GBB un mildronāta noteikšana audos un plazmā	30
2.2.2. Bioķīmisko parametru mērījumi	31
2.2.2.1. Lipīdu profila, glikozes, laktāta, glikogena un aknu funkcionālo marķieru mērījumi plazmā un aknu un sirds homogenātos	31
2.2.2.2. KrAT un KPT I aktivitātes un mitohondriju elpošanas mērījumi	31
2.2.2.3. Kvantitatīvā RT-PCR analīze	32
2.2.3. Molekulārās dinamikas skaitļošana mildronāta un KrAT mijiedarbības raksturošanai	33
2.2.4. Histoķīmiskie pētījumi	33
2.3. <i>Ex vivo</i> un <i>in vivo</i> metodes	33

2.3.1. Hemodinamikas parametri <i>in vivo</i>	33
2.3.1.1. Neinvazīvie hemodinamiskie mērījumi	33
2.3.1.2. Invazīvie hemodinamiskie mērījumi.....	34
2.3.2. Langendorffa izolētās žurku sirds infarkta modelis	34
2.3.3. Izoproterenola inducētās išēmijas modelis un eksperimentālie žurku aritmiju modeļi.....	35
2.3.3.1. Izoproterenola inducētā išēmija	35
2.3.3.2. Išēmijas-reperfūzijas izraisītās aritmijas	35
2.3.3.3. Kalcija hlorīda izraisītās aritmijas.....	35
2.3.3.4. Akonitīna izraisītās aritmijas.....	35
2.3.4. Sāls inducētās hipertensijas modelis <i>Dahl</i> žurkās.....	36
2.3.4.1. Izolēta aorta.....	36
2.3.4.2. Transtorakālā ehokardiogrāfija	36
2.4. Datu apstrādes statistiskās metodes.....	36
3. Rezultāti	37
3.1. Mildronāta ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā un audos; karnitīna vienlaicīgas lietošanas ietekme	37
3.1.1. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme	37
3.1.2. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekme	40
3.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz enzīmu aktivitāti un audu un asins plazmas bioķīmiskajiem parametriem.....	42
3.2.1. Ietekme uz KPT I aktivitāti	42
3.2.2. Ietekme uz mitohondriju elpošanas aktivitāti.....	44
3.2.3. Ietekme uz asins plazmas bioķīmiskajiem parametriem	44
3.2.4. Ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem	47
3.2.5. Ietekme uz lipīdu profilu un glikogena saturu aknu audos	47
3.2.6. Aknu griezumam histoloģiskā analīze	50
3.3. Mildronāta ietekme uz KrAT	51
3.3.1. Ietekme uz KrAT aktivitāti <i>in vitro</i>	51
3.3.2. Ietekme uz KrAT aktivitāti <i>in vivo</i>	53
3.4. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu.....	54
3.5. Ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz hemodinamikas rādītājiem <i>Wistar</i> žurkās.....	57

3.6. Mildronāta un mildronāta orotāta pretinfarkta aktivitāte, ietekme uz aritmiju attīstību.....	58
3.6.1. Ietekme uz infarkta lielumu.....	58
3.6.2. Ietekme uz izoproterenola inducēto išēmiju.....	59
3.6.3. Ietekme uz išēmijas-reperfūzijas izraisītām aritmijām.....	60
3.6.4. Ietekme uz kalcija hlorīda izraisītajām aritmijām.....	62
3.6.5. Ietekme uz akonitīna izraisītajām aritmijām.....	62
3.7. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz hipertensijas attīstību <i>Dahl</i> sāls- jutīgajās žurkās.....	63
3.7.1. Ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā.....	63
3.7.2. Ietekme uz izdzīvošanu.....	64
3.7.3. Ietekme uz sistolisko asinsspiedienu un sirds ritmu.....	65
3.7.4. Ietekme uz žurku un to orgānu svaru un ehokardiogrāfiskajiem parametriem.....	66
3.7.5. Ietekme uz endoteliālo funkciju.....	69
4. Diskusija.....	70
4.1. Karnitīna koncentrācijas samazinājuma ietekme uz taukskābju un glikozes metabolismu.....	70
4.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu.....	74
4.3. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hipertensijas attīstību.....	76
5. Secinājumi.....	79
6. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes.....	80
7. Pateicības.....	82
8. Izmantotā literatūra.....	83

Izmantotie saīsinājumi

- ACBP – acil-koenzīmu A saistošais proteīns
ACSL – garo-virkņu acil-koenzīmu A sintetāze
ACSM – vidēji garo virkņu acil-koenzīmu A sintetāze
ACSS – īso virkņu acil-koenzīmu A sintetāze
ADF – adenozīna difosfāts
ALAT – alanīnaminotransferāze
ALDH 9 – aldehīddehidrogenāze 9
ALP – sārmainā fosfatāze
AMF – adenozīna monofosfāts
AMI – akūts miokarda infarkts
ASAT – aspartātamīnotransferāze
ATF – adenozīna trifosfāts
BPM – sirds saraušanās skaits minūtē
DNS – dezoksiribonukleīnskābe
DS žurkas – *Dahl* sāls-jutīgās žurkas
DTNB – 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoscābe)
E1 – PDH kompleksa enzīms piruvātdehidrogenāze
EDTA – etilēndiamīntetraetiķskābe
EGTA – etilēnglikoltetraetiķskābe
EKG – elektrokardiogramma
FABP_{pm} – ar citoplazmatisko membrānu saistītais taukskābes saistošais proteīns
FAT/CD36 – taukskābju translokāze
FATP – transmembrānas taukskābju transportproteīns
FFA – brīvās taukskābes
GBB – gamma-butirobetaīns
GBBH – GBB hidroksilāze
GLUT – glikozes transportproteīns
HDL-C – augsta blīvuma lipoproteīnu holesterols
HEK 293 – embrionālās cilvēka nieru šūnas, 293. līnija
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazīnetānsulfonskābe
H-FABP_c – sirds citoplazmatiskais taukskābes saistošais proteīns
HTML – 3-hidroksi-*N*⁶-trimetilizīns
HTMLA – HTML aldolāze
i/p – intraperitoneāli
IVSd un IVSs – sirds kambaru starpsienas biezums diastolē un sistolē
KAKT – karnitīna-acilkarnitīna translokāze
K_d – disociācijas konstante

K_i – inhibitora saistīšanās līdzsvara konstante
 K-H buferšķīdums – Krebsa-Henselaita buferšķīdums
 K_m – Mihaelisa-Mentenas konstante
 KPT – karnitīna palmitoiltransferāze
 KrAT – karnitīna acetiltransferāze
 KrOT – karnitīna oktanoiltransferāze
 LCFA – garo virkņu taukskābes
 LDL-C – zema blīvuma lipoproteīnu holesterols
 LVDP – sirds kreisā kambara saraušanās spēks
 LVEF – sirds kreisā kambara izsviedes tilpums
 LVFS – sirds kreisā kambara saraušanās spēja
 LVIDd un LVIDs – sirds kreisā kambara iekšējais diametrs diastolē un sistolē
 LVPWd un LVPWs – sirds kreisā kambara mugurējās sienas biezums diastolē un sistolē
 mRNS – matricas jeb informācijas ribonukleīnskābe
 NAD^+ – oksidētais nikotīnamīdadenīdinukleotīds
 $NADH^+$ – reducētais nikotīnamīdadenīdinukleotīds
 OCT – organisko katjonu transportproteīns
 OCTN – organisko katjonu/karnitīna transportproteīns
 PBS – fosfātu buferšķīdums
 PDH – piruvātdehidrogenāze
 PDHF – PDH fosfatāze
 PDHK – PDH kināze
 PPAR- α – peroksisomālo proliferatoru aktivētais receptors, α -tips
 RT-PCR – reālā laika reversās transkripcijas polimerāžu ķēžu reakcija
 SEM – vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda
 SLC22A5 – OCTN2 proteīnu kodējošais gēns
 TMABA – 4-*N*-trimetilaminobutiraldehīds
 TMABA-D – TMABA-dehidrogenāze
 TML – N^6 -trimetillizīns
 TMLH – TML hidroksilāze
 UPLC/MS/MS – augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija ar sekojošu tandēmmasspektrometriju

Ievads

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

Muskuļu šūnas enerģijas iegūšanai izmanto gan taukskābes, gan ogļhidrātus. Pēc to uzņemšanas šūnās notiek specifiski katabolisma procesi, kuros veidojas šūnu enerģijas avots – adenozīna trifosfāts. Normālos apstākļos šūna enerģiju iegūst galvenokārt taukskābju oksidācijas rezultātā. Tomēr skābekļa trūkuma gadījumā šūnai izdevīgāka izrādās glikozes oksidēšana nekā taukskābju izmantošana, jo šim procesam nepieciešams mazāks skābekļa daudzums (Taegtmeier et al., 1998; Schofield & Hill, 2001). Karnitīns ir viens no faktoriem, kas nosaka garo virkņu taukskābju izmantošanas intensitāti, kā arī piedalās līdzsvara regulēšanā starp glikozes un taukskābju ieguldījumu šūnu enerģētiskajā metabolismā.

Karnitīns ir organismā sastopama viela, kas saistīta ar šūnu enerģijas metabolisma norisēm. Jāuzsver, ka karnitīnu pirms aptuveni simts gadiem atklāja latvietis Roberts Krimbergs, kurš kopā ar kolēģiem no muskuļu audiem izolēja L-β-hidroksi-γ-N-trimetilaminosviestskābi – karnitīnu (Gulewitsch & Krimberg, 1905). Vārds “karnitīns” ir atvasināts no vārda *caro* jeb *carnis*, kas tulkojumā no latīņu valodas nozīmē „gaļa”.

Kā zināms, ar karnitīna palīdzību šūnās caur mitohondriju membrānām notiek taukskābju transports ar sekojošu β-oksidāciju un enerģijas iegūšanu (Strijbis et al., 2010). Lai arī karnitīna fizioloģisko lomu muskuļu metabolisma procesos atklāja jau pirms 50 gadiem (Bieber, 1988) un pēdējā laikā to plaši lieto kā uztura bagātinātāju, tomēr karnitīna farmakoloģiskie efekti, tajā skaitā kardioprotektīvie, ir salīdzinoši maz izpētīti. Eksperimenti liecina, ka karnitīna koncentrācijas izmaiņām audos varētu būt divējāds efekts. Nedaudz samazinot karnitīna koncentrāciju sirdī, tās šūnas vieglāk adaptējas išēmijas apstākļiem un pārejošam skābekļa badam (Dambrova et al., 2002), kamēr ievērojama karnitīna koncentrācijas samazināšanās varētu izsaukt muskuļu distrofiju (Georges et al., 2000). Tāpēc ļoti nozīmīgi būtu noskaidrot karnitīna regulācijas farmakoloģiskās un fizioloģiskās sekas, lai labāk izprastu tās izmantošanas iespējas klīnikā sirds-asinsvadu saslīmšanu ārstēšanā.

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

Doktorantūras programmas eksperimentālo daļu veica Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā.



Darba mērķis

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

Darba uzdevumi

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

Darba zinātniskā novitāte

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

- Pierādīts, ka mildronāta ilgstošas 3 mēnešu lietošanas ietekmē samazinātā karnitīna koncentrācija neizraisa sirds darbības un aknu funkciju traucējumus, kā arī neizmaina lipīdu profilu; iegūtie rezultāti apliecina mildronāta ilgstošas lietošanas nekaitīgumu.

- Parādīts, ka ilgstošs karnitīna koncentrācijas samazinājums izsauc kompensatoru, no izsuktā samazinājuma atkarīgu karnitīna palmitoiltransferāzes I aktivitātes palielināšanos.
- Pirmo reizi raksturota mildronāta saistīšanās karnitīna acetiltransferāzes aktīvajā centrā; salīdzināta mildronāta un karnitīna saistīšanās ar enzīmu.
- Parādīta mildronāta kardioprotektīvā efekta atkarība no karnitīna koncentrācijas samazinājuma sirds audos un angioprotektīvās darbības saistība ar karnitīna un gamma-butirobetaīna koncentrāciju izmaiņām *Dahl* sāls-jūtīgo žurku hipertensijas modelī.

1. Literatūras apskats

1.1. Karnitīna sistēma

1.1.1. Karnitīna uzņemšana, transports un eliminācija organismā

Karnitīna homeostāze organismā tiek nodrošināta un efektīvi regulēta, pateicoties tā absorbcijai no pārtikas, biosintēzei, kā arī intensīvai reabsorbcijai no glomerulu filtrāta nieru proksimālajos kanāļos (Ramsay et al., 2001; Rebouche, 2004). Papildus tam, normālos apstākļos organisms nodrošina augsti regulētu karnitīna aktīvā transporta sistēmu, pateicoties kurai, karnitīna koncentrācija sirds audos ir vairākus desmitus reižu lielāka nekā asinīs (Ramsay et al., 2001). Apmēram 95% no visa organismā esošā karnitīna (~100 mmol) ir sirds un muskuļu audos un tikai līdz 1% atrodas ārpusšūnu telpā (Calvani et al., 2004). Galvenā loma karnitīna transporta nodrošināšanā organismā ir organisko katjonu transportproteīnu (OCT) saimes organisko katjonu/karnitīna transportproteīnu (OCTN) apakšsaimes otrā tipa transportproteīnam OCTN2.

Pirmo OCT saimes pārstāvi OCT1 klonēja 1994. gadā (Gründemann et al., 1994) un tā substrātspecifiskumu noskaidroja 2 gadus vēlāk (Busch et al., 1996). Lai arī OCT saimes transportproteīni OCT1-3 spēj transportēt dažādus organiskos katjonus, tomēr to jutība pret karnitīnu ir ļoti zema (Koepsell et al., 2007), tāpēc tiem nav fizioloģiska nozīme karnitīna transporta nodrošināšanā. Pirmo OCTN apakšsaimes transportproteīnu OCTN1 klonēja 1997. gadā, izmantojot cilvēka embrionālo aknu (Tamai et al., 1997), savukārt 3 gadus vēlāk noskaidroja, ka OCTN1 spēj transportēt arī karnitīnu. Tā kā karnitīns vāji saistās pie OCTN1, kopējais no Na^+ joniem atkarīgais (turpmāk Na^+ -atkarīgais) karnitīna transports netiek būtiski ietekmēts (Wu et al., 2000). Tālākos pētījumos atrada, ka cilvēka organismā OCTN1 piedalās iekššūnu karnitīna homeostāzes nodrošināšanā, veicinot karnitīna nokļūšanu mitohondrijos (Lamhonwah & Tein, 2006). 1998. gadā cilvēka nierēs identificēja DNS, kas kodē OCTN2, noteica OCTN2 struktūru un pārbaudīja tā spēju transportēt karnitīnu (Tamai et al., 1998). Iegūtie rezultāti parādīja, ka OCTN2 polipeptīda virkni veido 557 aminoskābes ar 75,8% līdzību aminoskābju secībā OCTN1 polipeptīda virknē. Noskaidroja, ka OCTN2 Na^+ -atkarīgā veidā nodrošina karnitīna uzņemšanu HEK 293 šūnās ar K_m vērtību 4,34 μM un šo transportu efektīvi kavē karnitīna D-izomērs, kā arī karnitīna biosintēzes tiešais prekursors GBB (Tamai et al., 1998). Tālākos pētījumos noskaidroja, ka OCTN2 ir Na^+ jonu un karnitīna koptransportproteīns, bet tas var transportēt dažādus katjonus arī no Na^+ -neatkarīgā veidā (Koepsell et al., 2007). Tomēr

2009. gadā, veicot pētījumus par OCTN2 transporta efektivitāti, noskaidroja, ka OCTN2 ir transportproteīns ar lielu jutību pret karnitīnu un strukturāli tuviem savienojumiem, piemēram, zāļu vielu mildronātu. Karnitīnam un mildronātam ir ļoti līdzīga gan uzkrāšanās šūnā un tieksme saistīties ar transportproteīnu, gan transporta atkarība no Na^+ joniem; mildronāta transports izrādījās pat efektīvāks nekā karnitīnam (Grigat et al., 2009). OCTN2 piedalās arī karnitīna biosintēzes prekursora GBB uzņemšanas nodrošināšanā aknu šūnās Na^+ -atkarīgā veidā (Fujita et al., 2009). Pētot OCTN2 lokalizāciju cilvēka sirds audos, noskaidroja, ka vairāk OCTN2 mRNS ir sirds kambaru un nevis priekškambaru audos, savukārt OCTN2 proteīns visvairāk tiek ekspresēts koronāro asinsvadu endotēlijā (Grube et al., 2006).

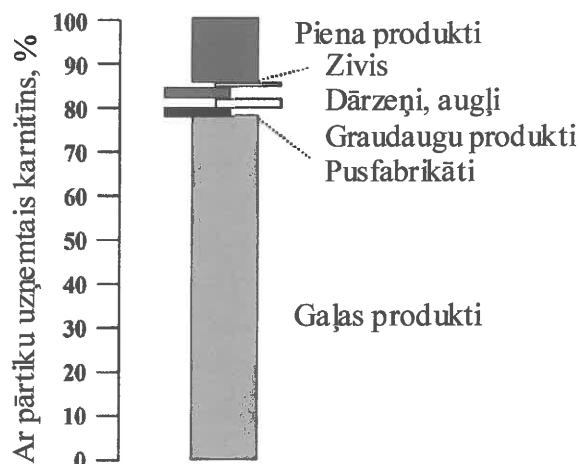
Pēc orālas uzņemšanas karnitīna absorbcija notiek divējādi – pateicoties aktīvajam transportam OCTN2 ietekmē, kā arī pasīvās difūzijas ceļā (Ramsay et al., 2001).

Ar sabalansētu pārtiku cilvēki uzņem karnitīnu līdz pat 12 $\mu\text{mol/kg}$ ķermeņa masas dienā, bet izteikti veģetārieši uzņem karnitīnu pat mazāk nekā 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ ķermeņa masas. Pētījumi parādījuši, 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%; jo vairāk karnitīna orāli uzņem, jo salīdzinoši mazāka tā daļa tiks absorbēta organismā (Evans & Fornasini, 2003). Savukārt, perorāli lietojot lielas karnitīna devas (> 6 g), parādās nepatīkama ķermeņa smaka, iespējams, palielinoties trimetilamīna koncentrācijai sviedros (Hathcock & Shao, 2006).

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 no pirmurīna (Calvani et al., 2004; Rebouche, 2004). Normāla glomerulārās filtrācijas ātruma (125 ml/min) apstākļos ekskretētais brīvā karnitīna daudzums ir ~7,2 mmol dienā un ir vienāds ar ekskretēto acilkarnitīnu daudzumu (Calvani et al., 2004). Samazinoties karnitīna saturam pārtikā, tā reabsorbcija nierēs pastiprinās, bet, uzņemot papildus karnitīnu, palielinās izfiltrētā karnitīna daudzums un uzsūkšanās atpakaļ samazinās (Rebouche, 2004). Līdzīgi novērojumi veikti sekundāra karnitīna deficīta, kā arī karnitīna terapijas gadījumā žurku modelī. Piemēram, sekundāra karnitīna deficīta apstākļos nierēs palielinās OCTN2 mRNS ekspresija, savukārt, no šo žurku nierēm izolētās proksimālo kanāliņu membrānās karnitīna transporta aktivitāte pieaug 1,9 reizes. Lai arī karnitīna terapija palielināja tā koncentrāciju plazmā par 80%, taču neizsauca nekādu OCTN2 mRNS ekspresijas izmaiņu, kā arī neietekmēja OCTN2 aktivitāti (Schürch et al., 2010).

1. attēlā parādīts karnitīna saturs dažādos pārtikas produktos un šo produktu ieguldījums kopējā ar pārtiku uzņemtā karnitīna daudzuma nodrošināšanā (Leibovitz, 1999; Rebouche, 1999; Demarquoy et al., 2004).

Pārtikas produkts	Karnitīns mg/100g
Aitas gaļa	210
Jēra gaļa	40-78
Liellopu gaļa	50-143
Cūkgaļa	17-28
Avokado	8.1
Menca	3.5-6.2
Vistas gaļa	3.5-21
Zirņi	5.7
Siers	0.3-19.8
Saldējums	2.65
Govs piens	2.0-2.9
Sviests	1.3
Olas	0.3-0.8
Baltmaize	0.2
Rieksti	0.1
Ziedkāposti	0.1
Kabači, vārīti kartupeļi, rīsi, nūdeles, tomāti	0

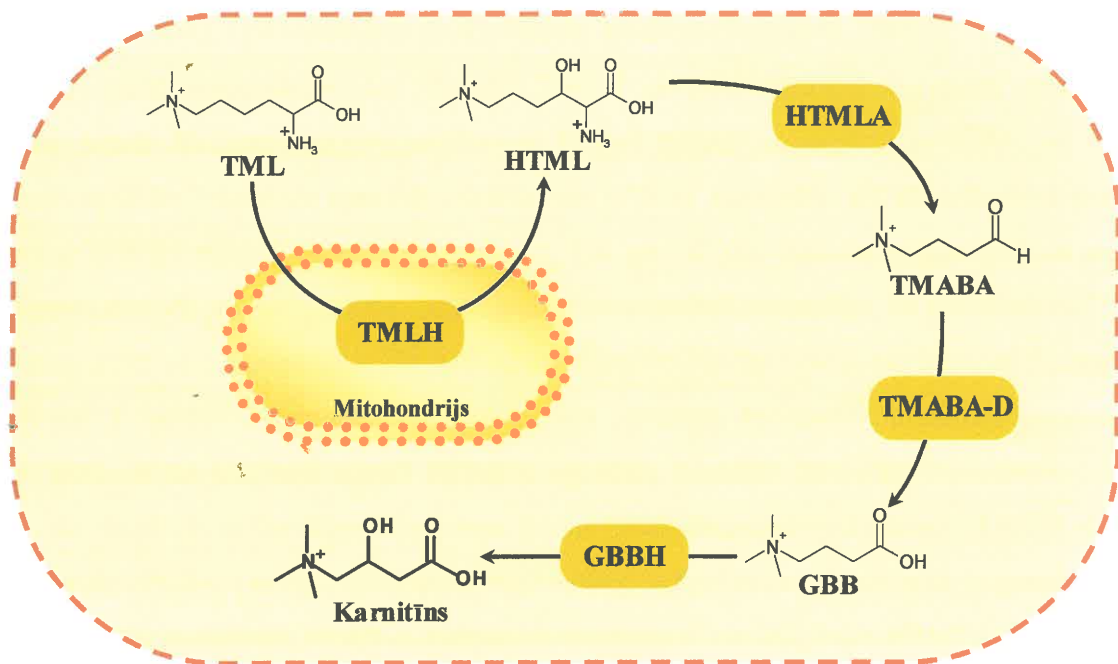


1. attēls. Karnitīna saturs pārtikas produktos un ar pārtiku uzņemtā relatīvais karnitīna daudzums organismā atkarībā no produktu veida.

1.1.2. Karnitīna biosintēze

Endogēnās biosintēzes rezultātā cilvēka organismā ik dienas rodas 1 – 2 μmol karnitīna uz kg ķermeņa masas (Rebouche, 2004) jeb 23 – 135 mg karnitīna, rēķinot uz vidēju pieaugušo (Evans & Fornasini, 2003). Lai arī karnitīna biosintēzes pirmais tiešais metabolīts ir trimetillizīns, karnitīna biosintēze notiek no aminoskābēm lizīna un metionīna. Lizīns nodrošina karnitīna oglekļa atomu skeletu, bet metionīns ir karnitīna 4-*N*-metilgrupu avots. Lizīna *N*-metilēšana notiek, aminoskābes atlikumam atrodoties vēl tādu atsevišķu proteīnu kā miozīns, aktīns u.c. sastāvā. Sekojošās proteīnu lizosomālās hidrolīzes rezultātā atbrīvojas karnitīna biosintēzes pirmais metabolīts – trimetillizīns (Vaz & Wanders, 2002). Pirms vairāk nekā 30 gadiem noskaidroja, ka zīdītāju organismā karnitīns tiek sintezēts četrās enzimatiskās reakcijās (Hulse et al., 1978). Karnitīna biosintēzes pirmais metabolīts *N*⁶-trimetillizīns (TML) enzīma TML-hidroksilāzes (TMLH; EC 1.14.11.8) ietekmē tiek pārvērsts par 3-hidroksi-*N*⁶-trimetillizīnu (HTML). No HTML aldolīzes reakcijā, ko katalizē enzīms HTML-aldolāze (HTMLA; EC 4.1.2.‘X’), rodas 4-*N*-trimetilaminobutiraldehīds (TMABA). Dehidrogenējot TMABA, ko katalizē TMABA-dehidrogenāze (TMABA-D; EC 1.2.1.47), rodas gamma-butirobetaīns (GBB). GBB tiek hidroksilēts enzīma GBB-hidroksilāzes (GBBH; EC 1.14.11.1) ietekmē un

reakcijā rodas karnitīns (2. attēls (Hulse et al., 1978; Vaz & Wanders, 2002; Strijbis et al., 2010)).



2. attēls. Karnitīna biosintēzes shēma.

1980. gadā, pētot karnitīna biosintēzes enzīmu atrašanos cilvēka audos, noskaidroja, ka GBB sintēze notiek aknās, nierēs, smadzenēs, sirdī un skeleta muskuļos, bet karnitīna sintēze notiek tikai aknās, nierēs un smadzenēs un vislielākā GBBH aktivitāte vērojama nierēs (Rebouche & Engel, 1980). Tāpat šajā pētījumā noskaidroja, ka GBBH aktivitāte aknās ir atkarīga no vecuma, piemēram, zīdaiņiem tā bija 12%, bet maksimālo aktivitāti sasniedz no 15 gadu vecuma. 1987. gadā noskaidroja, ka pretēji iepriekš apgalvotajam, GBBH tomēr nav karnitīna biosintēzi limitējošais enzīms cilvēka organismā (Olson & Rebouche, 1987). Pēdējos gados parādīts, ka karnitīna biosintēzes pirmais enzīms TMLH atrodas mitohondriju matriksā un HTML veidošanās ir tieši atkarīga no TML transporta ātruma caur mitohondriju iekšējo membrānu (van Vlies et al., 2007). Tā kā pārējie karnitīna biosintēzes enzīmi atrodas citosolā (Vaz & Wanders, 2002), iegūtie rezultāti liecina, ka tieši TMLH katalizētā reakcija un TML/HTML transports caur mitohondriju membrānu varētu būt limitējošie faktori karnitīna biosintēzes norisē (van Vlies et al., 2007; Strijbis et al., 2010). 2000. gadā atklāja, ka cilvēka organismā kā TMABA-D darbojas jau iepriekš atklātais enzīms aldehīddehidrogenāze 9 (ALDH 9), kam ir 92% līdzība ar žurku TMABA-D (Vaz et al., 2000). 2006. gadā atklāja, ka karnitīna biosintēze notiek arī placentas audos. Autori secināja, ka šis mehānisms varētu nodrošināt augli ar nepieciešamo karnitīna daudzumu apstākļos, kad traucēta augļa apgāde ar karnitīnu no mātes (Oey et al.,

2006). 2010. gadā, sadarbojoties Latvijas Biomedicīnas Pētījumu un Studiju Centra un Latvijas Organiskās sintēzes institūta pētniekiem, noskaidroja cilvēka rekombinantās GBBH kristālstruktūru un raksturoja tās kinētiskās īpašības (Tars et al., 2010).

2005. gadā noskaidroja, ka, lai gan TMLH aktivitāte pieaug karnitīna deficīta apstākļos, tomēr šīs izmaiņas nav saistītas ar TMLH mRNS izmaiņām; savukārt, lai arī karnitīna papildus lietošanas apstākļos samazinās GBBH aktivitāte, arī šīs izmaiņas nav saistītas ar GBBH mRNS ekspresijas izmaiņu, bet gan ar pēc-transskripcijas ietekmi uz enzīmiem (Davis & Monroe, 2005). 2006. gadā žurku modelī konstatēja, ka peroksisomālo proliferatoru aktivētā receptora α (PPAR- α) agonista klofibrāta lietošanas ietekmē pieaug OCTN1 un 2 mRNS daudzums, bet neizmainās karnitīna biosintēzē iesaistīto enzīmu mRNS. Līdz ar to pētījuma autori PPAR- α agonistu izsaukto karnitīna koncentrācijas pieaugumu skaidroja ar karnitīna transporta, bet ne biosintēzes pastiprināšanos (Luci et al., 2006). Tomēr cilvēku, pērtiķu, cūku aknu hepatocītos, atšķirībā no grauzējiem, ir apmēram 10 reizes mazāk ekspresēti PPAR- α , līdz ar to ievērojami var atšķirties PPAR- α agonistu izsauktie efekti (Holden & Tugwood, 1999). 2009. gadā, veicot eksperimentu ar cūkām, kā dzīvnieku modeli ar vājāk izteiktu PPAR- α ekspresiju, noskaidroja, ka, badinot cūkas 24 h, lai aktivētu PPAR- α , pieaug ne tikai OCTN2 mRNS ekspresija, bet arī GBBH aktivitāte aknu un nieru audos, liecinot, ka arī tā saucamās neproliferējošās sugas spēj nodrošināt papildus pieprasījumu pēc karnitīna badošanās laikā (Ringseis et al., 2009; Ringseis & Eder, 2009).

1.1.3. Karnitīna aciltransferāžu sistēma

Karnitīna aciltransferāžu sistēmu veido enzīmi karnitīna acetiltransferāze (KrAT), karnitīna oktanoiltransferāze (KrOT), karnitīna palmitoiltransferāzes (KPT) I un II. Šos enzīmus vieno spēja veicināt acilgrupu apmaiņu starp koenzīmu A un karnitīnu (Jogl et al., 2004). KrAT katalizē īso virkņu (C1-4) acilgrupu pārvešanu, KrOT katalizē vidēji garo virkņu (C5-12), bet KPT I un II katalizē garo virkņu (vairāk par C12) acilgrupu pārvešanu (Sharma & Black, 2009).

KrAT atrodas mitohondriju matriksā, peroksisomu matriksā, kā arī endoplazmatiskajā tīklā, bet citoplazmā enzīms nav atrodams (Ramsay & Zammit, 2004). KrAT mitohondrijos regulē attiecību starp acetil-koenzīmu A un brīvo koenzīmu A, novēršot brīvā koenzīma A rezervju samazināšanos intensīvas fiziskās slodzes laikā, kad vērojama acetil-koenzīma A pārprodukcija; kā arī nodrošina transacetilēšanos un acetil-koenzīma A atpakaļveidošanos fiziskās slodzes beigās, kad nepieciešams nodrošināt

Krebsa ciklu ar acetilgrupām (Stephens et al., 2007). Savukārt peroksisomās KrAT piedalās peroksisomālās taukskābju β -oksidācijas produktu transporta nodrošināšanā ārā no organellām (Westin et al., 2008). Pēdējā laikā aizvien vairāk pētījumu liecina par KrAT lomu glikozes metabolisma regulācijā, aktivējot piruvātdehidrogenāzi (PDH). Ievadot organismā papildus karnitīnu, KrAT katalizētās reakcijas ietekmē samazinās acetilkoenzīma A daudzums, kas savukārt kavē piruvātdehidrogenāzes kināzes darbību, un rezultātā tiek novērsta PDH inaktivēšana (Zammit et al., 2009). KrAT nozīmi šajā procesā pierāda arī atklājums, ka, pārekspresējot KrAT primārajos cilvēka skeleta muskuļu miocītos, palielinās glikozes uzņemšana šūnās, kā arī tiek novērsta lipīdu izraisītā glikozes oksidēšanas kavēšana (Noland et al., 2009).

1999. gadā klonēja cilvēka peroksisomās lokalizēto enzīmu KrOT un raksturoja tā kinētiskās īpašības un lomu sazaroto taukskābju β -oksidācijas nodrošināšanā (Ferdinandusse et al., 1999). Līdzīgi kā KrAT, arī KrOT piedalās peroksisomālās taukskābju β -oksidācijas produktu transporta nodrošināšanā ārā no organellām (Westin et al., 2008). Visaktīvāk enzīma KrOT ietekmē transesterifikācija notiek ar C4 līdz C12 saturošiem acilatlikumiem, bet, palielinoties oglekļa atomu skaitam virs 14, tā strauji samazinās (Farrell et al., 1984). Līdzīgi kā KPT I, bet atšķirīgi no KrAT un KPT II, KrOT satur malonil-koenzīma A jutīgo domēnu, kā rezultātā enzīms var tikt inhibēts malonil-koenzīma A klātbūtnē (Morillas et al., 2000; Morillas et al., 2002).

KPT I ir vienīgā karnitīna aciltransferāze ar vairākiem izoenzīmiem - izoformām, kas dažādos audos atšķiras; ir aknu izoforma KPT IA, muskuļu izoforma KPT IB un smadzeņu izoforma KPT IC (Bonfont et al., 2004). Lai gan jau ilgstoši uzskatīja, ka sirdī ir KPT IA un IB izoformas, kas bija parādīts arī mRNS līmenī (McGarry & Brown, 1997; Cook et al., 2001), tomēr tikai relatīvi nesen pierādīja aknu izoformas klātbūtni kardiomiocītos proteīnu līmenī (Distler et al., 2009). KPT I atrodas mitohondriju ārējā membrānā un katalizē garo virkņu acilkarnitīnu veidošanos no atbilstošajiem acil-koenzīmiem A (Bonfont et al., 2004). KPT I katalizētajai reakcijai līdzīga aktivitāte ir novērota arī peroksisomās un endoplazmatiskajā retikulumā, tomēr līdzšinējos pētījumos pierādīta tikai KPT IC atrašanās ne tikai neironu mitohondrijos, bet arī endoplazmatiskajā retikulumā (Sierra et al., 2008), savukārt KPT IA gadījumā, tieši pretēji, ir pierādīts, ka enzīms netiek ekspresēts endoplazmatiskajā retikulumā (Broadway et al., 2003). KPT I 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

(McGarry & Brown, 1997; Ussher & Lopaschuk, 2009). Ir zināms, ka sirds un skeleta muskuļu KPT I jutība pret malonil-koenzīmu A ir daudz lielāka nekā KPT I enzīmam aknās (Bird & Saggerson, 1984). Tomēr badošanās laikā, samazinoties malonil-koenzīma A daudzumam, tikai aknu audos palielinās KPT I aktivitāte un attiecīgi garo virkņu taukskābju β -oksidācija un sekojoši ketoģenēze, bet sirds audos šādas izmaiņas nenovēro (Paulson et al., 1984; Bonnefont et al., 2004). Lietojot ar ogļhidrātiem bagātu uzturu, palielinās malonil-koenzīma A daudzums, tāpēc tiek nomākta KPT I aktivitāte aknās un stimulēta liponeoģenēze. Novēršot malonil-koenzīma A inhibējošo ietekmi uz KPT I, iespējams stimulēt *de novo* sintezēto taukskābju β -oksidāciju un aizkavēt šo taukskābju akumulēšanos triglicerīdu veidā, novēršot vai kavējot aknu steatozes rašanos (Akkaoui et al., 2009). Jaunākajos pētījumos atklāts, ka, lietojot ar taukiem bagātu uzturu, attīstās hiperleptīnēmija, kas savukārt samazina sirds KPT I jutīgumu pret malonil-koenzīmu A, stimulējot sirds enerģijas metabolismu; turklāt šāda ietekme ir gan akūtai, gan hroniskai hiperleptīnēmijai (Guzmán-Ruiz et al., 2010). Ir zināms, ka ar taukiem bagāts uzturs izraisa insulīna rezistenci, taču ir pētīts, ka, stimulējot no KPT I atkarīgo garo virkņu acilkoenzīmu A transportu mitohondrijos, iespējams novērst lipīdu izraisīto insulīna rezistences attīstību muskuļu audos (Bruce et al., 2009). Iepriekšminētie rezultāti liecina par KPT I regulācijas nozīmi ne tikai taukskābju, bet arī glikozes metabolisma procesos gan aknu, gan sirds un skeleta muskuļu audos.

KPT II atrodas uz mitohondriju iekšējās membrānas matriksa pusē un katalizē garo virkņu acilkarnitīnu transesterifikāciju un atbilstošo acilkoenzīmu A veidošanos (McGarry & Brown, 1997; Bonnefont et al., 2004). Atšķirībā no KPT I, enzīms KPT II nav jutīgs pret malonil-koenzīmu A (Murthy & Pande, 1990; Morillas et al., 2002). Līdzīgi kā pārējās aciltransferāzes, arī KPT II spēj nodrošināt transesterifikācijas reakcijas norisi abos virzienos. Tiek uzskatīts, ka šādā veidā enzīms var piedalīties potenciāli toksisko garo virkņu acilkoenzīmu A transportā ārā no mitohondrijiem (Ventura et al., 1998).

Karnitīna-acilkarnitīna translokāze (KAKT) nepieder pie karnitīna aciltransferāzēm, tomēr šim enzīmam ir svarīga loma garo virkņu taukskābju metabolismā, nodrošinot šo taukskābju karnitīna esteru transportu cauri mitohondriju iekšējai membrānai (Pande, 1975; Murthy & Pande, 1984). Jau vairāk nekā pirms 25 gadiem noskaidroja, ka KAKT nodrošina acilkarnitīnu transportu caur mitohondriju iekšējo membrānu ekvimolārā apmaiņā pret karnitīnu (Murthy & Pande, 1984). Vēlākos pētījumos noskaidroja, ka KAKT darbojas pēc tā saucamā „ping-pong” mehānisma (viena piesaistes vieta, kas pamīšus atrodas membrānas vienā vai otrā pusē), taču spēj nodrošināt arī uniportu (Palmieri, 1994).

Pētījumus par KAKT pārsvarā veic saistībā ar šī proteīna deficītu vai mutācijām un iespējām korigēt radušos metabolisma traucējumus (Rubio-Gozalbo et al., 2004). Ir pētījumi, kuros noskaidrots, ka D-karnitīnu saturošie taukskābju esteri inhibē taukskābju metabolismu, tieši kavējot KAKT darbību (Baillet et al., 2000), kā arī zināms, ka karnitīnam pēc struktūras līdzīgais mildronāts arī inhibē KAKT (Oppedisano et al., 2008). Iegūtie rezultāti liecina, ka taukskābju metabolismu iespējams regulēt, arī farmakoloģiski ietekmējot KAKT aktivitāti.

1.2. Karnitīna loma šūnu enerģijas metabolisma norisēs

1.2.1. Galvenie enerģijas avoti sirds šūnās

Enerģijas iegūšanai sirds šūnas izmanto gan taukskābes, gan ogļhidrātus, kā arī citus substrātus, kurus iespējams oksidēt. 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 adenozīna trifosfāta (ATF) veidā. Normālos apstākļos oksidatīvās fosforilēšanas ceļā sirds šūnas iegūst vairāk nekā 95% no nepieciešamā ATF daudzuma. 60-70% no kopējā ATF daudzuma sirds šūnas iegūst taukskābju metabolisma rezultātā, bet pārējo galvenokārt no glikozes un laktāta metabolisma (van der Vusse et al., 2000). Ir zināms, ka taukskābes spēj kavēt glikozes oksidāciju vairāk par glikozes spēju ietekmēt taukskābju metabolismu, tomēr visefektīvāk sirds darbojas, ja vienlaicīgi izmanto abus enerģijas substrātus (Taegtmeyer, 2000). Išēmijas apstākļos sirdī enerģētiski izdevīgāka būtu glikozes izmantošana (Beadle & Frenneaux, 2010). Taču, palielinoties taukskābju transportam un to koncentrācijai šūnā, būtiski tiek traucēta taukskābju oksidācija un glikozes metabolisms (Stanley et al., 2005; Wang & Lopaschuk, 2007). Neskatoties uz jau ievērojamiem sasniegumiem, metabolisma korekcijas iespējas joprojām nav pilnībā izzinātas un aktīvi turpinās pētījumi šajā virzienā.

1.2.2. Taukskābju metabolisms

Veselā sirdī normālos apstākļos 70–90% taukskābju, kas iekļūst šūnās, tiek pārvērstas par acilkarnitīniem un nekavējoties oksidētas, bet pārējie 10–30% papildina sirds triglicerīdu krājumus (Stanley et al., 2005; Lopaschuk et al., 2010). Taukskābju transportu kardiomiocītos nodrošina ar citoplazmatisko membrānu saistītais taukskābes saistošais proteīns (FABP_{pm}), kā arī transmembrānas taukskābju transportproteīni (FATP1 un mazākā mērā FATP6) un taukskābju translokāze (FAT/CD36); minimāli, bet

taukskābju transports notiek arī pasīvās difūzijas veidā un/vai ar līdz šim neatklātu transportproteīnu palīdzību (Chabowski et al., 2008; DiRusso et al., 2008; Glatz et al., 2010). Ir zināms, ka cilvēka skeleta muskuļos ilgstošas fiziskas slodzes rezultātā palielinās FAT/CD36 proteīna daudzums, bet nemainās FABP_{pm} daudzums, rezultātā palielinās taukskābju uzņemšana (Tunstall et al., 2002). Līdzīgs efekts vērojams kardiomiocītos insulīna ietekmē, kur tiek stimulēts taukskābju transports, jo palielinās FAT/CD36 proteīna ekspresija, bet neizmainās FABP_{pm} ekspresija; noskaidroja, ka insulīns stimulē FAT/CD36 ekspresijas izmaiņas caur fosfatidilinozitola-3-kināzes ceļu (Chabowski et al., 2004). Pēc nokļūšanas citoplazmā taukskābes ekvimolārā attiecībā saistās ar citoplazmatisko sirds FABP (H-FABP_c), kas nodrošina to transportu uz oksidācijas vai esterificēšanas vietām (Chabowski et al., 2008). H-FABP_c deficīts ir saistīts ar nopietniem taukskābju oksidācijas traucējumiem, taču vienlaikus tiek stimulēts glikozes metabolisms (Schaap et al., 1999; Binas et al., 1999). Vēlākos pētījumos, izmantojot cilvēka skeleta muskuļu audus, noskaidroja, ka FABP nodrošina LCFA sarkolemmālo transportu, bet tieši nepiedalās šo taukskābju transportā iekšā mitohondrijos; noskaidroja arī to, ka FABP_{pm} ir identisks proteīns mitohondrijos esošajai aspartāta aminotransferāzei, tomēr mitohondrijos tas LCFA transportu nenodrošina (Holloway et al., 2007).

Garu virkņu taukskābju aktivāciju veic atbilstošās acil-koenzīma A sintetāzes (ACSL 1,3-6), veidojot šo taukskābju esterus ar koenzīmu A; līdzīgi darbojas arī īso virkņu acil-koenzīma A sintetāzes (ACSS), vidēji garu virkņu (ACSM), kā arī ļoti garu virkņu acil-koenzīma A sintetāzes (Soupene & Kuypers, 2008). Radušies acil-koenzīmi A ir ūdenī šķīstoši, kā arī tiem piemīt spēcīgas detergentu īpašības, savukārt to uzkrāšanās var izraisīt aritmijas un sirds disfunkciju (Sharma & Black, 2009). Acil-koenzīms A tūlīt pēc rašanās saistās ar acil-koenzīmu A saistošo proteīnu (ACBP); saistība ar ACBP ir nepieciešama pilnvērtīgai taukskābju oksidācijas nodrošināšanai, jo ACBP, līdzīgi kā H-FABP_c, nodrošina iekšējās taukskābju transportu (Knudsen et al., 2000).

No acil-koenzīma A, piedaloties mitohondriju ārējās membrānas enzīmam KPT I, rodas atbilstošais acilkarnitīns, kas nokļūst telpā starp mitohondrija ārējo un iekšējo membrānu. Acilkarnitīnu transportu cauri mitohondrija iekšējai membrānai apmaiņā pret brīvo karnitīnu nodrošina KAKT. Savukārt mitohondrija matriksā ar KPT II līdzdalību atkal sintezē acil-koenzīmu A un atbrīvo karnitīnu. Ilgstoši uzskatīja, ka KPT I un KPT II, kā arī KAKT ir vienīgie proteīni, kas nodrošina LCFA transportu mitohondrijos, un KPT I ir LCFA transporta limitējošais enzīms. Tomēr 2004. gadā atklāja, ka žurku muskuļu mitohondriju membrānās atrodas arī FAT/CD36, pie tam sirds mitohondrijos apmēram

2 reizes vairāk nekā no skeleta muskuļiem izdalītajos mitohondrijos. Noskaidrots, ka mitohondriji spēj piesaistīt LCFA arī tad, ja nav karnitīna, tomēr transports šādos apstākļos nenotiek; savukārt FAT/CD36 inhibitora ietekmē par ~50% samazinājās KPT I aktivitāte, bet par gandrīz 90% – palmitāta oksidācija (Campbell et al., 2004). Pētījuma autori atklāja arī to, ka, imunoprecipitējot FAT/CD36 ar tikai tam specifiskām antivielām, izgulsnējas arī KPT I, liecinot, ka abi proteīni atrodas cieši blakus mitohondrija membrānā. Tomēr dažus gadus vēlāk, veicot pētījumus ar mitohondrijiem, kas izolēti no ģenētiski modificētām pelēm, kam nav FAT/CD36, atklāja, ka taukskābju oksidācija mitohondriju FAT/CD36 deficīta apstākļos nav traucēta; tiesa, arī šajā pētījumā noskaidroja, ka normālās pelēs FAT/CD36 daudzums sirds mitohondrijos ir apmēram 10 reizes lielāks nekā skeleta muskuļu mitohondrijos (King et al., 2007). Gadu pēc augstākminētā pētījuma publicēšanas tomēr pierādīja, ka arī mitohondriju FAT/CD36 deficīta gadījumā pelēs, līdzīgi kā iepriekš novērots žurku modelī, ir traucēta taukskābju oksidācija. Šī pētījuma ietvaros atklāja, ka rosiglitazona ietekmē palielinātā taukskābju oksidācija ir saistīta ar FAT/CD36 proteīna daudzuma pieaugumu, kamēr nemainās ne KPT I proteīna daudzums, ne aktivitāte (Benton et al., 2008).

Apkopojot pētījumu rezultātus, var secināt, ka taukskābju metabolisms ir cieši saistīts ar taukskābju un to metabolītu transportproteīnu darbību, kā arī ir skaidrs, ka ar karnitīnu saistītajiem taukskābju metabolisma enzīmiem ir raksturīgas lielas funkcionālās rezerves, kā arī kompensatoras aktivitātes un proteīna daudzuma izmaiņas.

1.2.3. Glikozes metabolisms

Normālos apstākļos veselā sirdī 60–90% acetil-koenzīma A rodas taukskābju β -oksidācijas rezultātā, bet pārējie 10–40% rodas piruvāta oksidācijas rezultātā; savukārt piruvāts rodas glikolīzes un laktāta oksidācijas rezultātā (Stanley et al., 2005). Glikozi šūnas iegūst, vai nu uzņemot ārpusšūnu glikozi, vai atbrīvojot to no šūnu glikogena rezervēm. Sirdī ir divi glikozes transportproteīni (GLUT) GLUT 1 un 4, no kuriem vairāk ir tieši GLUT 4. Insulīns stimulē glikozes uzņemšanu šūnā, veicinot GLUT 4 translokāciju no tā šūnas depo uz plazmatisko membrānu (Fischer et al., 1997). Kardiomiocītos glikozi fosforilē heksokināze un rodas glikozes 6-fosfāts, kas aizsāk glikolīzes reakciju norisi, kā rezultātā rodas divas piruvāta molekulas. Piruvāts tālāk tiek vai nu pārvērsts par laktātu enzīma laktātdehidrogenāzes ietekmē, vai arī nokļūst mitohondrijos, kur piruvātdehidrogenāzes (PDH) kompleksa enzīmu ietekmē notiek viens no svarīgākajiem

neatgriezeniskajiem soļiem ogļhidrātu metabolismā – piruvāta oksidatīva dekarboksilēšana un acetil-koenzīma A veidošanās.

PDH kompleksa aktivitāti ietekmē enzīmi PDH kināzes (PDHK), kas, fosforilējot PDH kompleksa piruvātdehidrogenāzes (E1) α apakšvienības specifiskus serīna atlikumus, inaktivē E1; savukārt, nodrošinot defosforilēšanu, PDH kompleksu aktivē PDH fosfatāzes (PDHF). PDHK un PDHF relatīvās aktivitātes izmaiņas nosaka līdzsvaru starp nepārtraukto fosforilēšanu un defosforilēšanu (Holness & Sugden, 2003). Sirdī atrodas trīs PDHK izoenzīmi (PDHK1, 2 un 4, kas ir visizplatītākā izoforma) un ir zināms, ka PDHK4 aktivē badošanās, diabēts, kā arī lipīdu daudzuma palielināšanās (Wu et al., 1998; Sugden et al., 2000). PDHK tieši aktivē PDH kompleksa reakciju produkti acetil-koenzīms A un reducētais nikotīnamīdadenīdinukleotīds (NADH^+), kā arī ATF, bet PDH kompleksa substrāts piruvāts, kā arī oksidētais NAD^+ , ADF un koenzīms A inhibē PDHK (Kerbey et al., 1976; Stanley et al., 2005). PDHF ir nepieciešama Mg^{2+} jonu klātbūtne, lai enzīmi būtu aktīvi, savukārt Ca^{2+} joni ievērojami stimulē PDHF1 izoenzīma aktivitāti (Roche et al., 2003).

Augstākminētie pētījumi apliecina, ka karnitīns PDH kompleksa aktivitātes regulēšanā piedalās ar KrAT palīdzību, jo enzīma katalizētajā reakcijā veidojas acetil-karnitīns, bet samazinās acetil-koenzīma A daudzums un palielinās brīvā koenzīma A daudzums, tādējādi kavējot PDHK aktivēšanu. Acetil-koenzīma A/koenzīma A attiecību un NADH^+/NAD attiecību iespējams regulēt arī, samazinot taukskābju oksidācijas ātrumu (Wang & Lopaschuk, 2007). Atsevišķos pētījumos parādīts, ka taukskābju β -oksidāciju kavē samazinātas karnitīna koncentrācijas, ko izsauc mildronāta terapija (Simkhovich et al., 1988; Spaniol et al., 2001). Samazināta taukskābju oksidācija var stimulēt glikolīzi caur glikozes-taukskābju jeb tā saucamo Randle ciklu (Randle et al., 1963; Sugden, 2007), jo, samazinoties taukskābju oksidācijai, samazinās citrāta daudzums citosolā, un tiek novērsta citrāta inhibējošā ietekme uz fosfofruktokināzi 1 un 2.

1.2.4. Enerģijas metabolisma izmaiņas skābekļa bada apstākļos, karnitīna deficīts

Atšķirībā no normoksijas, kad vairāk nekā 90% ATF rodas aerobās oksidācijas ceļā, skābekļa deficīta jeb išēmijas apstākļos galvenais enerģijas iegūšanas avots ir anaerobā glikolīze, jo oksidatīvā fosforilēšana praktiski nenotiek, bet kopumā ATF veidošanās samazinās. Išēmijas apstākļos palielinās brīvo taukskābju daudzums, tomēr uzskata, ka tas ir ne tik daudz β -oksidācijas samazināšanās dēļ, bet vairāk lipīdu degradācijas dēļ

(Lopaschuk et al., 1994). Tiek stimulēta glikolīze, šūnās uzkrājas Ca^{2+} joni un samazinās K^+ jonu daudzums, bet, pieaugot acetil-koenzīma A un NADH^+ daudzumam mitohondrijos, ievērojami samazinās piruvāta oksidācija kavēta PDH kompleksa dēļ, tāpēc piruvāts tiek intensīvi pārvērsts par laktātu, kas var izraisīt šūnās acidozi (Stanley, 2004; Wang & Lopaschuk, 2007). Išēmijas un it īpaši reperfūzijas laikā, kā arī sirds mazspējas, karnitīna deficīta un diabēta apstākļos īpaša nozīme ir karnitīna un brīvā koenzīma A koncentrāciju izmaiņām, izraisot būtiskus enerģijas metabolisma traucējumus. Samazinoties karnitīna un brīvā koenzīma A daudzumam, tiek kavēta taukskābju un piruvāta oksidēšana, acetāta metabolisms Krebsa ciklā (Robitaille et al., 1993; Ramsay & Zammit, 2004; Stephens et al., 2007). Nesenā pētījumā noskaidroja, ka išēmijas izraisītie acetilkarnitīna veidošanās traucējumi un ar to saistītais brīvā koenzīma A trūkums saglabājas vismaz vienu stundu pēc reperfūzijas sākuma, kā arī joprojām ir būtiski traucēta Krebsa cikla reakciju norise (Jensen et al., 2009).

Enerģijas metabolismu būtiski iespaido arī karnitīna vai ar to saistīto enzīmu un transportproteīnu trūkums. Karnitīna deficītu nosacīti var iedalīt primārajā un sekundārajā deficītā; savukārt sekundārā deficīta gadījumā izšķir ģenētisko un iegūto karnitīna deficītu. Gan primārais, gan sekundārais ģenētiskais karnitīna deficīts tiek pārmantoti autosomāli recesīvā veidā.

Primārais karnitīna deficīts ir reti sastopams (1:37000 līdz 1:100000 jaundzimušo) un to izraisa funkcionēspējīga OCTN2 proteīna trūkums saistībā ar mutācijām to kodējošajā SLC22A5 gēnā (Koizumi et al., 1999; Longo et al., 2006). Pacientiem novēro pastiprinātu karnitīna izvadīšanu no organisma un praktiski neeksistējošu tā transportu, bet klīniskās izpausmes ir hipoketotiskā hipoglikēmiskā encefalopātija un vecākiem pacientiem arī kardiomiopātija; audos karnitīna koncentrācija var samazināties pat līdz 10% no normas, bet plazmā tā līmenis var būt zem noteikšanas robežas (Wang et al., 1999; Wang et al., 2000; Flanagan et al., 2010).

Sekundārā karnitīna deficīta gadījumā trūkst taukskābju oksidācijai nepieciešamie ar karnitīnu saistītie enzīmi; novēro karnitīna zudumu, ko izraisa nepietiekama tā uzņemšana ar uzturu, malabsorbija, peritoneālā un hemodialīze, acilkarnitīnu ekskrecija un atsevišķu medikamentu lietošana.

KPT I gadījumā cilvēka organismā ir zināms un aprakstīts tikai aknu izoformas jeb KPT IA deficīts ar apmēram 30 zināmām mutācijām (Rajakumar et al., 2009). KPT I deficīts parasti ir saistīts ar karnitīna koncentrācijas palielināšanos plazmā (Bonfont et al., 2004) un hipoglikēmiju, vieglu hiperamonijēmiju un palielinātu brīvo taukskābju

koncentrāciju (Longo et al., 2006). Lai gan bieži saslimšana norit asimptomātiski vai ar viegliem simptomiem, atsevišķos gadījumos ir reģistrēti arī nāves gadījumi, it sevišķi jaundzimušo vidū (Greenberg et al., 2009). Diskutabla ir KPT I muskuļu izoformas jeb KPT IB deficīta esamība cilvēkos, jo, lai gan agrākos pētījumos ir minēts KPT I deficīts muskuļos (DiMauro & DiMauro, 1973; Ross & Hoppel, 1987), pēdējā laikā tiek uzskatīts, ka tikai KPT IA deficīts ir sastopams cilvēkos, bet iepriekš aprakstītais KPT IB deficīts patiesībā ir bijis KPT II deficīts (Bonfont et al., 2004; Longo et al., 2006). To netieši apstiprina pētījums peļu modelī, ka homozigots KPT IB deficīts ir letāls embrionālajā periodā (Ji et al., 2008).

KPT II deficītu iedala pieaugušo, zīdaiņu un jaundzimušo formās, pie tam pēdējās divas parasti izpaužas ļoti smagi un bieži ir saistītas ar pacientu nāvi (Bonfont et al., 2004). Simptomi parasti ir saistīti ar muskuļu sāpēm, stīvumu, vājumu, raksturīga ir mioglobīnūrija, atsevišķos gadījumos rbdomiolīze (Roe et al., 2008; Bonfont et al., 2010). Slimības paasinājumi pieaugušajiem parasti saistīti ar badošanos, fizisku slodzi vai citām saslimšanām (Longo et al., 2006). Zīdaiņu KPT II deficīta formas gadījumā novēro aknu mazspēju, hipoketotisko hipoglikēmiju, hipertrofēto vai dilatēto sirds mazspēju un aritmijas, bet slimības paasināšanās tiek saistīta ar badošanos vai drudzi. Nāves gadījumi parasti saistīti ar sirds ritma traucējumiem vai Reija sindromu un biežāk sastopami homozigotiem nēsātājiem (Bonfont et al., 2004; Spiegel et al., 2007). Jaundzimušo KPT II deficīts ir vissmagākais un raksturojas ar ļoti smagām komplikācijām, kas bieži ir letālas. Pacientiem novēro hemorāģijas plaušās, kardio- un hepatomegāliju, steatozi aknās un sirdī, nieru displāziju u.c. bojājumus (Semba et al., 2008; Meir et al., 2009; Bouchireb et al., 2010). Vienlaicīgi ir parādīts, ka, savlaicīgi diagnosticējot un uzsākot terapiju, iespējams novērst komplikācijas un nodrošināt dzīvības funkcijas (Brucknerova et al., 2008).

KAKT deficīts visbiežāk ir jau jaundzimušajiem un tā gadījumā novēro krampjus, aritmijas, sirds un aknu mazspēju, neiroloģiskus traucējumus, acidūriju; bioķīmiski saslimšana raksturojas ar hipoglikēmiju, hipoketozi un hiperamonijēmiju, karnitīna koncentrācija pazeminās, bet acilkarnitīnu līmenis ievērojami palielinās (Longo et al., 2006; Pierre et al., 2007). KAKT deficīta gadījumā bieži ir nāves gadījumi, it īpaši tikko dzimušajiem (Rubio-Gozalbo et al., 2004; Lee et al., 2007).

Iegūtais karnitīna deficīts visbiežāk ir saistīts ar hemodialīzes veikšanu (Calvani et al., 2004; Fornasini et al., 2007), kā arī to izraisa pivalātu saturošu zāļu (Brass, 2002; Nakajima et al., 2010) un valproāta preparātu lietošana (Lheureux et al., 2005; Lheureux &

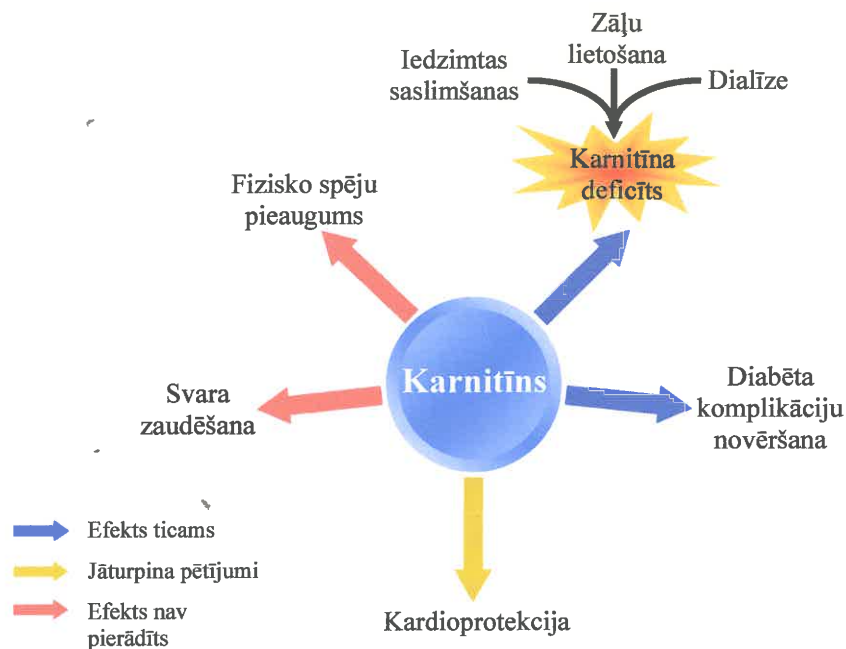
Hantson, 2009; Hamed & Abdella, 2009). Klīnikā iegūtā deficīta gadījumā visbiežāk nenovēro tik smagus simptomus kā primārā un ģenētiski pārmantotā karnitīna deficīta apstākļos, tomēr smagākos gadījumos var būt muskuļu vājums, vispārējs nogurums, sirds mazspēja, anēmija un dislipidēmija (Calvani et al., 2004; Hothi et al., 2006); vairumā gadījumu karnitīna lietošana spēj efektīvi novērst ar iegūto deficītu saistītos simptomus (Calvani et al., 2004; Flanagan et al., 2010). Interesanti rezultāti par karnitīna nepietiekamību iegūti nesen veiktā pētījumā: izmantojot žurku modeli, noskaidroja, ka nosacīts karnitīna deficīts muskuļos attīstās novecojot un deficītu ievērojami pastiprina taukiem bagāts uzturs, izraisot glikozes metabolisma traucējumus un mitohondriju metabolisma disregulāciju; savukārt karnitīna terapija būtiski uzlaboja gan mitohondriju enerģijas metabolismu, gan glikozes toleranci un jutību pret insulīnu, tuvinot tos kontroles dzīvniekos novērotajam (Noland et al., 2009).

1.3. Karnitīna sistēmas farmakoloģiska regulācija

1.3.1. Karnitīns klīnikā un eksperimentālos modeļos

Karnitīna papildus uzņemšana mūsdienās ir aktuāls, bet neviennozīmīgi vērtēts jautājums. Pamatota ir karnitīna lietošana gan ģenētiski pārmantotā, gan iegūtā deficīta gadījumos, kas ir saistīti ar iedzimtām saslimšanām (karnitīna transportproteīnu un/vai karnitīna aciltransferāžu deficīti), zāļu lietošanu (piemēram, valproskābes preparāti – epilepsijas ārstēšanai) vai hemodialīzes rezultāts nieru mazspējas slimniekiem (Lheureux et al., 2005; Fornasini et al., 2007; Flanagan et al., 2010).

Karnitīna deficītu bieži saista ar kardiovaskulāro komplikāciju attīstības risku, kā arī atsevišķas kardiovaskulārās saslimšanas izraisa karnitīna koncentrācijas pazemināšanos. Piemēram, eksperimentāli ir konstatēts, ka išēmijas laikā sirds zaudē apmēram 30% no karnitīna daudzuma, bet karnitīna pievadīšana šo zudumu efektīvi novērš (Löster, 2005). Pētījumos ir atrasts, ka ilgstoša karnitīna terapija ir kardioprotektīva kā dzīvnieku modeļos, tā arī klīnikā, ārstējot sirds slimniekus (Ferrari et al., 2004), tomēr 1995. gadā publicētie CEDIM pētījuma rezultāti liecina, ka karnitīna terapija, lai gan novērsa sirds kreisā kambara dilatācijas attīstību pēc akūta miokarda infarkta (AMI), tomēr kopējo mirstību ticami samazināt nespēja (Iliceto et al., 1995). Līdzīgus rezultātus ieguva CEDIM2 pētījumā, kad karnitīna terapija samazināja mirstību pirmajās piecās dienās pēc AMI, bet neietekmēja kopējo mirstību pēc 6 mēnešiem (Tarantini et al., 2006).



3. attēls. Karnitīna izmantošanas iespējas klīnikā.

Eksperimentāli noskaidrots, ka karnitīna terapija samazina nekrozes lielumu pēc paliekošas sirds kreisās koronārās artērijas oklūzijas, kā arī novērš išēmijas-reperfūzijas izraisīto oksidatīvo stresu (Mouhieddine & de Leiris, 1993; Schneider et al., 2005). Tajā pašā laikā zināms, ka karnitīna terapija nesamazina išēmijas-reperfūzijas izsauktā nekrotiskā bojājuma lielumu (Briet et al., 2008). Karnitīna akūtas terapijas efekti savukārt ir pretrunīgi. Kaut gan akūti karnitīns samazina išēmijas-reperfūzijas izsauktos bojājumus (Cui et al., 2003), tomēr apstākļos, kad nav iespējams stimulēt glikozes metabolisma norisi, karnitīna terapija var izraisīt pretējus efektus, proti, pastiprināt išēmijas radītos bojājumus (Diaz et al., 2008).

Karnitīnu kā terapeitisku līdzekli izmanto aptaukošanās un diabētisko komplikāciju gadījumā (Mingrone, 2004). Diabēts ir saistīts ar karnitīna koncentrācijas samazināšanos, jo zināms, ka 2. tipa diabēta slimniecēm ir par gandrīz 25% zemāks karnitīna līmenis nekā kontroles grupas sievietēm (Poorabbas et al., 2007). Klīniskos pētījumos noskaidrots, ka 2. tipa diabēta gadījumā karnitīna terapija samazināja gan zema blīvuma lipoproteīnu holesterola daudzumu, gan arī triglicerīdu un apolipoproteīnu A un B daudzumu (Malaguarnera et al., 2009). Žurku aptaukošanās modelī noskaidroja, ka karnitīns normalizē ar taukiem bagātās barības izraisītās lipīdu profila izmaiņas un uzlabo jutību pret insulīnu (Amin & Nagy, 2009). Tomēr citos pētījumos karnitīna terapija neietekmēja ne lipīdu profilu, ne arī jutību pret insulīnu (González-Ortiz et al., 2008). Vairākos pētījumos

pozitīvus efektus, mazinot diabēta un metabolā sindroma komplikācijas, ieguva, stimulējot KPT I darbību. Palielinot KPT IA aktivitāti žurkās ar aptaukošanos par apmēram 46%, taukskābju oksidācija palielinājās par 36%, bet triglicerīdu daudzums aknās samazinājās par 69% (Stefanovic-Racic et al., 2008). Līdzīgus rezultātus ieguva, palielinot KPT IB aktivitāti par apmēram 20% skeleta muskuļos žurkām, kuras baroja ar taukiem bagātu barību; KPT IB aktivitātes pieaugums izraisīja gan triglicerīdu daudzuma samazināšanos, kā arī mazināja taukiem bagātās barības izraisīto insulīna rezistenci (Bruce et al., 2009). Jāpiebilst, ka šajos pētījumos KPT I aktivitātes stimulācija nav saistīta ar karnitīna lietošanu, bet gan enzīma daudzuma palielināšanu, kas ir saprotams, ņemot vērā, ka karnitīna koncentrācija aknu un muskuļu audos jau tāpat ievērojami pārsniedz KPT IA un B K_m vērtības karnitīnam (attiecīgi ~ 30 un $\sim 500 \mu\text{M}$).

Lai gan populārajā literatūrā un internetā tiek propagandēta karnitīna lietošana svara zaudēšanai un/vai fizisko spēju uzlabošanai, zinātniskajā literatūrā sastopamā informācija par to neliecina. Pētījumos noskaidrots, ka karnitīna lietošana neveicina fizisko spēju uzlabošanos (Brass, 2004). Līdzīgi novērojumi par fizisko spēju uzlabošanos veikti arī pēdējā laikā, izmantojot karnitīna propilatvasinājumu saturošu uzturu bagātinātāju, kam būtu jānodrošina lielāka karnitīna biopieejamība (Smith et al., 2008; Bloomer et al., 2010). Līdzīgi pozitīva efekta trūkumu novēroja, izvērtējot karnitīna ietekmi uz svara zaudēšanu (Saper et al., 2004). Lai gan karnitīna lietošana nespēj samazināt svaru, interesanti rezultāti ir iegūti par KPT I aktivitātes ietekmi uz svara izmaiņām žurku modelī. Ir parādīts, ka samazināt barības uzņemšanu un svaru iespējams, kavējot KPT I aktivitāti hipotalāmā. Pētījuma autori izteikuši minējumu, ka palielināts taukskābju daudzums hipotalāmā kavē apetīti veicinošo gēnu ekspresiju un stimulē apetīti mazinošo gēnu ekspresiju (Mera et al., 2009).

1.3.2. Karnitīna sistēmas farmakoloģiska regulācija, izmantojot mildronātu

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. Tā, piemēram, darbojas oksfenicīns un etomoksīrs, kas kavē taukskābju oksidāciju, inhibējot KPT I, un pēc būtības līdzīgs darbības princips ir malonil-koenzīma A dekarboksilāzes inhibitoriem, kuri pasargā malonil-koenzīmu A no noārdīšanās un šādi tiek sasniegts KPT I kavējošais efekts. Sākotnējie pētījumi parādīja, ka arī karnitīna biosintēzes inhibitors mildronāts, samazinot

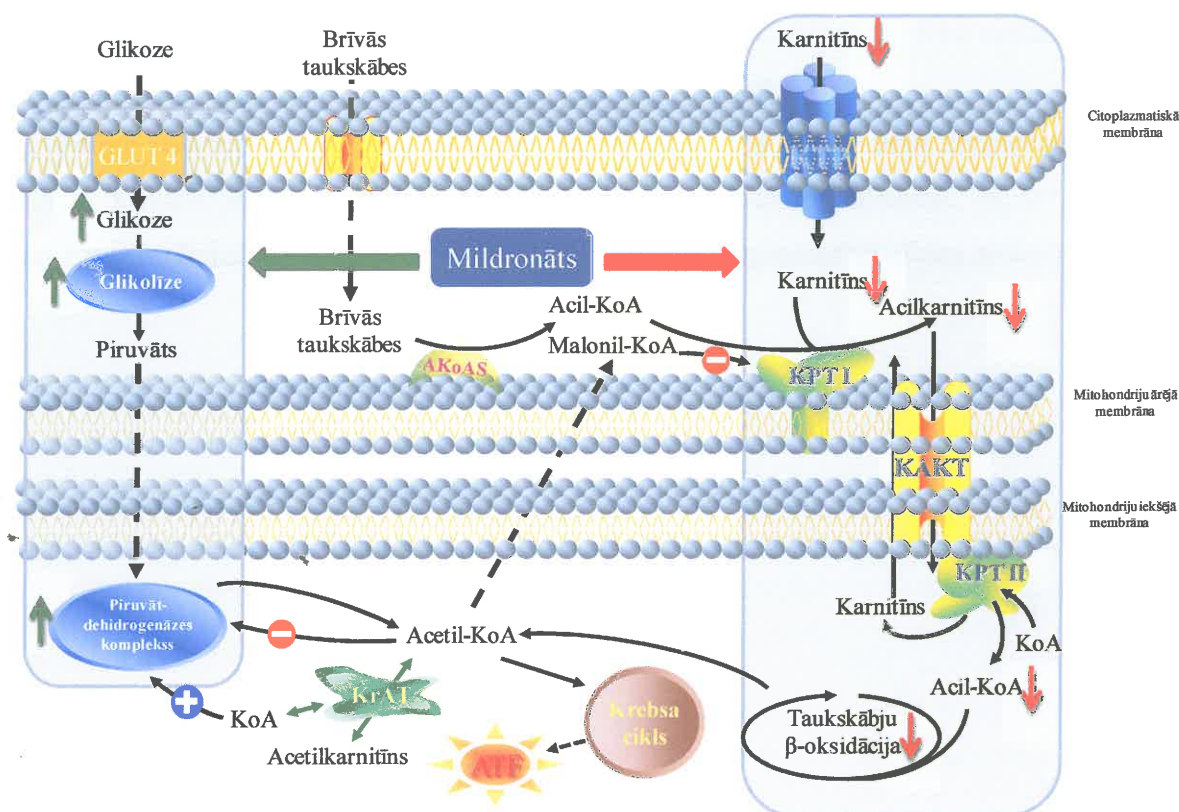
karnitīna un garo virkņu acilkarnitīnu koncentrāciju, kavē taukskābju oksidāciju (Simkhovich et al., 1988).

Noskaidrojot mildronāta ietekmi uz karnitīna biosintēzi, vienlaicīgi atklāja, ka, samazinoties karnitīna koncentrācijai mildronāta terapijas laikā, labāk atjaunojas sirds priekškambaru kontraktilitāte pēc išēmijas (Simkhovich et al., 1987). Izoproterenola izraisīto bojājumu gadījumā mazāk tiek inhibēta citohroma C oksidāze un reduktāze, kavējot elektronu transporta disfunkcijas attīstību (Hanaki et al., 1989), kā arī ATF un AMF līmenis sirdī išēmijas laikā samazinās mazāk (Ratunova et al., 1989). Noskaidroja, ka mildronāts tieši neinhibē KPT I, kā arī neietekmē jau radušos garo virkņu acilkarnitīnu oksidāciju (Shutenko et al., 1989). Mildronāta 10 dienu lietošanas ietekmē, neskatoties uz ievērojamo karnitīna koncentrācijas samazināšanos, aknās palielinājās ne tikai KPT I un acil-koenzīma A sintēzes aktivitāte, bet arī peroksisomālā taukskābju oksidācija (Tsoko et al., 1995; Tsoko et al., 1998). Pēc mildronāta 10 dienu ilgas lietošanas išēmijas modelī suņos no devas atkarīgā veidā tiek kavēta ATF, ADF un kreatīna fosfāta koncentrācijas samazināšanās un laktāta koncentrācijas palielināšanās (Kirimoto et al., 1996). Kardioprotektīva ietekme mildronāta izraisītajam karnitīna samazinājumam novērota arī jūrascūciņu izolētās sirds hipoksijas modelī, kur reperfūzijas laikā gan uzlabojās sirds kontraktilitāte, gan normalizējās diastoles beigu spiediens (Dhar et al., 1996). Pētījumi žurku sirds mazspējas modeļos parādījuši, ka mildronāta terapija mazina sirds kreisā kambara dilatāciju un uzlabo dzīvildzi pēc AMI (Hayashi et al., 2000a), kā arī kavē sirds kreisā kambara hipertrofijas attīstību un kreisā kambara beigu diastoliskā spiediena paaugstināšanos žurkās ar aortokavālo šuntu (Nakano et al., 1999). Pozitīvos efektus skaidroja ar to, ka karnitīna samazinājums, ko izraisījis mildronāts, novērš miokarda infarkta izsauktos traucējumus Ca^{2+} jonu uzņemšanā sarkoplazmatiskajā retikulumā un stimulē heksokināzes I aktivitāti (Hayashi et al., 2000b; Yonekura et al., 2000).

Tālākos pētījumos noskaidroja, ka mildronāts ir enzīma GBBH konkurējošs inhibitors (sākotnēji uzskatīja, ka mildronāts ir nekonkurējošs inhibitors), kā arī kavē karnitīna reabsorbciju nierēs, konkurējoši kavējot OCTN2 (Spaniol et al., 2001). Nesenos pētījumos noskaidrots, ka, lai gan mildronāts kavē OCTN2-atkarīgo karnitīna transportu, tieši ar šī transportproteīna palīdzību notiek mildronāta transports sirdī un citos audos (Grube et al., 2006; Grigat et al., 2009). Nesen arī pētīts, ka mildronāts, lai arī salīdzinoši vāji, bet tomēr kavē karnitīna-acilkarnitīna translokāzi mitohondrijos un arī tādā veidā var ietekmēt taukskābju metabolismu (Oppedisano et al., 2008). Virkne pētījumu liecina, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts ir saistīts ar karnitīna koncentrācijas samazinājumu

(Dambrova et al., 2002); tomēr pārsteidzošā kārtā žurku izolētās sirds modelī konstatēja, ka, lai gan mildronāta kardioprotektīvais efekts pakāpeniski attīstās 14 dienu laikā un ir saistīts ar vienlaicīgu, pakāpenisku karnitīna koncentrācijas samazināšanos sirds audos, tas nekorelē ar karnitīna pazeminājumu, bet gan ar tā biosintēzes prekursora GBB koncentrācijas pieaugumu (Liepinsh et al., 2006). Vienlaicīgi konstatēja arī mildronāta lietošanas kardioprotektīvo efektu žurku modelī *in vivo*; papildus noskaidrojot, ka mildronāts neietekmē hemodinamikas parametrus (Sesti et al., 2006).

Vairākos pētījumos ir novērtēta mildronāta terapijas izraisītās karnitīna koncentrācijas samazināšanās ietekme uz taukskābju un glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu aktivitātes un proteīna daudzuma, kā arī gēnu ekspresijas izmaiņām. Dodot žurkām mildronāta devu 800 mg/kg/dienā 10 dienas, konstatēja, ka, perfuzējot izolētu sirdi, nav traucēta ne taukskābju uzņemšana sirdī, ne šo taukskābju oksidācijas ātrums, tomēr gandrīz divas reizes ir palielināta to akumulēšanās triglicerīdu veidā. Viens no būtiskākajiem šī pētījuma atklājumiem bija tas, ka mildronāta terapijas rezultātā mitohondrijos par apmēram 60% palielinās karnitīna daudzums (Degrace et al., 2004). Dažus gadu vēlāk noskaidroja, ka mildronāta terapija samazina taukskābju oksidāciju aknās tikai badinātām žurkām, bet neietekmē to ēdušām (Degrace et al., 2007). Abos iepriekšminētajos pētījumos novēroja KPT I aktivitātes palielināšanos, kā arī palielinātu gēnu ekspresiju vairākiem taukskābju transportā iesaistītiem enzīmiem un proteīniem, piemēram, FAT/CD36, KPT IA un B. Nesenā pētījumā konstatēja, ka mildronāta izraisītais karnitīna pazeminājums stimulē ne tikai KPT IA un B, bet arī insulīna receptoru un piruvātdehidrogenāzes kompleksa pirmo divu enzīmu gēnu ekspresijas palielināšanos; vienlaicīgi novēroja arī insulīna stimulētās glikozes uzņemšanas palielināšanos, kā arī GLUT4, heksokināzes II un insulīna receptoru proteīna daudzuma pieaugumu (Liepinsh et al., 2008).



4. attēls. Mildronāta ietekme uz glikozes un taukskābju metabolismu. Zaļās bultiņas norāda uz stimulējošu ietekmi, bet sarkanās uz kavējošu ietekmi.

Pēdējā laika pētījumos noskaidroja, ka mildronāts samazina karnitīna koncentrāciju un vienlaicīgi aizkavē aterosklerotiskā aplikuma veidošanos aortā pelēm, kam trūkst apolipoproteīna E un zema blīvuma lipoproteīnu receptoru (Vilskersts et al., 2009). Mildronāta kardioprotektīvais efekts saglabājās arī 2. tipa diabēta *Goto-Kakizaki* žurku modelī, kur terapijas ietvaros žurkām samazinājās ne tikai infarkta lielums, bet samazinājās arī glikozes koncentrācija un normalizējās perifērās sāpju sajūtas uztvere (Liepinsh et al., 2009).

Atsevišķos pētījumos mildronāta lietošanas izraisīto karnitīna koncentrācijas pazeminājumu saista ar nopietniem metabolisma traucējumiem, izraisot aknu steatozi (Spaniol et al., 2001; Spaniol et al., 2003; Peschechera et al., 2005). Tiesa, izvērtējot šos pētījumus jāņem vērā, ka karnitīna koncentrācijas samazinājuma ietekme uz taukskābju metabolismu ir ļoti atkarīga no tā, vai pētāmie dzīvnieki ir ēduši vai badināti, kā arī tas, ka lipīdu uzkrāšanās aknās karnitīna trūkuma apstākļos ir pārejoša un izzūd pāris stundu laikā pēc barības uzņemšanas (Degrace et al., 2007). Jāņem vērā arī apstākļi, ka pētījumos, kur novēroti toksiski efekti, izmantots neskaidras izcelsmes 3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)-propionāts. Visticamāk tas varētu būt saistīts ar piemaisījumiem, ko var saturēt neattīrīts

3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)-propionāts (Hmelnickis et al., 2008). Minētie efekti nekad nav novēroti pētījumos, kur izmanto AS „Grindeks” ražoto mildronātu.

Izvērtējot visu iepriekšminēto, ir skaidrs, ka joprojām ir nepietiekamas zināšanas par karnitīna koncentrācijas samazinājuma ietekmi uz metabolisma procesiem, kā arī par karnitīna koncentrācijas samazinājuma lomu mildronāta kardioprotektīvā efekta attīstībai.

2. Materiāli un metodes

2.1. Dzīvnieki

Eksperimentiem izmantoja pieaugušus, 200–320 g smagus *Wistar* līnijas (Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Latvija) un *Dahl* sāls-jutīgās (DS) līnijas (*Charles River*, Vācija) žurku tēviņus. Eksperimenta laikā dzīvniekus turēja standarta sprostos pa 5 vienā sprostā standartizētos apstākļos (gaisa temperatūra 21–23 °C, 12 stundu gaismas/tumsas cikls) ar neierobežotu pieeju ūdenim un atbilstošajai barībai. Visas eksperimentālās procedūras veica saskaņā ar Eiropas Komisijas direktīvas 86/609/EEC vadlīnijām un saskaņoja ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi. Lai izvērtētu ilgstoši samazinātas karnitīna koncentrācijas efektus, mildronātu (*AS „Grindeks”*, Latvija) 100, 200 un 400 mg/kg vadīja perorāli *Wistar* žurkām. Kardioprotektīvā efekta izvērtēšanai L-karnitīnu (*Lonza*, Šveice) 100 mg/kg, mildronātu 100 mg/kg un abu vielu kombināciju 100 un 100 mg/kg vadīja perorāli *Wistar* žurkām. Antiaritmiskā efekta izvērtēšanai mildronātu 100 mg/kg, orotskābi (*AS „Grindeks”*, Latvija) 100 mg/kg un mildronāta orotātu (*AS „Grindeks”*, Latvija) 200 mg/kg *Wistar* žurkas saņēma kopā ar dzeramo ūdeni. *Dahl* sāls jutīgās žurkas L-karnitīnu 100 mg/kg, mildronātu 100 mg/kg un abu vielu kombināciju 100 un 100 mg/kg saņēma kopā ar dzeramo ūdeni.

2.2. *In vitro* metodes

Mēģenēs (1,5 ml) ar 50 µl heparīna šķīduma ņēma 0,5 ml žurku astes vēnas asins paraugus. Paraugus 10 minūtes +4 °C temperatūrā centrifugēja 1050 × g, lai atdalītu asins plazmu, kuru iesaldēja –80 °C temperatūrā tālākām analīzēm. Lai iegūtu aknu un sirds audus, dzīvniekus anestezēja (nātrija pentobarbitāls 60 mg/kg intraperitoneāli (i/p)) un sirdi un aknas izņēma un iesaldēja –20 °C temperatūrā līdz mērījumu veikšanai. RT-PCR paredzētos sirds audu gabaliņus iesaldēja šķidrajā slāpekļī un uzglabāja –80 °C temperatūrā līdz to izmantošanai.

2.2.1. Karnitīna, GBB un mildronāta noteikšana audos un plazmā

Mildronāta, GBB un karnitīna koncentrācijas noteikšanai plazmā, sirds un aknu audos izmantoja iepriekš iegūto un –80 °C temperatūrā iesaldēto plazmu, kā arī aknu un sirds audu homogenātus. Aknu un sirds audu gabaliņus homogenizēja ar attīrītu ūdeni (Milli-Q) masas tilpuma attiecībā 1:10, izmantojot *Cole Parmer* 130-Watt ultraskaņas

homogenizatoru. Homogenātu centrifugēja 10 minūtes $20000 \times g$ un virsnogulšņu šķīdumu izmantoja tālākai apstrādei. Plazmu un iegūtos homogenātus deproteinizēja ar acetonnitrila/metanola maisījumu, kas kā iekšējo standartu satur mildronātu. Deproteinizēto šķīdumu izmantoja UPLC/MS/MS analīzei. UPLC veica, izmantojot *Waters Acquity* UPLC sistēmu un *Waters Acquity* HILIC BEH 1,7 μm 2,1x100 mm kolonnu, savukārt MS/MS veica, izmantojot *Micromass* Quatro MicroTM tandēmmasspektrometru kā aprakstīts iepriekš (Dambrova et al., 2008). Karnitīna, GBB un mildronāta koncentrāciju noteica sadarbībā ar Dr. chem. O. Pugoviču un Dr. chem. S. Grīnbergu.

2.2.2. Bioķīmisko parametru mērījumi

2.2.2.1. Lipīdu profila, glikozes, laktāta, glikogena un aknu funkcionālo marķieru mērījumi plazmā un aknu un sirds homogenātos

Lipīdu profila un glikogena noteikšanai aknu un sirds audu gabaliņus homogenizēja ar ledus aukstu PBS (2,6 mM KCl, 136 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 un 1,75 mM KH_2PO_4), kas satur 1% Igepal CA 630, masas tilpuma attiecībā 1:10, izmantojot *Cole Parmer* 130-Watt ultraskaņas homogenizatoru. Homogenātu centrifugēja 10 minūtes $6000 \times g$ un virsnogulšņu šķīdumu izmantoja mērījumiem. Plazmas paraugus izmantoja brīvo taukskābju, triglicerīdu, LDL-C, HDL-C, glikozes, ketonvielu un laktāta koncentrācijas mērījumiem ar *Wako* un *Instrumentation Laboratory* (IL) noteikšanas reaģentu komplektiem atbilstoši ražotāja instrukcijām. IL noteikšanas reaģentu komplektus izmantoja arī, lai noteiktu taukskābju, triglicerīdu un glikogena koncentrācijas sirds un aknu audos. Asins plazmā ar IL noteikšanas reaģentu komplektiem noteica arī aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķierus: ALAT (alanīnaminotransferāze), ASAT (aspartātaminotransferāze), ALP (sārmainā fosfatāze) aktivitāti, kā arī kopējā bilirubīna daudzumu.

2.2.2.2. KrAT un KPT I aktivitātes un mitohondriju elpošanas mērījumi

KrAT aktivitāti noteica, gan izmantojot attīrītu baložu krūšu muskuļu enzīmu (*Sigma*, ASV), gan izolētos žurku sirds mitohondrijos. Mitohondrijus izolēja pēc iepriekš aprakstītas metodes (Wilcke et al., 1995), homogenizējot audus ar Ultra-Turrax *IKA* T10 homogenizatoru, ar otru lēnāko ātrumu; mērījumiem izmantoja mitohondriju smago frakciju. Reakcijas norises apstākļi bija sekojoši: DTNB (0,675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2,5 mM), acetil-koenzīms A (0,1 mM), karnitīns (0,0625 līdz 0,5 mM). Mildronātu (10 μM līdz 1 mM) lietoja, tikai pārbaudot tā mijiedarbību ar attīrīto KrAT. Izolētiem

mitohondrijiem karnitīnu papildus nepievienoja, lai varētu noteikt bazālās karnitīna koncentrācijas ietekmi uz enzīma aktivitāti.

KPT I aktivitāti noteica gan kopējā aknu un sirds audu homogenātā, gan arī izolētos mitohondrijos. Reakcijas norises apstākļi bija sekojoši: DTNB (0,675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2,5 mM), palmitoil-koenzīms A (0,05 mM); audu homogenātiem karnitīnu papildus nepievienoja, lai varētu noteikt bazālās karnitīna koncentrācijas ietekmi uz enzīma aktivitāti, bet izolētiem mitohondrijiem karnitīnu pievienoja atbilstoši tā koncentrācijai audos.

Reakcijas norisei sekoja ar $\mu\text{Quant}^{\text{TM}}$ platīšu spektrofotometru, reģistrējot absorbcijas izmaiņas laikā, izmantojot 412 nm viļņa garumu. KrAT un KPT I aktivitāti mitohondrijos izsaka kā koenzīma A daudzumu nmol, kas atbrīvojas 1 minūtē abu enzīmu katalizētās reakcijas laikā, rēķinot uz 1 mg mitohondriālā proteīna.

Elpošanas mērījumu veikšanai mitohondrijus izolēja no *Wistar* žurku sirds audiem saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Baliutyte et al., 2010). Audus homogenizēja ar izolēšanas buferšķīdumu A (180 mM KCl, 10 mM TRIS-hidrohlorīds, 1 mM EGTA, pH 7,7), visas darbības veicot 4 °C temperatūrā. Pēc izolēšanas mitohondrijus resuspendēja un uzglabāja izolēšanas buferšķīdumā B (180 mM KCl, 20 mM TRIS-hidrohlorīda, pH 7,35). Skābekļa patēriņu mērija elpošanas buferšķīdumā (150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM TRIS-hidrohlorīds, 5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) 37 °C temperatūrā. Elpošanas buferšķīdums saturēja 40 μM palmitoil-koenzīma A vai 36 μM palmitoil-karnitīna, lai noteiktu atbilstoši KPT I- vai KAKT-atkarīgo oksidāciju. Lai noteiktu piruvātdehidrogenāzes kompleksa aktivitāti un Krebsa cikla funkcionalitāti, elpošanas buferšķīdums saturēja 5 mM piruvāta un 5 mM malāta. Skābekļa patēriņu izteica ar skābekļa daudzumu nmol, ko izlieto 1 minūtē, rēķinot uz 1 mg mitohondriālā proteīna.

Mitohondriālā proteīna daudzumu standartizēja pret citrātsintāzes aktivitāti. Citrātsintāzes aktivitāti noteica saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Srere et al., 1963), ar $\mu\text{Quant}^{\text{TM}}$ platīšu spektrofotometru reģistrējot absorbcijas izmaiņas laikā, izmantojot 412 nm viļņa garumu.

2.2.2.3. Kvantitatīvā RT-PCR analīze

Kvantitatīvā KPT IA, KPT IB un sirds β-aktīna RNS kvantitatīvā RT-PCR analīze veikta, izmantojot komerciāli pieejamos reaģentus, kā aprakstīts to tehniskajā specifikācijā, izmantojot *Applied Biosystems* RT-PCR sistēmu, kā aprakstīts iepriekš (Liepinsh et al., 2008).

2.2.3. Molekulārās dinamikas skaitļošana mildronāta un KrAT mijiedarbības raksturošanai

Molekulārās dinamikas skaitļošanai par mildronāta saistīšanos KrAT aktīvajā centrā izmantoja MOE2007.09 programmnodrošinājumu (*Chemical Computing Group Inc.*, Kanāda). Par makromolekulas modeli skaitļošanai lietoja cilvēka KrAT kompleksa ar karnitīnu kristālstruktūru, kas iegūta 1,8 Å izšķirtspējā (Proteīnu datu bankas identifikators 1S5O (Govindasamy et al., 2004)). Molekulārās dinamikas skaitļošanai izmantoja AlphaPMI algoritmu un Affinity dG skaitļošanas funkciju (Bruno et al., 1997), bet, lai atrastu saistību vislabāk raksturojošo struktūru, iegūtās struktūras optimizēja ar CHARMM27 palīdzību (Goodford, 1985; Muegge & Martin, 1999). Molekulārās dinamikas skaitļošanu veica sadarbībā ar Dr. chem. Aleksandru Gutsaitu un Mg. chem. Kirilu Zinovjevu.

2.2.4. Histokīmiskie pētījumi

Audu griezumiem lietoja eksperimenta laikā iegūtos aknu paraugus. Tos sagrieza 8 µm biezus griezumus, fiksēja uz priekšmetstikliņiem ar 4% formaldehīda šķīdumu un krāsoja ar reagentu Oil Red O, lai noteiktu tauku infiltrāciju audos. Pēc krāsošanas paraugus fotografēja ar *Leica* DFC490 digitālo fotoaparātu. Fotografijas analizēja, izmantojot datorprogrammu Image-Pro Plus 4.5.1.

2.3. *Ex vivo* un *in vivo* metodes

2.3.1. Hemodinamikas parametri *in vivo*

2.3.1.1. Neinvazīvie hemodinamiskie mērījumi

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

2.3.1.2. Invazīvie hemodinamiskie mērījumi

Sirds-asinsvadu sistēmas funkcijas invazīvai novērtēšanai izmantoja *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu 60 mg/kg i/p pēc 4, 8 vai 12 nedēļām kopš terapijas uzsākšanas. Pēc narkozes iedarbošanās dzīvniekiem kanulēja labo kopējo karotīdo artēriju un kanulu savienoja ar *ADInstruments* spiediena sensoru MLT0380 un PowerLab 8/30 datu reģistrācijas sistēmu. Arteriālo spiedienu un EKG no otrā standartnovadījuma reģistrēja 30 minūtes. No iegūtajiem datiem aprēķināja: sirds ritmu, sistolisko un diastolisko asinsspiedienu. Datu apstrādei izmantoja LabChart 6 un Microsoft Excel programmas.

2.3.2. Langendorffa izolētās žurku sirds infarkta modelis

Infarktu eksperimentu veica saskaņā ar iepriekš aprakstīto procedūru (Liepinsh et al., 2006). Eksperimentam izmantoja *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg i/p), vienlaicīgi ievadot heparīnu 1 IU/g i/p. Žurku sirdis izņēma, skaloja ar ledus aukstu Krebsa-Henselaita (K-H) buferšķīdumu un kanulēja *ADInstruments* Langendorffa aparātos ML870B2 un ML880B50. Sirdis caur aortu retrogrādi perfuzēja konstantā perfūzijas spiedienā (60 mmHg) ar K-H buferšķīdumu (118 mM NaCl, 2,52 mM CaCl₂, 1,64 mM MgCl₂, 24,88 mM NaHCO₃, 1,18 mM KH₂PO₄, 10,0 mM glikoze un 0,05 mM EDTA; pH 7,4, 37 °C), kas piesātināts ar 95% O₂ + 5% CO₂. Sirds darbības parametrus (sirds ritmu, kreisā kambara saraušanās spēku, koronāro plūsmu, sirds kontraktilitāti) noteica, ievietojot sirds kreisajā kambarī ar šķidrumu pildītu baloniņu, kas savienots ar spiediena sensoru un PowerLab 8/30 datu reģistrācijas sistēmu. Sirdis 20 minūtes adaptēja un tad izraisīja miokarda infarktu, okludējot kreiso lejupejošo koronāro artēriju. Pēc 60 minūšu oklūzijas sekoja 150 minūšu ilga reperfūzija, kuras beigās sirdis krāsoja ar metilēnzilā šķīdumu un trifeniltetrazolija hlorīdu, lai nodalītu riska zonu un tajā iezīmētu nekrotiskos un dzīvos audus. Attēlus apstrādāja, izmantojot Image-Pro Plus programmu. Iegūtos rezultātus izmantoja, lai aprēķinātu nekrozes lielumu pret kopējo riska zonas lielumu. Kontroles vērtības pieņēma 100% un pārējos rezultātus attiecīgi pārrēķināja.

2.3.3. Izoproterenola inducētās išēmijas modelis un eksperimentālie žurku aritmiju modeļi

2.3.3.1. Izoproterenola inducētā išēmija

Eksperimentam izmantoja 200–250 g smagas *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg i/p). Lai ievadītu izoproterenolu, kanulēja kreiso femorālo vēnu. Izoproterenolu (10 µg/kg/min) ievadīja 5 minūtes un visu ievadīšanas laiku, izmantojot Chart 5.5 programmu, reģistrēja EKG no otrā standartnovadījuma, lai novērtētu ST segmenta pazeminājumu.

2.3.3.2. Išēmijas-reperfūzijas izraisītās aritmijas

Eksperimentam izmantoja 310–320 g smagas *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg i/p). Pēc traheotomijas veikšanas dzīvniekus ventilēja (15 ml/kg, 55 reizes minūtē) ar mazo grauzēju elpināmo aparātu (7025, *Ugo Basile*). Žurkām atvēra krūškurvi un ar 5/0 Surgipro II diegu cauršuja sirdi zem kreisās lejupejošās koronārās artērijas. Izmantojot Chart 5.5 programmu, reģistrēja EKG no otrā standartnovadījuma. Pēc 20 minūšu adaptācijas kreiso lejupejošo koronāro artēriju 10 minūtes okludēja, kam sekoja 30 minūšu reperfūzija. Tika novērtēta mirstība, aritmiju sākšanās laiks un laiks līdz normālam sirds ritmam, kreisā kambara tahikardija un fibrilāciju skaita biežums un ilgums.

2.3.3.3. Kalcija hlorīda izraisītās aritmijas

Eksperimentam izmantoja 240–250 g smagas *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg i/p). Lai ievadītu 10% kalcija hlorīda šķīdumu, kanulēja kreiso femorālo vēnu. Kalcija hlorīda šķīdumu ievadīja aritmogēnā devā (180 mg/kg) ar ātrumu 0,01 ml/s, un, izmantojot Chart 5.5 programmu, reģistrēja EKG no otrā standartnovadījuma gan ievadīšanas laikā, gan 10 minūtes pēc tam. Tika novērtēta mirstība, aritmiju sākšanās laiks un laiks līdz normālam sirds ritmam, kreisā kambara tahikardija un fibrilāciju skaita biežums un ilgums.

2.3.3.4. Akonitīna izraisītās aritmijas

Eksperimentam izmantoja 240–250 g smagas *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg i/p).). Lai ievadītu akonitīna šķīdumu, kanulēja kreiso femorālo vēnu un ievadīja akonitīnu devā 30 µg/kg. Izmantojot Chart 5.5 programmu, reģistrēja EKG no otrā standartnovadījumu. Tika novērtēta mirstība, aritmiju sākšanās

laiks un laiks līdz normālam sirds ritmam, kreisā kambara tahikardija un fibrilāciju skaita biežums un ilgums.

2.3.4. Sāls inducētās hipertensijas modelis *Dahl* žurkās

2.3.4.1. Izolēta aorta

DS žurku endoteliālo funkciju noteica izolētās aortās, izmantojot izolēto orgānu vanniņu pēc iepriekš aprakstītas metodes (Bartuš et al., 2008). No anestezētām žurkām izgriezta krūšu aortu un ievietoja ledus aukstā K-H šķīdumā. Pēc apkārtējo audu noņemšanas no aortas, to sagriezta 3 mm platos gredzenos; katru gredzenu ievietoja atsevišķā orgānu vanniņā un, izmantojot nerūsējošā tērauda stieplītes, piestiprināja izometriskajam spēka sensoram. Aortas gredzenus inkubēja 37 °C temperatūrā K-H šķīdumā, kas piesātināts ar 95% O₂ + 5% CO₂. Mērījumus reģistrēja, izmantojot Chart 6 programmu un PowerLab 8/30 datu reģistrācijas sistēmu.

2.3.4.2. Transtorakālā ehokardiogrāfija

Lai novērtētu DS žurku sirds anatomiju un funkciju, izmantoja iE33 ultrasonogrāfu (*Philips Ultrasound Inc.*, Nīderlande). Žurkas anestezēja ar ketamīna ksilazīna maisījumu (50 un 10 mg/kg i/p) un novietoja uz muguras mērījumu veikšanai. Sirds kreisā kambara mērījumus veica M-režīmā, nosakot kreisā kambara masu, kambaru starpsienas biezumu sistolē un diastolē, kreisā kambara mugurējās sienas biezumu sistolē un diastolē, kreisā kambara iekšējo diametru sistolē un diastolē, kreisā kambara izsviedes tilpumu un saraušanās spēju. Katrai žurkai mērījumus atkārtoja trīs reizes un izmantoja vidējo rezultātu.

2.4. Datu apstrādes statistiskās metodes

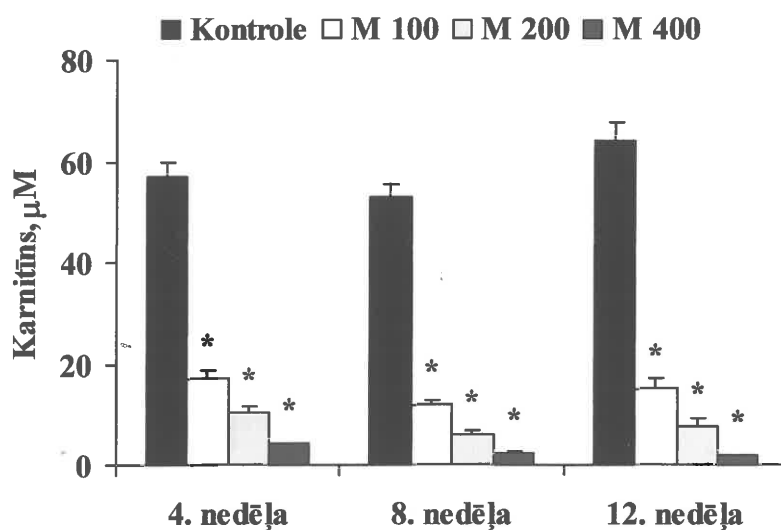
Datu apkopošanai un sistematizācijai lietoja vispārpieņemtās statistikas metodes, izmantojot programmas Microsoft Excel 2003 un GraphPad Prism 3.0 (*GraphPad Software Inc.*, ASV). Rezultātus uzskatīja par ticamiem, ja $p < 0,05$. Grupju salīdzināšanai lietoja Manna-Vitnija vai Stjudenta t-testu, vai atbilstošo dispersijas analīzes metodi ar sekojošu pēctestu (Bonferoni, Tukija tests), kas norādīti rezultātu apkopojuma tabulās vai grafikos. Dzīvildzes līknes DS žurkām ieguva, izmantojot Kaplana-Meiera metodi. Aritmiju biežuma starpību starp grupām analizēja, izmantojot hī kvadrāta (χ^2) testu.

3. Rezultāti

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

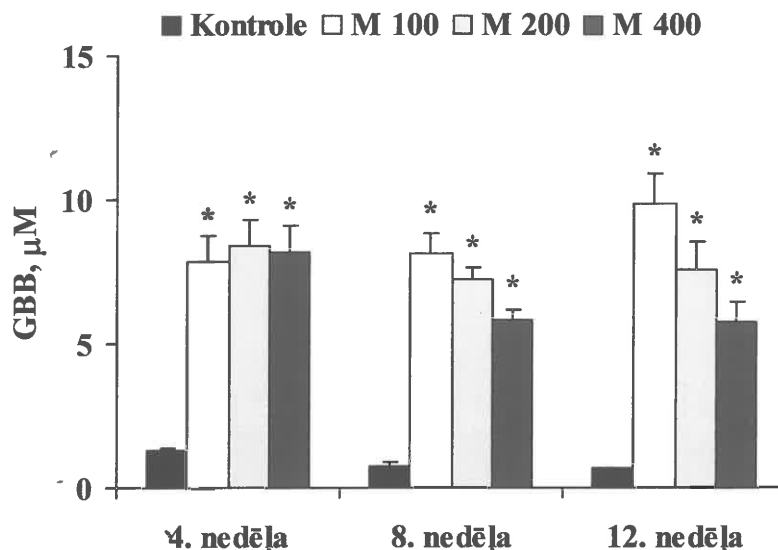
3.1.1. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme

Mildronāta 4, 8 un 12 nedēļu perorāla lietošana, ja devas ir 100 (M 100), 200 (M 200) un 400 mg/kg (M 400), atbilstoši samazināja karnitīna koncentrāciju *Wistar* žurku asins plazmā. Pēc 4 nedēļu mildronāta lietošanas karnitīna koncentrācija samazinājās attiecīgi 3, 5 un 13 reizes. Tikai mildronāta 400 mg/kg devas ievadīšana samazināja karnitīna koncentrāciju atkarībā no lietošanas ilguma; tā pēc 12 nedēļām karnitīna koncentrācija samazinājās 35 reizes (5. attēls).



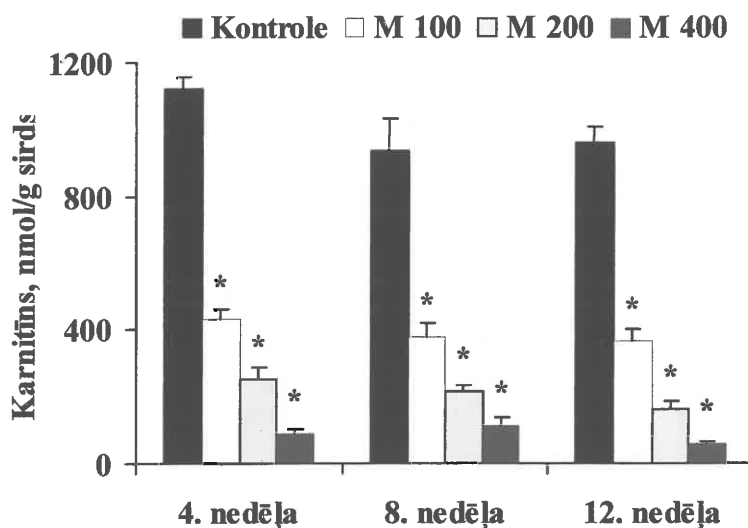
5. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz karnitīna koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku asins plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Mildronāta lietošana palielināja GBB koncentrāciju pat 14 reizes, tomēr šīs izmaiņas praktiski neietekmēja ne terapijas ilgums, ne deva (6. attēls).

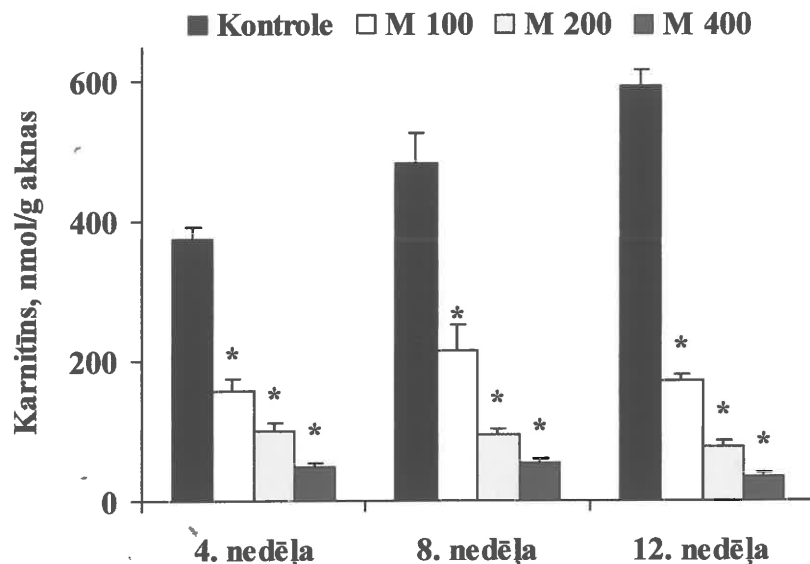


6. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz GBB koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku asins plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Līdzīgi asins plazmā novērotajam, arī *Wistar* žurku sirds un aknu audos ilgstoša mildronāta lietošana karnitīna koncentrāciju samazināja atkarībā no devas lieluma, bet lietošanas ilgums karnitīna koncentrācijas samazināšanos ietekmēja, ja mildronāta deva bija 200 mg/kg (7. un 8. attēls).

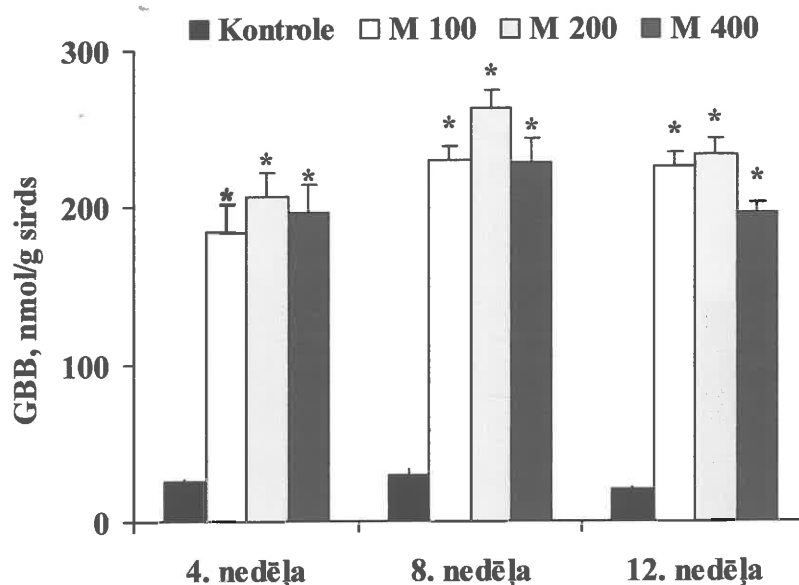


7. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz karnitīna koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

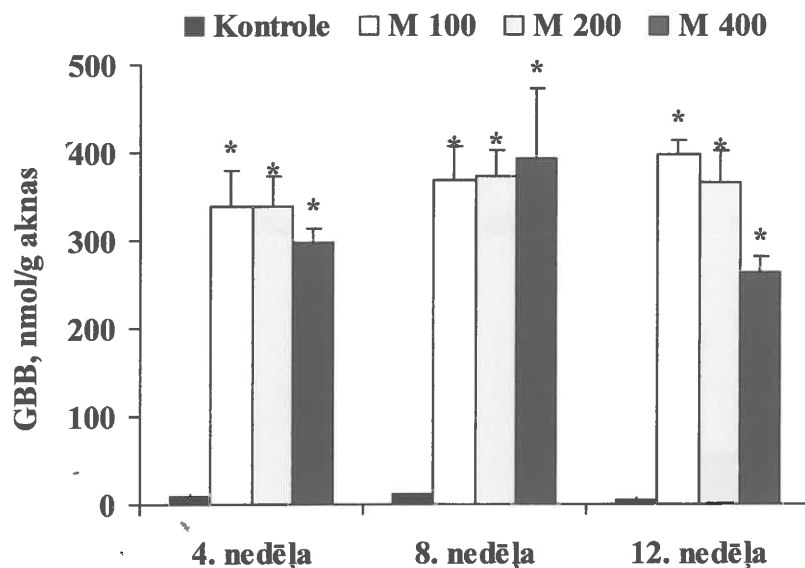


8. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz karnitīna koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku aknu audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Sirds audos GBB koncentrācija palielinājās līdz 10 reizēm (9. attēls), bet aknu audos pat līdz 66 reizēm (10. attēls); tomēr, līdzīgi kā asins plazmā, arī šīs izmaiņas nav atkarīgas ne no terapijas ilguma, ne devas.



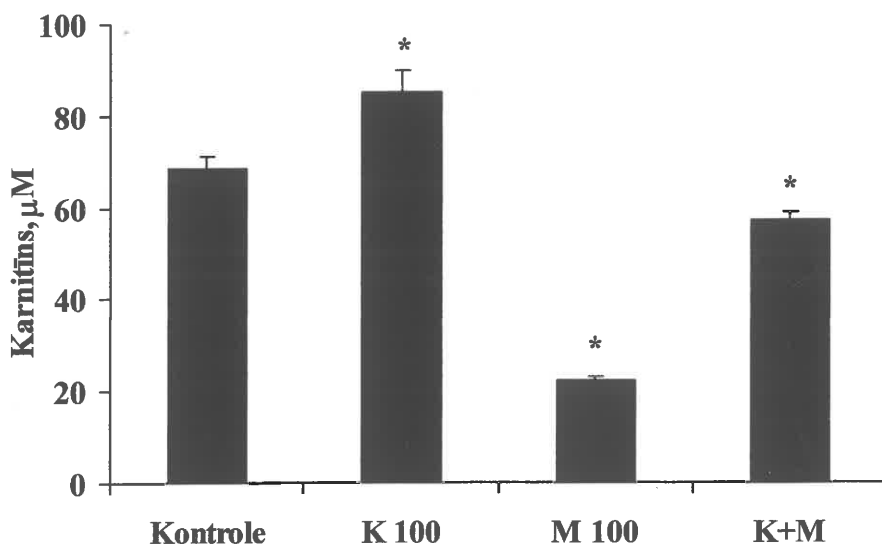
9. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz GBB koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).



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

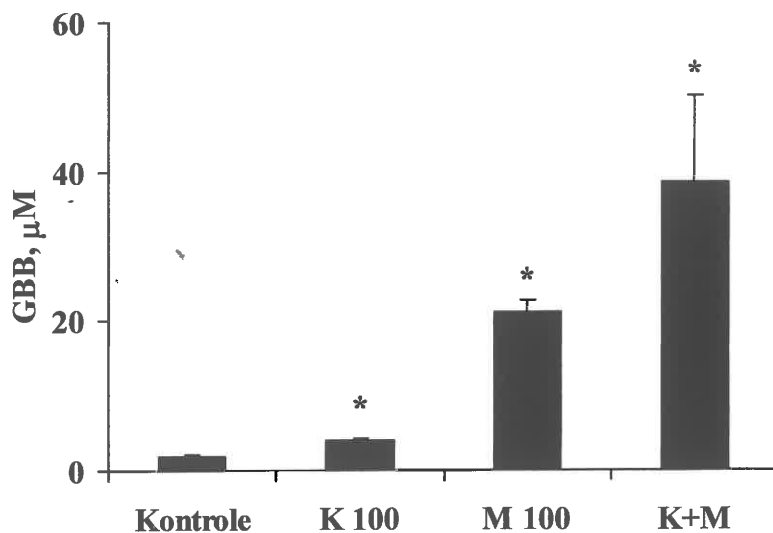
3.1.2. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekme

Iegūtie rezultāti par mildronāta (100 mg/kg, M 100), karnitīna (100 mg/kg, K 100) un to kombinācijas (100+100 mg/kg, K+M) 14 dienu perorālas lietošanas ietekmi uz karnitīna un GBB koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku plazmā parādīti 11. un 12. attēlā.

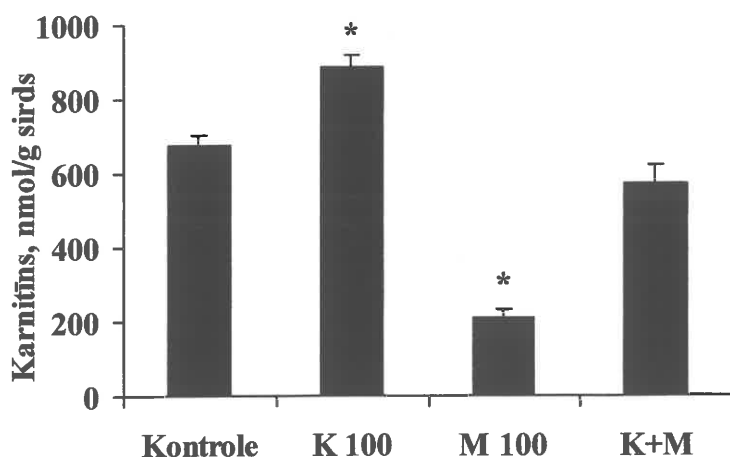


11. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz karnitīna koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku asins plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdentā t-tests, $p < 0,05$).

Karnitīna lietošana palielināja tā koncentrāciju asins plazmā par 24%, salīdzinot ar kontroli, bet mildronāta lietošana samazināja karnitīna koncentrāciju 3 reizes. Karnitīna vienlaicīga lietošana kopā ar mildronātu samazināja karnitīna līmeni plazmā tikai par 18%. Karnitīna lietošana GBB koncentrāciju asins plazmā palielināja tikai 2 reizes, bet mildronāta un kombinācijas lietošana – attiecīgi 10 un 20 reizes.



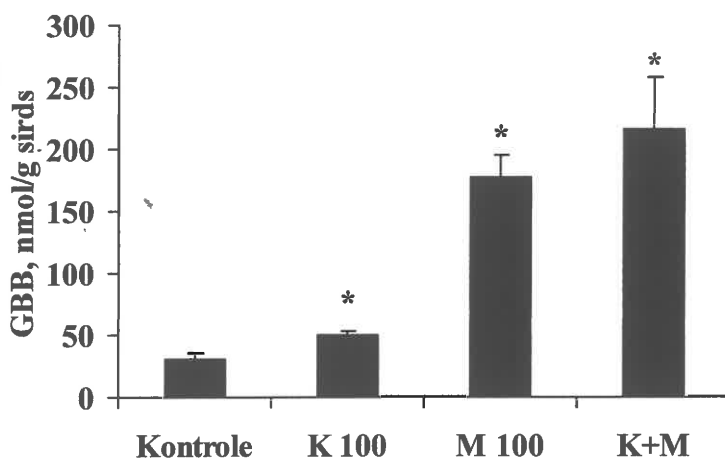
12. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz GBB koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku asins plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).



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

Sirds audos, līdzīgi kā asins plazmā, karnitīna lietošana tā koncentrāciju palielināja par 31%. Mildronāta lietošana karnitīna koncentrāciju sirdī pazemināja līdzīgi kā plazmā – 3 reizes, bet karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana karnitīna koncentrāciju neietekmēja (13. attēls).

Karnitīna lietošana GBB koncentrāciju sirds audos palielināja 2 reizes, bet mildronāta un kombinācijas lietošana – attiecīgi 6 un 7 reizes (14. attēls).

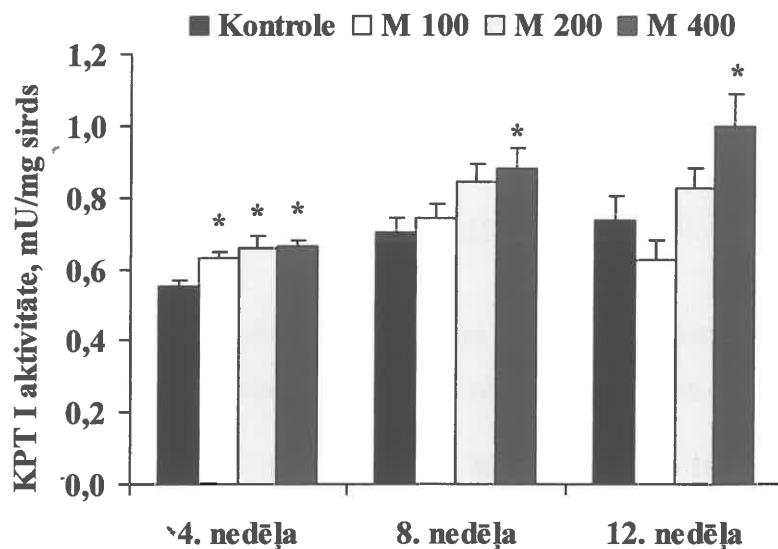


14. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz GBB koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdenta t-tests, $p < 0,05$).

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

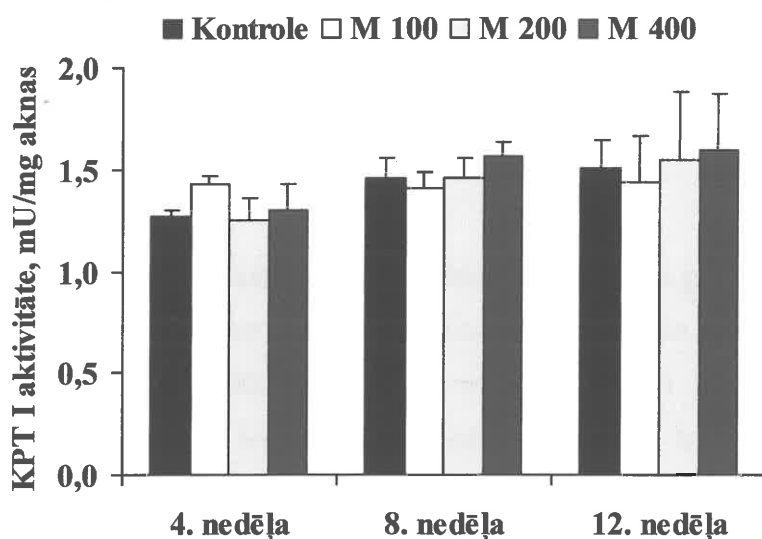
3.2.1. Ietekme uz KPT I aktivitāti

15. un 16. attēlā parādīta ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz KPT I aktivitāti *Wistar* žurku sirds un aknu audos. Enzīma bazālo (bez papildus karnitīna pievienošanas) aktivitāti noteica audu homogenātos pēc mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) 4, 8 un 12 nedēļu perorālas lietošanas. Sirds audos bazālā KPT I aktivitāte pēc 4 nedēļu mildronāta lietošanas palielinājās pat par 21%, salīdzinot ar kontroles grupu. Pēc 8 un 12 nedēļu mildronāta lietošanas, KPT I aktivitāte ticami palielinājās attiecīgi par 25% un 35% tikai tad, ja ievadīja mildronāta lielāko devu (15. attēls).



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

Aknu audu homogenātos pēc ilgstošas mildronāta lietošanas nav statistiski ticamu KPT I aktivitātes izmaiņu (16. attēls).



16. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz KPT I aktivitātes izmaiņām *Wistar* žurku aknu audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos \pm SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nenovēroja (Tukija tests).

3.2.2. Ietekme uz mitohondriju elpošanas aktivitāti

Elpošanas aktivitāti *Wistar* žurku izolētos sirds mitohondrijos noteica pēc mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 14 dienu perorālas lietošanas, kā substrātus izmantojot palmitoil-koenzīmu A, palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu. Mitohondriju elpošanas mērījumu rezultāti apkopoti 1. tabulā.

1. tabula

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

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

Mildronāts (M 100) un karnitīns (K 100) ievadīti perorāli katru dienu devā 100 mg/kg; kombinācijas grupā 100+100 mg/kg (K+M). Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos ±SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdenta t-tests, $p < 0,05$).

Mildronāta lietošana par 27% samazināja mitohondriju elpošanu ar palmitoil-koenzīmu A, bet neietekmēja elpošanu ar palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu. Mildronāta un karnitīna kombinācijas lietošana stimulēja mitohondriju elpošanu ar palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu.

3.2.3. Ietekme uz asins plazmas bioķīmiskajiem parametriem

Lipīdu profila izmaiņas *Wistar* žurku asins plazmā un glikozes koncentrāciju asinīs noteica pēc mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) 4, 8 un 12 nedēļu perorālas lietošanas. Paraugus mērījumiem ieguva gan no ēdušām, gan 24 h badinātām žurkām. 2. tabulā apkopoti rezultāti par bioķīmisko parametru izmaiņām ēdušās žurkās, bet 3. tabulā – par izmaiņām tām pašām žurkām pēc badināšanas. Mildronāta zemākās (100 un 200 mg/kg) devas ticami neizmainīja nevienu no mērītajiem parametriem pat pēc 12 nedēļu ilgas lietošanas. Glikozes koncentrācija ticami nemainījās mildronāta grupās, salīdzinot ar kontroli.

2. tabula

Karnitīna samazinājuma ietekme uz lipīdu profilu asins plazmā un glikozes koncentrāciju asinīs ēdušām *Wistar* žurkām

	Kontrole	M 100	M 200	M 400
4. nedēļa				
LDL-C, mg/dl	29.5±5.7	32.4±3.9	31.7±3.6	35.4±2.9
HDL-C, mg/dl	38.8±3.1	49.6±1.8	44.0±3.5	52.0±3.0*
FFA, mmol/l	1.35±0.34	0.84±0.20	0.81±0.23	0.53±0.08*
Triglicerīdi, mmol/l	1.67±0.41	0.98±0.20	1.03±0.12	0.96±0.14
β-hidroksibutirāts, mmol/l	0.24±0.04	0.32±0.10	0.25±0.08	0.20±0.03
Glikoze, mM	5.2±0.3	5.1±0.3	4.9±0.1	4.8±0.1
8. nedēļa				
LDL-C, mg/dl	29.7±3.7	33.2±3.4	32.6±2.7	28.8±4.6
HDL-C, mg/dl	34.1±3.1	30.7±3.7	35.5±2.0	44.6±2.5*
FFA, mmol/l	1.16±0.02	0.82±0.15	1.22±0.14	1.42±0.22
Triglicerīdi, mmol/l	1.15±0.15	1.01±0.12	1.12±0.15	1.22±0.18
β-hidroksibutirāts, mmol/l	0.31±0.10	0.28±0.07	0.30±0.08	0.20±0.04
Glikoze, mM	4.8±0.2	4.3±0.2	4.5±0.2	4.7±0.1
12. nedēļa				
LDL-C, mg/dl	15.6±1.3	17.6±1.2	15.6±1.2	17.9±1.4
HDL-C, mg/dl	32.2±2.1	34.5±2.0	34.1±3.0	36.8±1.6
FFA, mmol/l	0.84±0.21	0.58±0.09	0.71±0.13	1.07±0.32
Triglicerīdi, mmol/l	1.35±0.29	1.19±0.18	1.02±0.15	1.70±0.38
β-hidroksibutirāts, mmol/l	0.54±0.12	0.38±0.07	0.29±0.06	0.25±0.05*
Glikoze, mM	5.0±0.1	4.8±0.2	4.8±0.3	4.6±0.1

Mildronāts ievadīts perorāli katru dienu devās 100 (M 100), 200 (M 200), 400 (M 400) mg/kg 4, 8 vai 12 nedēļas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos ±SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Atsevišķas statistiski ticamas izmaiņas lipīdu profilā konstatēja žurkām, kas saņēma mildronāta 400 mg/kg devu. Ēdušām žurkām pēc 4 nedēļām ticami samazinājās FFA koncentrācija, bet palielinājās HDL-C koncentrācija (2. tabula). Badinātām žurkām samazinājās triglicerīdu un LDL-C koncentrācija (3. tabula). Ēdušām žurkām pēc 8 nedēļām palielinājās vienīgi HDL-C koncentrācija (2. tabula). Badinātām žurkām

samazinājās LDL-C koncentrācija un palielinājās FFA un triglicerīdu koncentrācija (3. tabula). Pēc 12 nedēļām vienīgās novērotās izmaiņas gan ēdušām (2. tabula), gan badinātām (3. tabula) žurkām bija β -hidroksibutirāta koncentrācijas samazināšanās.

3. tabula

Karnitīna samazinājuma ietekme uz lipīdu profilu asins plazmā un glikozes koncentrāciju asinīs badinātām *Wistar* žurkām

	Kontrole	M 100	M 200	M 400
4. nedēļa				
LDL-C, mg/dl	34.7±2.7	35.2±2.2	30.7±2.6	20.4±3.1*
HDL-C, mg/dl	40.7±3.3	33.9±2.1	39.8±3.6	42.2±4.5
FFA, mmol/l	0.94±0.05	1.03±0.04	0.97±0.07	1.07±0.05
Triglicerīdi, mmol/l	0.97±0.08	0.99±0.09	1.11±0.05	1.34±0.15*
β -hidroksibutirāts, mmol/l	0.98±0.20	1.12±0.14	0.73±0.13	0.55±0.14
Glikoze, mM	4.2±0.1	3.9±0.1	4.4±0.2	4.1±0.2
8. nedēļa				
LDL-C, mg/dl	39.0±2.7	42.2±2.1	39.3±3.2	24.7±2.9*
HDL-C, mg/dl	37.7±2.7	40.6±2.8	42.3±3.4	36.9±3.2
FFA, mmol/l	1.17±0.06	1.23±0.05	1.27±0.07	1.54±0.11*
Triglicerīdi, mmol/l	1.49±0.09	1.38±0.08	1.55±0.10	1.84±0.12*
β -hidroksibutirāts, mmol/l	0.73±0.09	0.78±0.14	0.72±0.07	0.47±0.11
Glikoze, mM	3.5±0.2	3.6±0.2	3.5±0.1	3.5±0.1
12. nedēļa				
LDL-C, mg/dl	15.3±1.1	14.6±0.9	13.6±0.8	11.8±0.4*
HDL-C, mg/dl	34.8±2.0	38.4±2.7	35.3±2.3	31.6±2.1
FFA, mmol/l	0.93±0.06	0.99±0.07	0.93±0.05	1.02±0.06
Triglicerīdi, mmol/l	0.99±0.14	1.04±0.12	1.33±0.12	1.32±0.09
β -hidroksibutirāts, mmol/l	0.72±0.03	0.67±0.09	0.57±0.06	0.37±0.06*
Glikoze, mM	3.7±0.1	3.4±0.2	3.7±0.1	3.8±0.2

Mildronāts ievadīts perorāli katru dienu devās 100 (M 100), 200 (M 200), 400 (M 400) mg/kg 4, 8 vai 12 nedēļas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

3.2.4. Ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem

Pētījuma rezultāti par ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem *Wistar* žurku asins plazmā pēc mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas 4, 8 un 12 nedēļu perorālas lietošanas apkopoti 4. tabulā. Mildronāta lietošana neietekmēja kopējā bilirubīna daudzumu un ALAT aktivitāti. ASAT un sārmainās fosfatāzes (ALP) aktivitāte minimāli palielinājās tikai pēc 12 nedēļām, lietojot mildronāta devu 400 mg/kg. ALP aktivitāte minimāli palielinājās arī pēc 8 nedēļām, lietojot mildronāta devu 100 mg/kg.

4. tabula

Karnitīna samazinājuma ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem

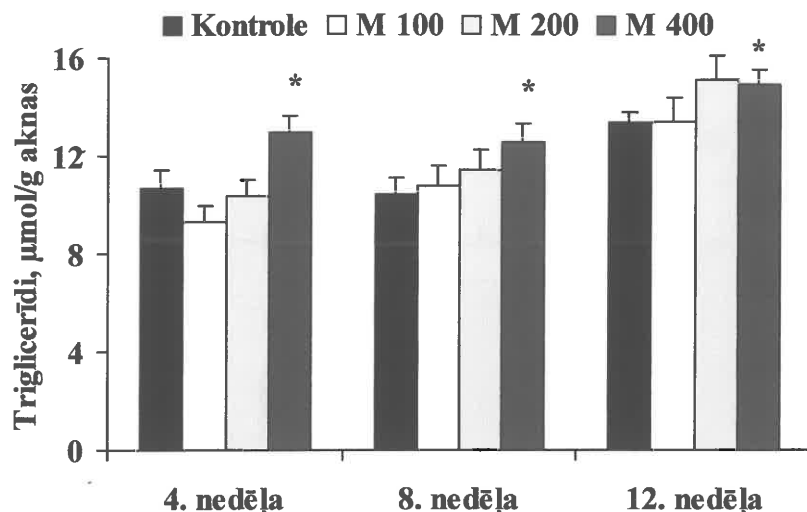
Wistar žurku asins plazmā

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

Mildronāts ievadīts perorāli katru dienu devās 100 (M100), 200 (M 200), 400 (M 400) mg/kg 4, 8 vai 12 nedēļas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8-10 dzīvniekos ±SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

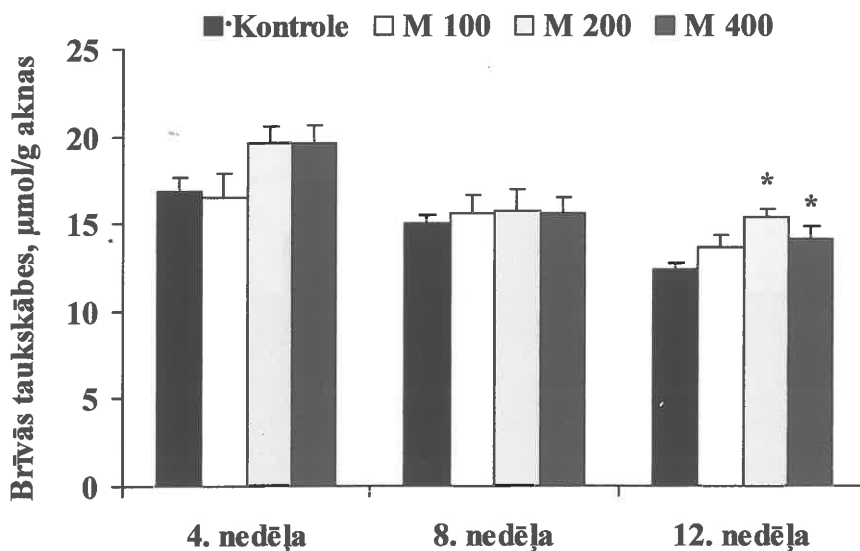
3.2.5. Ietekme uz lipīdu profilu un glikogena saturu aknu audos

Triglicerīdu koncentrācija aknu audos ticami palielinājās attiecīgi par 21%, 20% un 12% pēc 4, 8 un 12 nedēļām tikai tām žurkām, kas saņēma lielāko mildronāta devu 400 mg/kg (17. attēls).



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

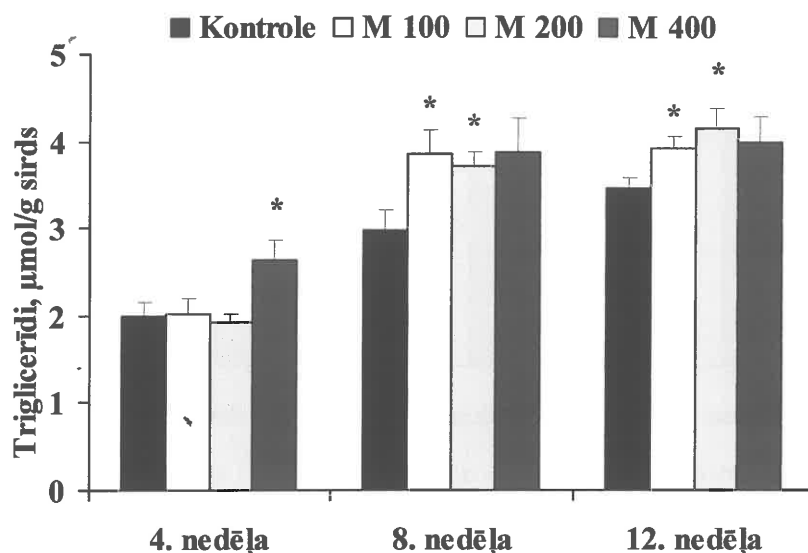
Taukskābju koncentrācija aknu audos ticami palielinājās pēc 12 nedēļām tikai tām žurkām, kas saņēma mildronāta 200 un 400 mg/kg devas (18. attēls).



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

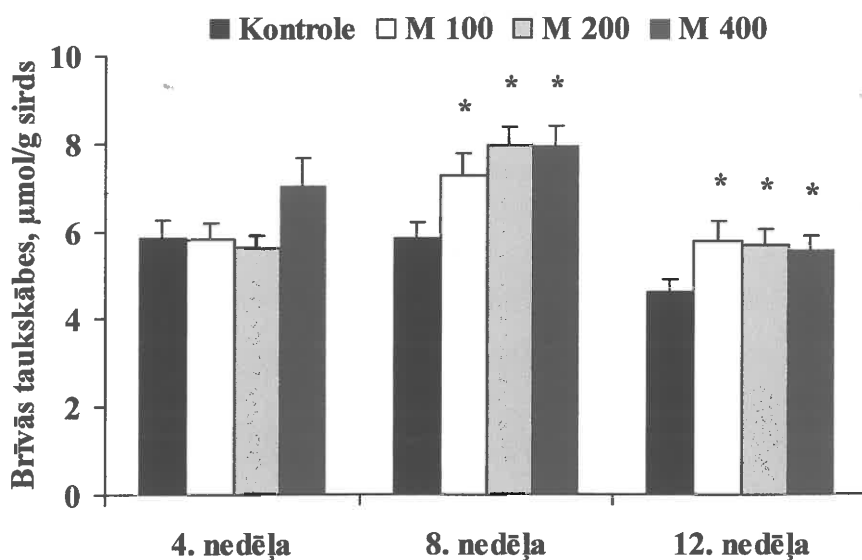
Pēc 4 nedēļām sirds audos triglicerīdu koncentrācija ticami palielinājās žurkām, kas lietoja mildronātu 400 mg/kg, bet pēc 8 un 12 nedēļām ticami palielinājās tikai tām žurkām, kas saņēma mildronātu 100 un 200 mg/kg. Taukskābju koncentrācija sirds audos

ticami palielinājās pēc 8 un 12 nedēļu ilgas mildronāta lietošanas neatkarīgi no tā devas (20. attēls).



19. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz triglicerīdu koncentrāciju *Wistar* žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM.

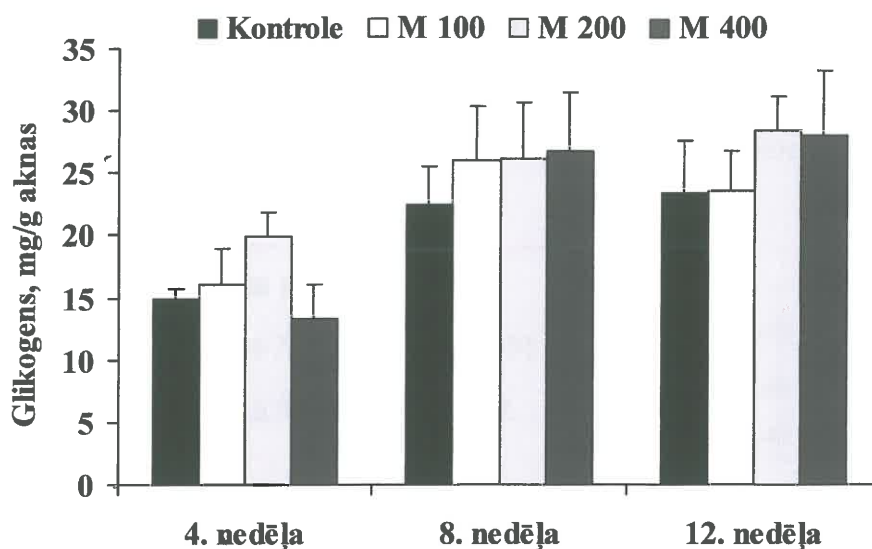
* statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).



20. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz taukskābju koncentrāciju *Wistar* žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM.

* statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

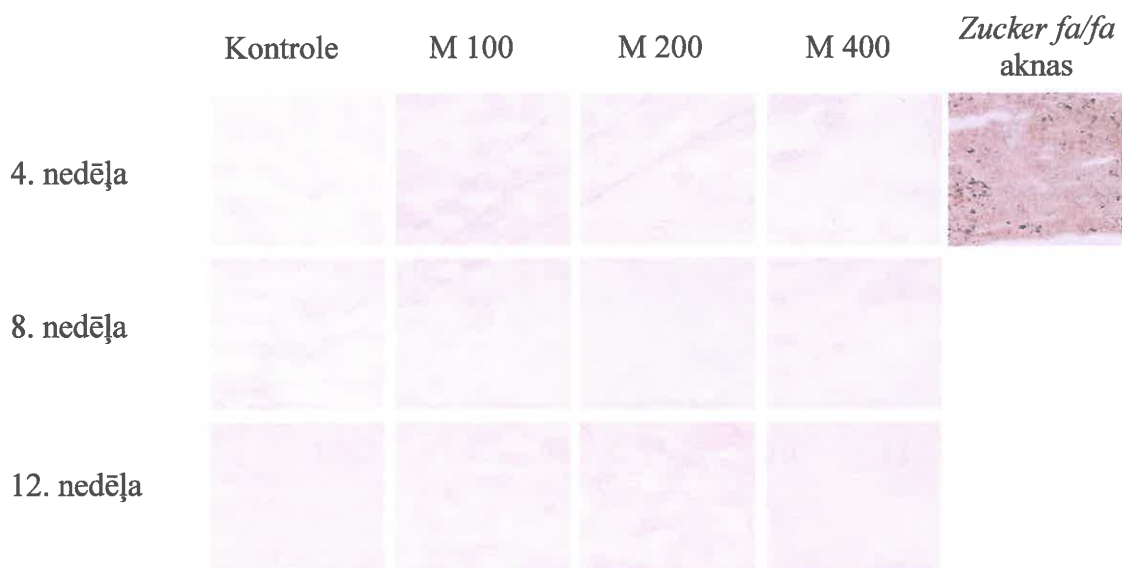
Mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) 4, 8 un 12 nedēļu perorāla lietošana neietekmēja glikogena saturu *Wistar* žurku aknu audos (21. attēls).



21. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz glikogena saturu *Wistar* žurku aknu audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nenovēroja (Tukija tests).

3.2.6. Aknu griezumu histokīmiskā analīze

Lai pārbaudītu, vai ilgstoši pazemināta karnitīna koncentrācija izraisa lipīdu uzkrāšanos aknu audos, veica aknu audu griezumu histokīmisko analīzi. Mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) 4, 8 un 12 nedēļu perorāla lietošana neizraisīja lipīdu infiltrāciju ēdušu žurku aknās (22. attēls). Salīdzinājumam pievienota fotogrāfija, kur redzams, kā izskatās lipīdu infiltrācija (tumši sarkanbrūnie laukumiņi) *Zucker fa/fa* žurkas aknu audos (trūkst leptīna receptori un attīstās aptaukošanās).

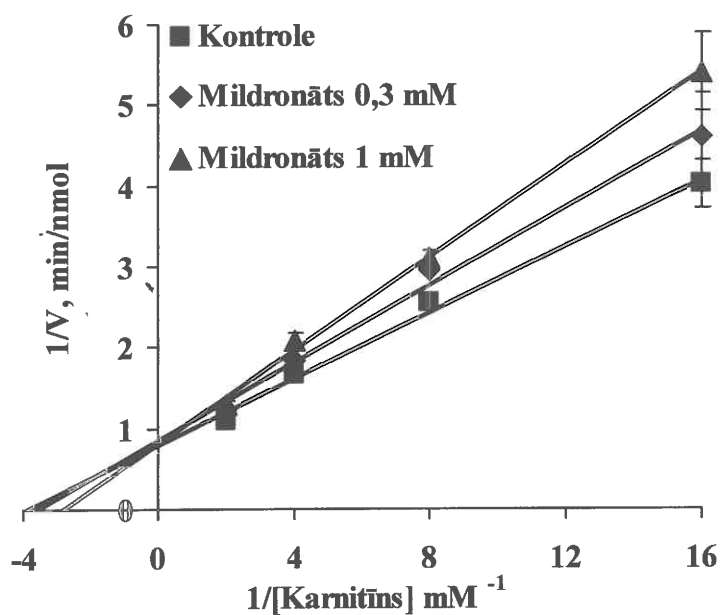


22. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz lipīdu infiltrāciju *Wistar* žurku aknu audos. Attēloti griezumu fotogrāfiju piemēri no katras eksperimentālās grupas.

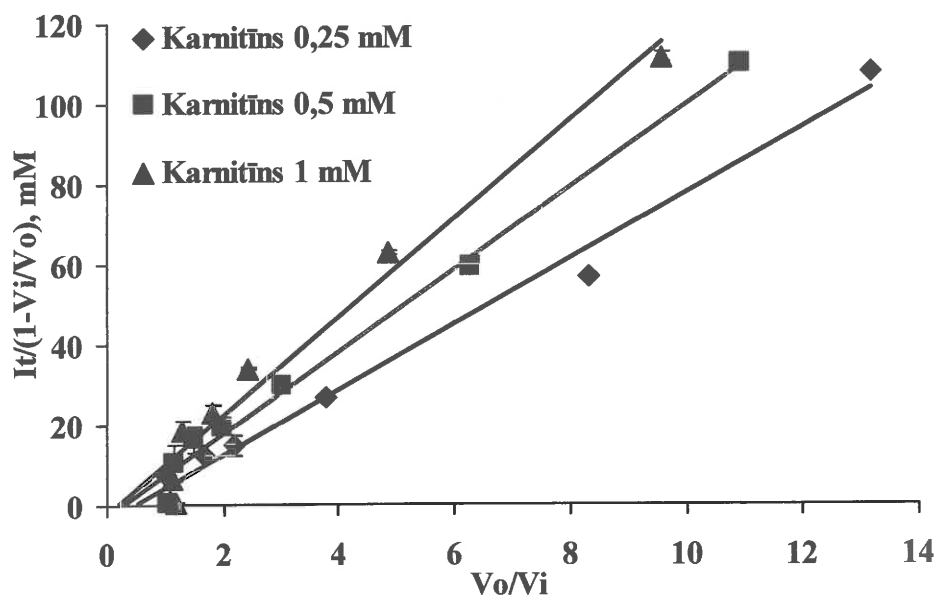
3.3. Mildronāta ietekme uz KrAT

3.3.1. Ietekme uz KrAT aktivitāti *in vitro*

Mildronāta un KrAT mijiedarbības noskaidrošanai *in vitro* izmantoja attīrītu enzīmu (*Columba sp.*).

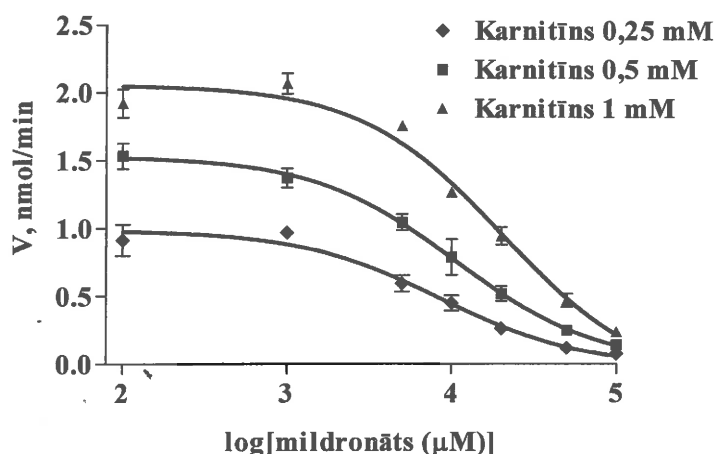


23. attēls. Linevēvera-Burka kinētikas shēma, kas raksturo mildronāta mijiedarbību ar KrAT. Katrs punkts ir vidējais no 3 mērījumiem \pm SEM.



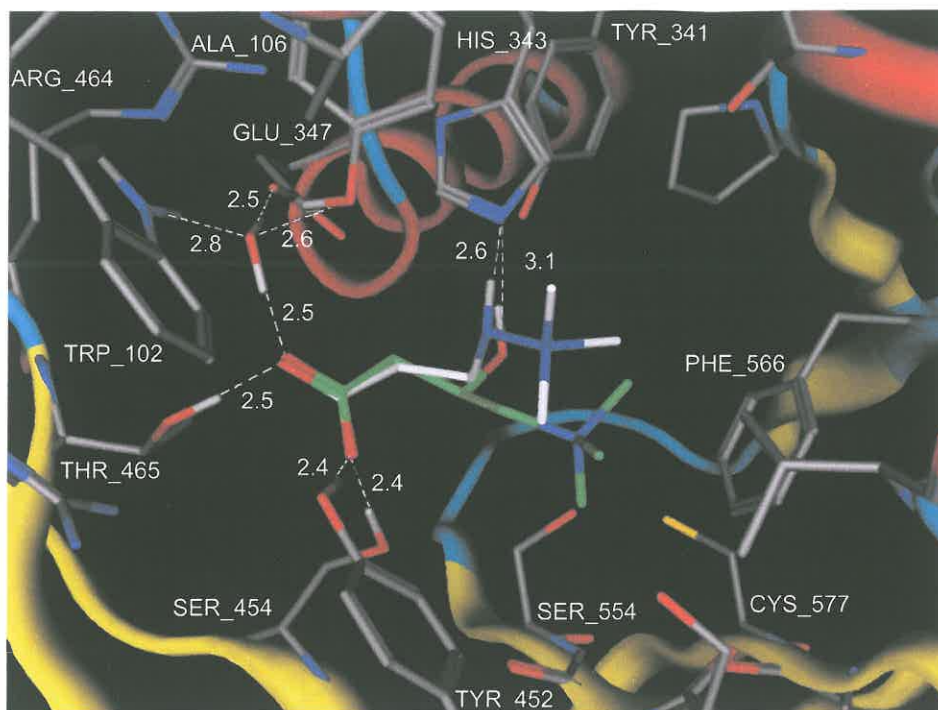
24. attēls. Hendersona kinētikas shēmas, kas raksturo mildronāta mijiedarbību ar KrAT. Katrs punkts ir vidējais no 3 mērījumiem \pm SEM. I_t – inhibitora koncentrācija; V_0 – reakcijas ātrums bez inhibitora; V_i – reakcijas ātrums inhibitora klātienē.

Lai gan mildronāts konkurējoši samazina enzīma aktivitāti, tomēr tas ir vājš inhibitors, jo mildronāta K_i vērtība saistībai ar KrAT karnitīna klātbūtnē ir $5,2 \pm 0,6$ mM (23., 24. un 25. attēls).



25. attēls. KrAT aktivitāte atkarībā no mildronāta koncentrācijas un trim dažādām karnitīna koncentrācijām. Katrs punkts ir vidējais no 3 mērījumiem \pm SEM.

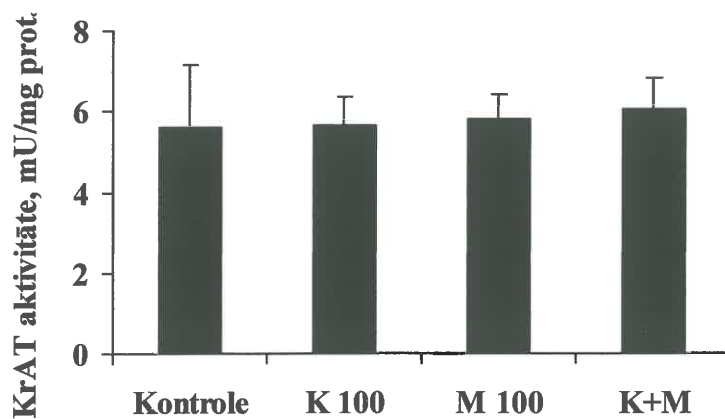
Lai raksturotu mildronāta saistību ar KrAT molekulu, veica molekulārās dinamikas skaitļošanu. Molekulārās dinamikas skaitļošanas rezultāti parādīti 26. attēlā. Gandrīz identisks ir karnitīna un mildronāta karboksilgrupas un α -CH₂ grupas novietojums; bet KrAT katalītiskais His-343 veido ūdeņraža saites ar karnitīna hidroksilgrupu, bet mildronāta gadījumā ar NH grupu. Tā kā karnitīna un mildronāta saistība ar His-343 ir atšķirīga, tad būtiski savādāks ir trimetilamonija grupas novietojums. Karnitīna gadījumā trimetilamonija grupa ir iegremdēta KrAT aktīvā centra hidrofobajā kabatā, bet mildronāta gadījumā tā ir vērsta prom no proteīna virsmas.



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

3.3.2. Ietekme uz KrAT aktivitāti *in vivo*

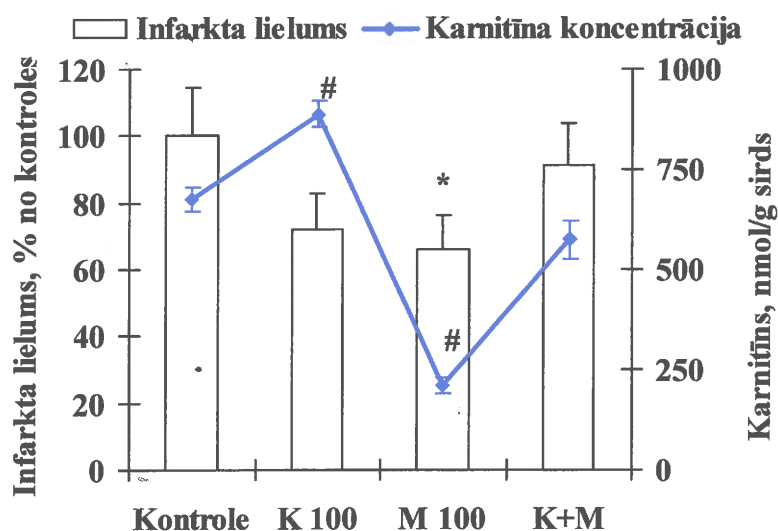
Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 14 dienu perorālas lietošanas ietekme uz KrAT aktivitāti parādīta 27. attēlā. Karnitīna koncentrācijas izmaiņas sirds audos, kā arī mildronāta klātbūtne neietekmē KrAT aktivitāti *in vivo*.



27. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz KrAT aktivitāti *Wistar* žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 5 dzīvniekos \pm SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nenovēroja (Stjudenta t-tests).

3.4. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu

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



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

Eksperimentu rezultāti par karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekmi uz izolētās sirds (*ex vivo*) parametriem išēmijas-reperfūzijas laikā apkopoti 5. tabulā. Karnitīna, mildronāta un abu savienojumu kombinācijas lietošana neietekmēja sākotnējos (pirms išēmijas) sirds darbības parametrus. Salīdzinot ar rādītājiem pirms išēmijas, išēmijas laikā koronārā plūsma visās grupās samazinājās vidēji par 39%, kreisā kambara saraušanās spēks (LVDP) samazinājās vidēji par 33%, sirds darbs (sirds ritms \times LVDP) samazinājās vidēji par 36%, tomēr neviens no šiem parametriem ticami neatšķīrās no novērotajām izmaiņām kontroles grupā. Reperfūzijas laikā koronārā plūsma atjaunojās līdz 70–75% no sākotnējā līmeņa, bet pārējie sirds darbības parametri atjaunojās vidēji līdz pat 90% no sākotnējiem rādītājiem. Arī reperfūzijas laikā neviens no sirds darbības parametriem ticami neatšķīrās no izmaiņām kontroles grupā.

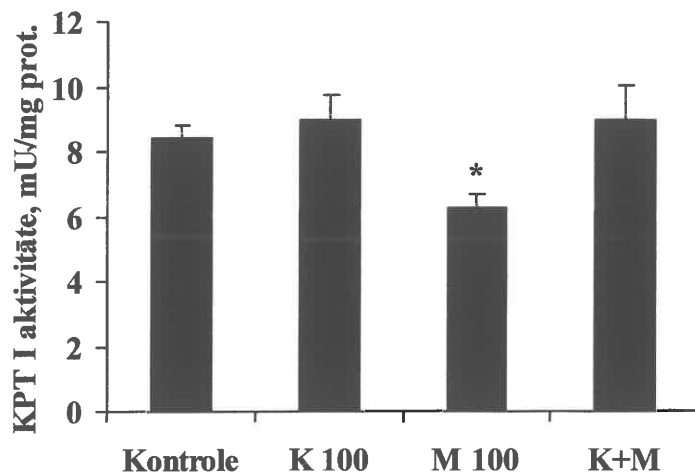
5. tabula

Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz sirdsdarbības rādītājiem *ex vivo*

Deva, mg/kg	Sirds ritms, sitieni minūtē	Koronārā plūsma, ml/min	LVDP, mmHg	dP/dt maks, mmHg/s	dP/dt min, mmHg/s	Sirds ritms × LVDP
Sirdsdarbības parametri pirms išēmijas						
Kontrole	247±14	7.6±0.8	74±14	1845±162	-1300±127	17219±2315
K 100	251±11	7.0±0.6	64±11	1675±65	-1165±89	15780±2336
M 100	237±13	7.8±0.7	72±13	1749±143	-1279±137	17189±3517
K+M	246±9	7.2±0.6	59±11	1456±175	-1020±130	14939±3182
Sirdsdarbības parametri išēmijas laikā						
Kontrole	229±10	4.8±0.7	47±9	1111±143	-829±105	11118±2651
K 100	222±5	4.1±0.5	42±7	1184±126	-803±66	9394±1596
M 100	223±14	5.0±0.7	50±11	1250±159	-924±107	11074±2275
K+M	235±7	4.3±0.5	41±9	990±108	-719±83	9808±2271
Sirdsdarbības parametri reperfūzijas laikā						
Kontrole	231±14	5.8±1.0	65±8	1739±159	-1178±88	14945±2095
K 100	244±13	5.1±0.9	60±9	1676±177	-1141±107	14480±2208
M 100	240±12	6.0±0.8	59±9	1611±150	-1121±88	14234±2228
K+M	252±14	5.0±0.7	52±7	1423±163	-964±90	13513±2223

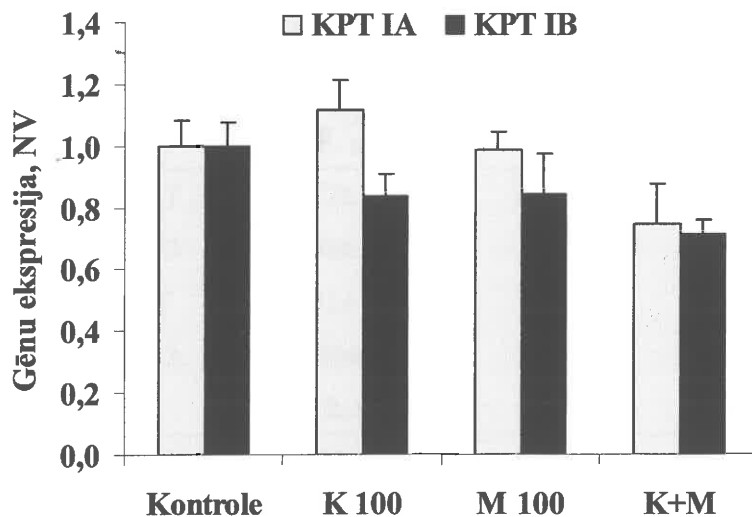
Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz sirdsdarbības parametriem *Wistar* žurkās. Mildronāts (M 100) un karnitīns (K 100) ievadīti perorāli katru dienu devā 100 mg/kg; kombinācijas grupā 100+100 mg/kg (K+M). Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos ± SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nenovēroja (Stjūdenta t-tests).

Izmainītā karnitīna koncentrācija (13. attēls) ietekmēja KPT I aktivitāti sirds mitohondriju membrānās pēc mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu perorālas lietošanas. Pēc mildronāta lietošanas KPT I aktivitāte statistiski ticami samazinājās par 26% (29. attēls).



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

Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu perorāla lietošana neietekmēja KPT IA un IB mRNS ekspresiju (30. attēls).



30. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz KPT IA un IB mRNS ekspresijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds mitohondrijos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 5 dzīvniekos \pm SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nenovēroja (Stjudenta t-tests).

3.5. Ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz hemodinamikas rādītājiem *Wistar* žurkās

Ilgstoši samazinātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz hemodinamikas rādītājiem pārbaudīja pēc mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas 4, 8 un 12 nedēļu perorālas lietošanas. Hemodinamikas rādītājus mērīja gan anestezētās žurkās, kanulējot kopējo miega artēriju un nosakot sirds ritmu, sistolisko un diastolisko asinsspiedienu, gan izolētās sirdīs, nosakot sirds ritmu, koronāro plūsmu, LVDP, sirds kontraktilitāti un relaksācijas spēju, kā arī sirds darbu. Pat pēc 12 nedēļu ilgas mildronāta lietošanas pazeminātā karnitīna koncentrācija neietekmēja žurku svaru un hemodinamikas rādītājus (6. tabula).

6. tabula

Mildronāta ietekme uz *Wistar* žurku svaru un hemodinamikas rādītājiem *in vivo*

Deva, mg/kg	Žurku svars, g	Sirds ritms, BPM	Sistoliskais spiediens, mmHg	Diastoliskais spiediens, mmHg
4. nedēļa				
Kontrole	364±13	386±10	129±4	114±5
M 100	362±21	381±11	125±6	107±6
M 200	384±13	384±13	126±5	111±6
M 400	361±13	407±10	138±5	121±3
8. nedēļa				
Kontrole	425±17	377±12	131±7	117±4
M 100	403±23	398±14	139±5	123±5
M 200	388±7	381±15	140±4	120±3
M 400	423±13	386±9	129±4	114±4
12. nedēļa				
Kontrole	440±19	378±9	145±3	123±3
M 100	480±18	351±10	130±6	110±7
M 200	492±18	364±18	129±5	110±5
M 400	441±12	367±9	142±3	121±3

Mildronāts ievadīts perorāli katru dienu devās 100 (M100), 200 (M 200), 400 mg/kg (M 400) 4, 8 vai 12 nedēļas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos ±SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nenovēroja (Tukija tests).

Ilgstoši lietojot mildronātu, tā izraisītā pazeminātā karnitīna koncentrācija neietekmēja hemodinamikas rādītājus izolētā sirdī pat pēc 12 nedēļām (7. tabula).

7. tabula

Mildronāta ietekme uz *Wistar* žurku izolētās sirds hemodinamikas rādītājiem

Deva, mg/kg	Sirds ritms, BPM	Koronārā plūsma, ml/min	LVDP, mmHg	dP/dt maks, mmHg/s	dP/dt min, mmHg/s	Sirds ritms×LVDP
4. nedēļa						
Kontrole	238±12	5.2±0.1	48±5	2028±108	-912±50	11548±1565
M 100	226±15	5.4±0.8	47±2	2081±263	-1045±120	10601±784
M 200	221±12	6.1±0.7	54±4	2161±186	-1069±75	11785±573
M 400	212±22	5.5±0.6	41±8	1874±290	-933±76	8274±1182
8. nedēļa						
Kontrole	238±33	5.6±0.6	73±9	2762±318	-1524±156	16345±2141
M 100	186±22	5.4±0.6	70±9	2695±316	-1461±162	12912±2252
M 200	205±14	6.4±0.7	67±3	2487±168	-1293±69	13612±989
M 400	204±13	6.7±0.5	65±6	2498±294	-1321±152	13054±1019
12. nedēļa						
Kontrole	236±14	8.2±0.3	43±4	1639±174	-854±91	10149±1183
M 100	258±12	8.5±0.1	45±4	1756±205	-931±97	11559±1114
M 200	196±8	7.5±0.7	36±3	1245±99	-701±49	7149±848
M 400	212±19	8.4±0.1	46±3	1572±210	-905±87	9825±1109

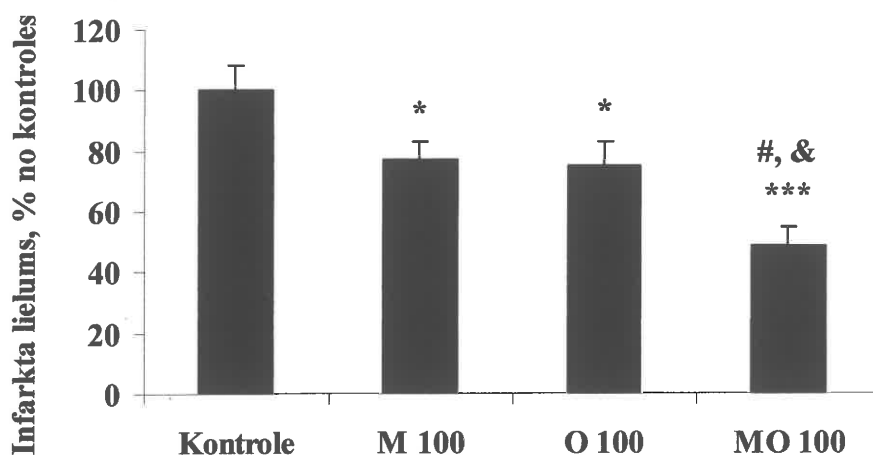
Mildronāts ievadīts perorāli katru dienu devās 100 (M 100), 200 (M 200), 400 mg/kg (M 400) 4, 8 vai 12 nedēļas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos ±SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles grupas nenovēroja (Tukija tests).

3.6. Mildronāta un mildronāta orotāta pretinfarkta aktivitāte, ietekme uz aritmiju attīstību

3.6.1. Ietekme uz infarkta lielumu

Pētījuma rezultāti par mildronāta (100 mg/kg, M 100), orotskābes (100 mg/kg, O 100) un mildronāta orotāta (200 mg/kg, MO 200) 14 dienu perorālas lietošanas ietekmi uz infarkta lielumu *Wistar* žurku sirds audos ir parādīti 31. attēlā. Mildronāts un orotskābe samazināja infarkta lielumu attiecīgi par 23% un 25%, bet mildronāta orotāts samazināja infarkta lielumu par 51%, salīdzinot ar kontroles grupu. Mildronāta orotāta grupā infarkta

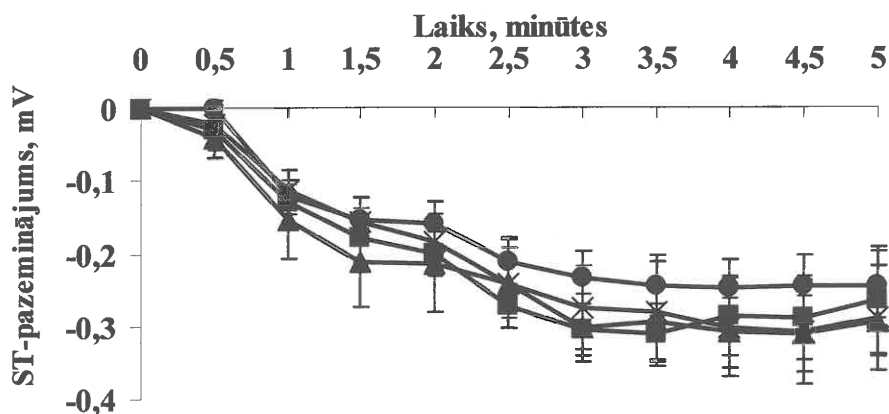
lielums bija statistiski ticami mazāks, salīdzinot arī ar mildronāta un orotskābes grupās novēroto.



31. attēls. Mildronāta, orotskābes un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz infarkta lielumu *Wistar* žurku sirdī. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. *,*** statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas; #,& statistiski ticami atšķiras no mildronāta un orotskābes grupas (Tukija tests, *,#,& $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3.6.2. Ietekme uz izoproterenola inducēto išēmiju

14 dienas perorāli lietojot mildronātu (100 mg/kg), orotskābi (100 mg/kg) un mildronāta orotātu (200 mg/kg), pārbaudīja to ietekmi uz izoproterenola izraisīto išēmiju *Wistar* žurkās (32. attēls).

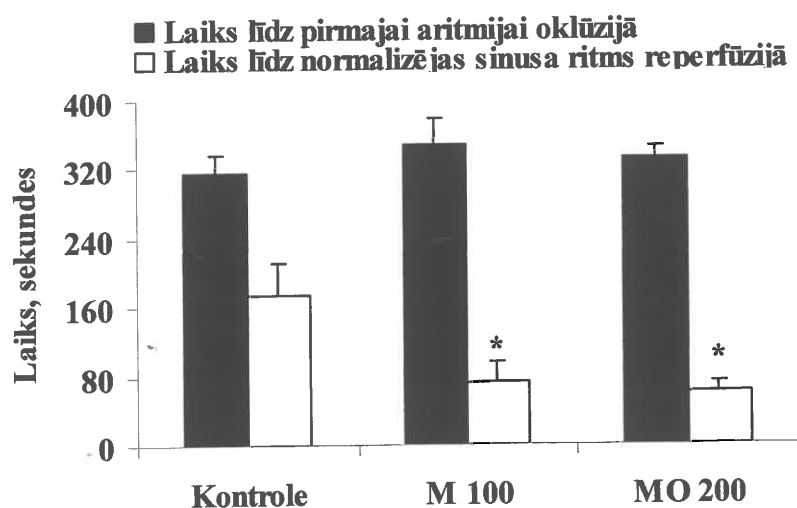


32. attēls. Mildronāta (■), orotskābes (▲) un mildronāta orotāta (×) 14 dienu lietošanas ietekme uz izoproterenola izraisīto ST segmenta pazeminājumu *Wistar* žurkās. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos \pm SEM. Statistiski ticamas atšķirības no kontroles (●) grupas nenovēroja (Tukija tests).

Izoproterenola ievadīšana izraisīja ST segmenta pazeminājumu, reģistrējot EKG II standartnovadījumā. Maksimālais ST segmenta pazeminājums, ko novēroja kontroles grupā, bija $0,27 \pm 0,04$ mV. Neviena no vielām ticami neietekmēja izoproterenola izraisīto ST segmenta pazeminājumu.

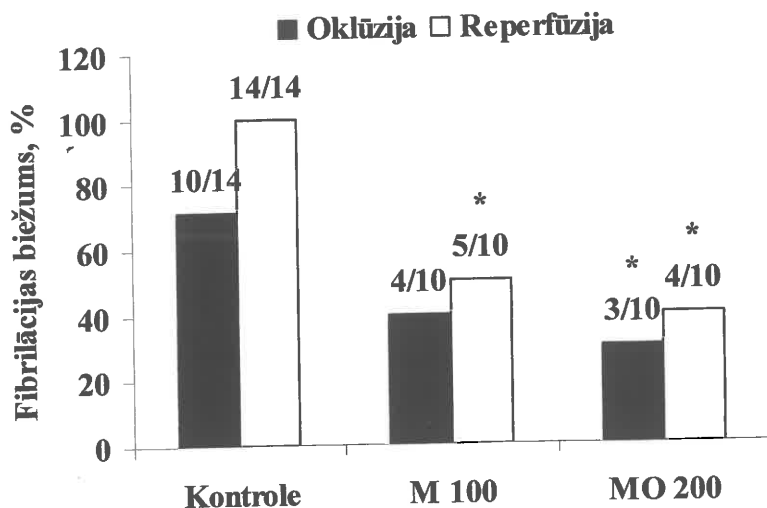
3.6.3. Ietekme uz išēmijas-reperfūzijas izraisītām aritmijām

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



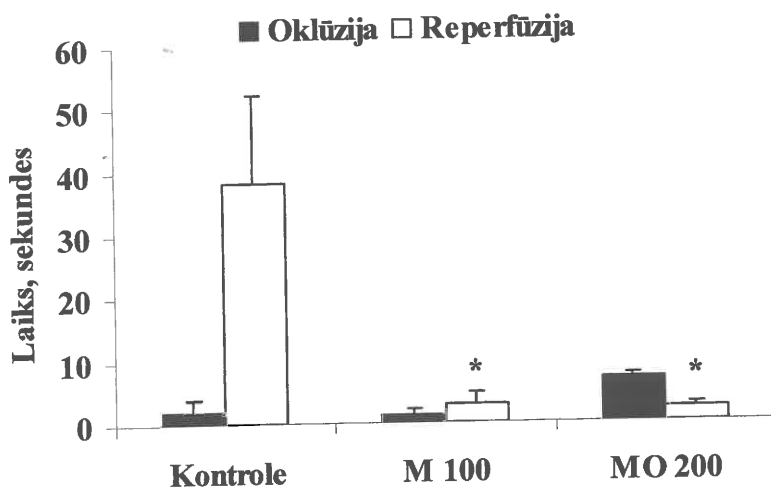
33. attēls. Mildronāta un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz laiku, līdz attīstās aritmijas oklūzijā, un laiku, līdz atjaunojas normāls sinusa ritms reperfūzijā *Wistar* žurkām. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 6 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles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

Mildronāts un mildronāta orotāts neietekmēja tahikardijas biežumu oklūzijas un reperfūzijas laikā. Sirds kambaru fibrilācijas biežums kontroles grupā oklūzijas un reperfūzijas laikā bija attiecīgi 71% (10 no 14 žurkām) un 100% (14 no 14 žurkām) un mildronāts ticami samazināja sirds kambaru fibrilācijas biežumu reperfūzijas laikā, bet mildronāta orotāts – gan oklūzijas, gan reperfūzijas laikā (34. attēls).



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

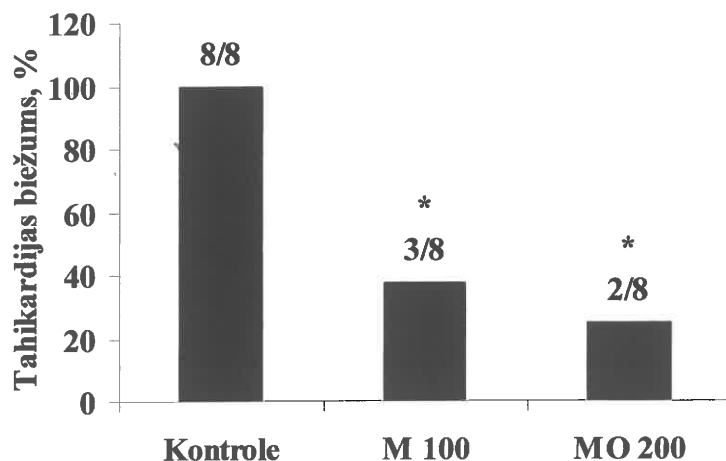
Mildronāts un mildronāta orotāts ievērojami samazināja kopējo sirds kambaru fibrilācijas laiku reperfūzijā (attiecīgi 3 ± 2 s un 2 ± 2 s, salīdzinot ar 38 ± 14 s kontroles grupā), bet neietekmēja to oklūzijas laikā (35. attēls).



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

3.6.4. Ietekme uz kalcija hlorīda izraisītajām aritmijām

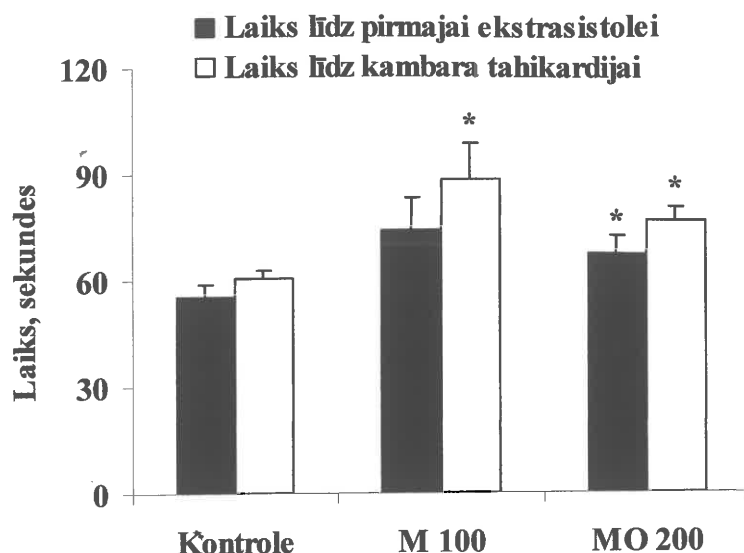
Mildronāts (100 mg/kg) un mildronāta orotāts (200 mg/kg) neietekmēja laiku, kad sākās aritmijas pēc kalcija hlorīda ievadīšanas (attiecīgi pēc 26 ± 4 s un 25 ± 4 s, salīdzinot ar 30 ± 4 s kontroles grupā), un laiku, līdz atjaunojās normāls sinusa ritms (attiecīgi 119 ± 20 s un 97 ± 12 s, salīdzinot ar 159 ± 39 s kontroles grupā). Mildronāts un mildronāta orotāts ticami samazināja kalcija hlorīda izraisīto sirds kambaru tahikardiju biežumu *Wistar* žurkās (36. attēls).



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

3.6.5. Ietekme uz akonitīna izraisītajām aritmijām

Akonitīna ievadīšana izraisīja dzīvībai bīstamas aritmijas visās grupās; mirstība kontroles un mildronāta grupā bija 100%, bet mildronāta orotāta grupā 63%, tomēr šis efekts nebija ticams. Mildronāts un mildronāta orotāts neietekmēja laiku līdz akonitīna izraisītās sirds kambaru fibrilācijas sākumam (attiecīgi 202 ± 17 s un 327 ± 74 s, salīdzinot ar 160 ± 23 s kontroles grupā). Mildronāts paildzināja laiku līdz sirds kambaru tahikardijas sākumam, bet mildronāta orotāts paildzināja laiku gan līdz ventrikulārās tahikardijas sākumam, gan līdz pirmajai ekstrasistolei (37. attēls).



37. attēls. Mildronāta un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz laiku līdz pirmajai ekstrasistolei un laiku līdz attīstās sirds kambaru tahikardijai *Wistar* žurkām. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

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

3.7.1. Ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā

Pētījuma rezultāti par mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 8 nedēļu perorālas lietošanas ietekmi uz karnitīna un GBB koncentrācijas izmaiņām *Dahl* žurku asins plazmā apkopoti 8. tabulā. Lietojot barību ar palielinātu sāls saturu (PS, 8% NaCl), karnitīna koncentrācija *Dahl* PS kontroles žurku asins plazmā samazinājās apmēram 2 reizes, salīdzinot ar žurkām, kas lietoja barību ar nepalielinātu sāls (NS, 0,3% NaCl) saturu. Karnitīna (PS/K 100) un karnitīna-mildronāta kombinācijas (PS/K+M) lietošana statistiski ticami palielināja karnitīna koncentrāciju žurku asins plazmā, salīdzinot ar PS kontroles grupas dzīvniekiem. Mildronāta lietošana statistiski ticami samazināja karnitīna koncentrāciju, salīdzinot gan ar NS, gan PS kontroles grupas žurkām. Sāls saturs barībā neietekmēja GBB koncentrāciju NS un PS kontroles grupās, bet mildronāta, karnitīna un kombinācijas lietošanas ietekmē GBB koncentrācija palielinājās attiecīgi 6, 1,5 un 12 reizes, salīdzinot ar PS kontroli.

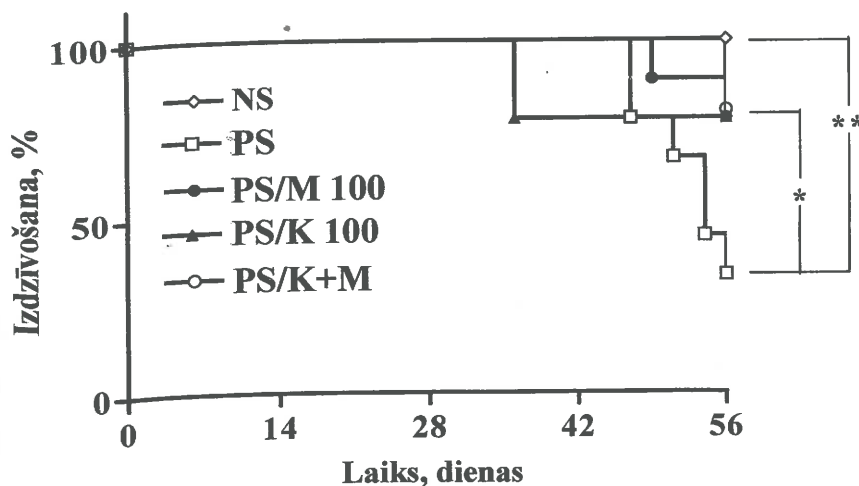
Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju *Dahl* žurku asins plazmā

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

Mildronāts (M 100) un karnitīns (K 100) ievadīti perorāli katru dienu devā 100 mg/kg; kombinācijas grupā 100+100 mg/kg (K+M). Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas; # statistiski ticami atšķiras no PS/M 100 grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$).

3.7.2. Ietekme uz izdzīvošanu

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) ilgstoša lietošana samazina *Dahl* žurku mirstību (38. attēls).



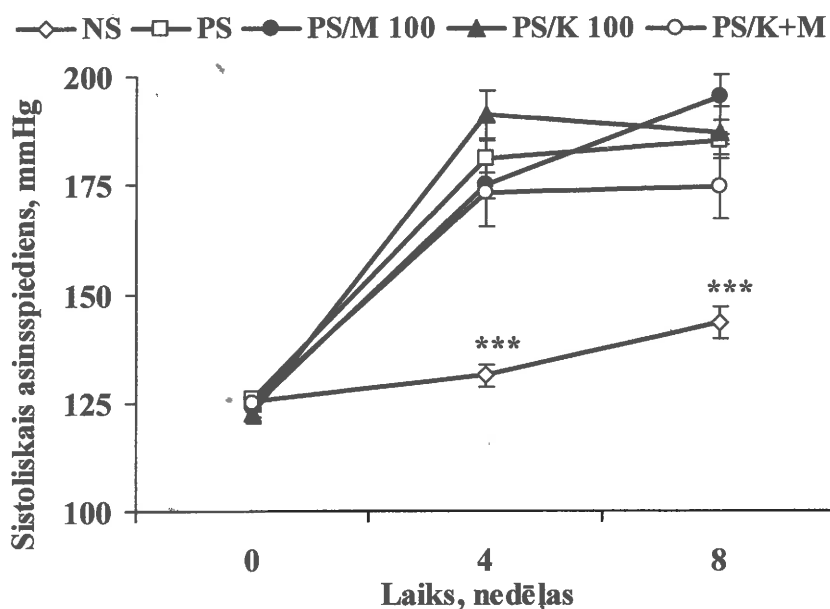
38. attēls. Kaplana-Meiera *Dahl* žurku izdzīvošanas analīzes shēma mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekmes izvērtēšanai. *,** statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Datu analīze ar Kaplana-Meiera metodi parādīja, ka PS kontroles žurkām ir ievērojami lielāka mirstība nekā NS grupas žurkām. Pēc 8 nedēļām PS kontroles grupā izdzīvoja 30% (3 no 10 dzīvniekiem) dzīvnieku, bet NS grupā nāves gadījumu nebija. Karnitīna-mildronāta kombinācijas (PS/K+M) lietošana statistiski ticami uzlaboja izdzīvošanu (80%, 8 no 10 dzīvniekiem); savukārt, lai arī karnitīna (PS/K 100) un

mildronāta (PS/M 100) grupās izdzīvoja 80% žurku, tomēr šie efekti nebija statistiski ticami, salīdzinot ar kontroli.

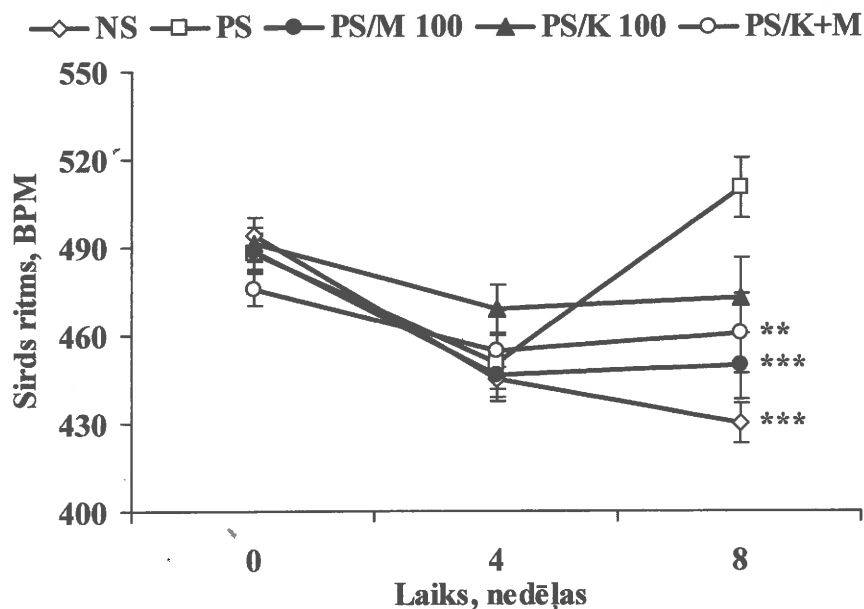
3.7.3. Ietekme uz sistolisko asinsspiedienu un sirds ritmu

Eksperimenta sākumā *Dahl* žurku sistoliskais asinsspiediens visās grupās bija vidēji 125 mmHg. Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 8 nedēļu ilgstoša lietošana neietekmēja hipertensijas attīstību. Sistoliskais asinsspiediens visās grupās bija augstāks par 170 mmHg, sasniedzot pat 195 mmHg (39. attēls).



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

Sirds ritms ticami neatšķīrās starp grupām gan eksperimenta sākumā, gan arī pēc 4 nedēļām. Toties pēc 8 nedēļām PS kontroles grupā sirds ritms palielinājās, sasniedzot 510 ± 10 sitienus minūtē, bet NS, kā arī mildronāta (PS/M 100) un kombinācijas (PS/K+M) grupās sirds ritms bija statistiski ticami zemāks attiecīgi par 16, 12 un 10% (40. attēls).



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

3.7.4. Ietekme uz žurku un to orgānu svaru un ehokardiogrāfiskajiem parametriem

Dahl žurkām, kas lietoja barību ar palielinātu sāls saturu, attīstījās gan sirds kreisā kambara hipertrofija, gan nieru hipertrofija. Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 8 nedēļu ilgstoša lietošana neietekmēja ne sirds kreisā kambara, ne nieru hipertrofijas attīstību. Visās grupās, kas lietoja barību ar palielinātu sāls saturu, pēc 4 un 8 nedēļām novēroja svara samazinājumu, salīdzinot ar NS grupas žurkām (9. tabula).

9. tabula

Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz *Dahl* žurku svaru un orgānu/ķermeņa masas (ĶM) attiecību

	Žurku svars, g	KKS/ĶM, g/kg	Plaušu svars/ĶM, g/kg	Nieru svars/ĶM, g/kg
NS				
0. nedēļa	229±6	3.1±0.2	---	---
4. nedēļa	362±7**	2.8±0.1**	---	---
8. nedēļa	408±9**	2.8±0.1**	4.7±0.7	8.9±0.2**
PS Kontrole				
0. nedēļa	223±5	3.0±0.1	---	---
4. nedēļa	329±7	3.7±0.1	---	---
8. nedēļa	334±19	4.4±0.3	5.5±0.9	12.9±1.0
PS/M 100				
0. nedēļa	224±4	2.9±0.1	---	---
4. nedēļa	340±6	3.7±0.1	---	---
8. nedēļa	342±14	4.6±0.6	5.9±1.0	12.7±0.7
PS/K 100				
0. nedēļa	224±5	3.2±0.1	---	---
4. nedēļa	333±4	3.6±0.1	---	---
8. nedēļa	300±14	5.3±0.3	5.0±0.5	12.2±0.8
PS/K+M				
0. nedēļa	224±5	3.3±0.2	---	---
4. nedēļa	337±9	3.7±0.1	---	---
8. nedēļa	324±15	4.1±0.3	5.9±1.2	13.4±0.7

KKS – sirds kreisā kambara svars. Mildronāts (M 100) un karnitīns (K 100) ievadīti perorāli katru dienu devā 100 mg/kg; kombinācijas grupā 100+100 mg/kg (K+M). Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3–10 dzīvniekos ±SEM. ** statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,01$).

Barība ar palielinātu sāls saturu izraisīja sirds kreisā kambara sienu sabiezināšanos, bet neietekmēja kreisā kambara funkcionālos parametrus. Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 8 nedēļu ilgstoša lietošana ticami neietekmēja nevienu no ehokardiogrāfiskajiem parametriem (10. tabula).

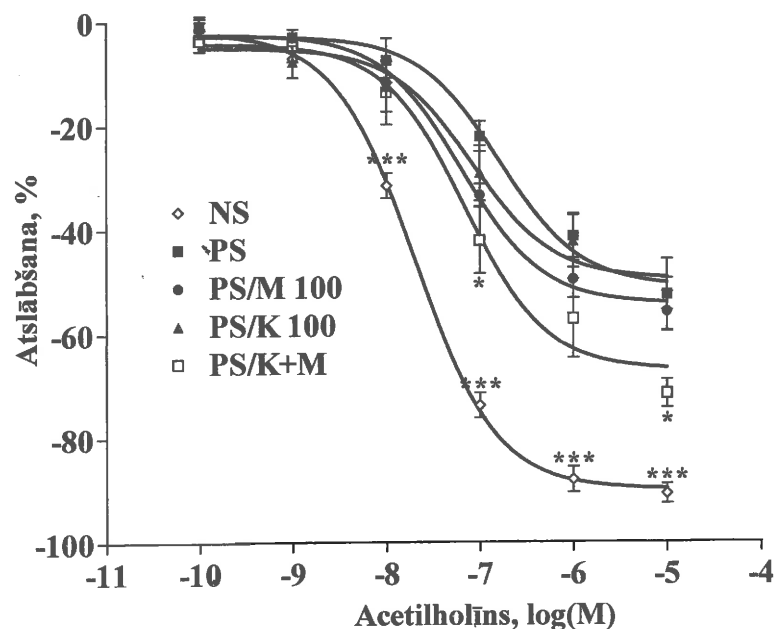
Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz *Dahl* žurku
sirds ehokardiogrāfiskajiem rādītājiem

	NS	PS Kontrolē	PS/M 100	PS/K 100	PS/K+M
IVSd, mm					
0. nedēļa	1.39±0.01	1.43±0.04	1.40±0.08	1.39±0.03	1.41±0.03
4. nedēļa	1.69±0.03*	1.90±0.04	1.88±0.05	1.90±0.04	1.92±0.09
8. nedēļa	1.76±0.04*	2.20±0.04	2.32±0.05	2.26±0.06	2.23±0.09
IVSs, mm					
0. nedēļa	2.62±0.02	2.66±0.13	2.42±0.17	2.71±0.16	2.72±0.11
4. nedēļa	2.76±0.05*	3.20±0.08	3.26±0.10	3.27±0.11	3.11±0.06
8. nedēļa	2.92±0.05*	3.68±0.16	3.76±0.16	3.73±0.12	3.45±0.10
LVPWd, mm					
0. nedēļa	1.48±0.04	1.67±0.11	1.54±0.12	1.71±0.16	1.73±0.12
4. nedēļa	1.79±0.06*	2.07±0.06	2.11±0.04	2.05±0.05	2.08±0.04
8. nedēļa	1.87±0.05*	2.29±0.04	2.56±0.13	2.73±0.21	2.39±0.17
LVPWs, mm					
0. nedēļa	2.71±0.27	2.86±0.05	2.74±0.18	3.18±0.20	3.10±0.05
4. nedēļa	2.81±0.11*	3.22±0.11	3.35±0.05	3.29±0.10	3.36±0.12
8. nedēļa	2.94±0.08*	3.73±0.16	3.87±0.16	3.96±0.12	3.72±0.21
LVIDd, mm					
0. nedēļa	7.21±0.12	6.84±0.18	6.59±0.14	6.81±0.45	6.77±0.20
4. nedēļa	7.85±0.08	7.86±0.15	8.02±0.11	7.85±0.16	7.90±0.19
8. nedēļa	8.05±0.12	7.88±0.19	7.42±0.26	7.01±0.24*	7.73±0.17
LVIDs, mm					
0. nedēļa	3.67±0.01	3.61±0.27	3.44±0.01	3.12±0.33	3.37±0.22
4. nedēļa	4.85±0.15	4.72±0.16	4.69±0.15	4.57±0.25	4.68±0.25
8. nedēļa	5.01±0.15	4.30±0.33	4.05±0.31	3.66±0.11	4.39±0.25
LVFS, %					
0. nedēļa	50±3	47±3	48±1	54±2	48±1
4. nedēļa	41±2	40±1	42±1	42±2	42±1
8. nedēļa	41±2	45±4	41±2	47±3	41±2
LVEF, %					
0. nedēļa	84±1	83±3	83±1	86±2	85±3
4. nedēļa	75±2	76±2	77±1	77±2	76±2
8. nedēļa	77±2	80±4	77±2	82±2	77±3

IVSd un IVSs – sirds kambaru starpsienas biezums diastolē un sistolē; LVPWd un LVPWs – sirds kreisā kambara mugurējās sienas biezums diastolē un sistolē; LVIDd un LVIDs – sirds kreisā kambara iekšējais diametrs diastolē un sistolē; LVFS – sirds kreisā kambara saraušanās spēja; LVEF – sirds kreisā kambara izsviedes tilpums. Mildronāts (M 100) un karnitīns (K 100) ievadīti perorāli katru dienu devā 100 mg/kg; kombinācijas grupā 100+100 mg/kg (K+M). Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3–10 dzīvniekos ±SEM. * statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$).

3.7.5. Ietekme uz endoteliālo funkciju

Lietojot barību ar palielinātu sāls saturu, pasliktinājās *Dahl* žurku aortas gredzenu atslābšana acetilholīna ietekmē, salīdzinot ar NS grupas žurkām. Mildronāta un karnitīna kombinācijas lietošana uzlaboja aortas gredzenu atslābšanu acetilholīna ietekmē, bet karnitīna un mildronāta atsevišķa lietošana endoteliālo funkciju neietekmēja (41. attēls).



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

4. Diskusija

Promocijas darbs veltīts pētījumiem par karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekmi uz sirds-asinsvadu sistēmas funkcionalitāti normoksijas un išēmijas apstākļos. Karnitīna koncentrācijas izmaiņas panāca, lietojot gan karnitīnu, gan mildronātu. Pētījuma laikā ieguva rezultātus, kas raksturo karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekmi uz sirds aizsardzību išēmijas laikā, hipertensijas attīstību un ar karnitīnu saistīto enzīmu aktivitāti.

4.1. Karnitīna koncentrācijas samazinājuma ietekme uz taukskābju un glikozes metabolismu

Karnitīns piedalās glikozes un taukskābju enerģijas metabolisma regulēšanā sirds un skeleta muskuļos (Foster, 2004; Stephens et al., 2007) un organismā tā homeostāzi nodrošina kompleksas transporta sistēmas aktīva darbība (Ramsay et al., 2001). Tajā pašā laikā trūkst pētījumu par karnitīna samazinātas koncentrācijas ietekmi uz sirds un aknu funkcijām.

Mildronāts ir labi zināms karnitīna koncentrāciju samazinošs aģents, kas kavē gan karnitīna biosintēzi (Simkhovich et al., 1988), gan samazina tā reabsorbciju nierēs (Spaniol et al., 2001). Kavējot biosintēzi, mildronāts izraisa karnitīna prekursora GBB koncentrācijas palielināšanos gan asinīs, gan audos (Liepinsh et al., 2006). Mūsu pētījuma rezultāti apliecina, ka, lietojot 4–12 nedēļas mildronātu 100, 200 un 400 mg/kg, karnitīna koncentrācija samazinās, bet GBB koncentrācija palielinās asins plazmā (5. un 6. attēls) un sirds (7. un 9. attēls) un aknu (8. un 10. attēls) audos. GBB koncentrācijas izmaiņas atšķirībā no karnitīna koncentrācijas izmaiņām nebija atkarīgas no mildronāta devas. Tas varētu liecināt, ka lietotās mildronāta devas vienādi kavē GBBH darbību, bet karnitīna koncentrācijas samazināšanos, pieaugot mildronāta devai, varētu skaidrot ar pieaugošo karnitīna reabsorbcijas kavēšanu nierēs, inhibējot OCTN2.

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

griezumus, noteica triglicerīdu un taukskābju koncentrāciju aknu audos, kā arī lipīdu profilu un aknu funkcionalitātes marķierus asins plazmā. Aknu audu griezumū histokīmiskā analīze neuzrādīja lipīdu infiltrācijas pazīmes (22. attēls), bet triglicerīdu koncentrācija statistiski ticami palielinājās par 10–20% tikai lielākās mildronāta devas gadījumā (17. attēls). Taukskābju koncentrācija aknu audos ticami palielinājās tikai pēc 12 nedēļām, nepārsniedzot 15%, salīdzinājumā ar kontroles grupu (18. attēls).

Karnitīna koncentrācijas samazinājums būtiski neietekmēja arī asins plazmas lipīdu profilu (2. un 3. tabula), jo vienīgās izmaiņas, kas varētu liecināt par ievērojami kavētu taukskābju β -oksidāciju, novēroja lielākās mildronāta devas gadījumā, un izteiktāki šie efekti bija žurkām badinātā stāvoklī. Tā, piemēram, β -hidroksibutirāta koncentrācijas samazināšanos, kas liecina par kavētu taukskābju metabolismu un pastiprinātu glikozes izmantošanu (van Knegsel et al., 2005), novēroja tikai pēc 12 nedēļām, ja mildronāta deva bija 400 mg/kg (2. un 3. tabula).

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 (Hmelnickis et al., 2008), 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.

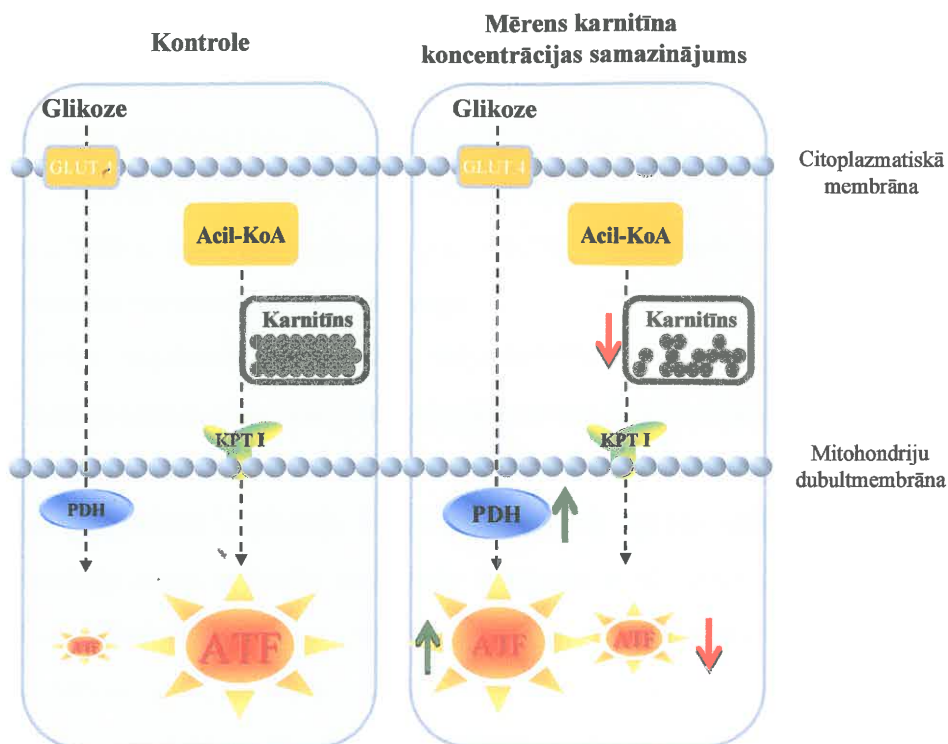
Karnitīns enzīma KPT I ietekmē veido acilkarnitīnus, kuri tiek transportēti mitohondrijos. Līdz ar to bija svarīgi noskaidrot, kas notiek ar KPT I aktivitāti samazinātas karnitīna koncentrācijas apstākļos. Virknē pētījumu ir konstatēts, ka mildronāta lietošanas izraisītais karnitīna samazinājums izsauc KPT I mRNS ekspresijas un arī proteīna daudzuma palielināšanos ne tikai sirdī, bet arī aknu audos (Degrace et al., 2004; Degrace et al., 2007; Liepinsh et al., 2008). No agrākiem pētījumiem ir zināms, ka pēc mildronāta lietošanas KPT I aktivitāte sirds un aknu audos palielinās, mērījumus veicot izolētos mitohondrijos eksogēni pievienota karnitīna klātbūtnē; ir noskaidrots, ka samazināta audu karnitīna koncentrācija neiespaido KPT I jutību pret malonil-koenzīma A inhibējošo ietekmi (Tsoko et al., 1995; Degrace et al., 2004; Degrace et al., 2007).

Mūsu pētījuma ietvaros KPT I aktivitāti noteica, izmantojot reālās karnitīna koncentrācijas audos, bez karnitīna koncentrāciju izlīdzināšanas, kā tas darīts iepriekš

minētajos pētījumos. Pēc ilgstošas (4–12 nedēļas) mildronāta lietošanas KPT I aktivitāte palielinājās sirds audos (15. attēls), bet aknu audos (16. attēls) nebija ticamas atšķirības no kontroles grupas. Toties pēc 2 nedēļu ilgas mildronāta (100 mg/kg) lietošanas, kad karnitīna koncentrācija samazinājās par 69%, KPT I aktivitāte sirdī bija par 26% mazāka nekā kontroles grupā (29. attēls), bet no KPT I atkarīgā taukskābju β -oksidācija tika kavēta par 27% (1. tabula). Vienlaicīgi nenovēroja KPT IA un KPT IB mRNS ekspresijas izmaiņas (30. attēls). Tas atšķiras no iepriekšējos pētījumos novērotās mRNS ekspresijas stimulācijas, lietojot mildronātu devās 200 mg/kg pelēs (21 diena) un 800 mg/kg žurkās (10 dienas) (Degrace et al., 2004; Liepinsh et al., 2008).

Iegūtie rezultāti liecina, ka KPT I aktivitātes, proteīna un mRNS daudzuma izmaiņas pēc mildronāta lietošanas ir atkarīgas no tā, cik izteikts vai ilgstošs ir bijis karnitīna samazinājums. Šo efektu iespējams skaidrot ar dažādo KPT I izoenzīmu K_m vērtībām karnitīnam, kas ir no 35 μ M KPT IA aknās līdz 500–700 μ M KPT IB muskuļu audos, bet sirdī, kur sastopamas abas izoformas, K_m vērtība ir \sim 200 μ M (McGarry et al., 1983; Brown et al., 1995). Līdz ar to karnitīna koncentrācija normālos apstākļos sirds audos (0,6–3 mM atkarībā no sugas) un aknu audos (0,4–3 mM atkarībā no sugas) ir vairāk nekā pietiekama, lai nodrošinātu taukskābju transportu mitohondrijos. Tāpēc var secināt, ka karnitīna koncentrācijas samazinājumam jābūt ļoti izteiktam vai ilgstošam, lai notiktu kompensatora KPT I mRNS un proteīna daudzuma, kā arī aktivitātes palielināšanās.

Vairākos pētījumos noskaidroja, ka izteikts karnitīna samazinājums izraisa hipoglikēmiju vai stimulē glikozes oksidāciju žurkās (Broderick, 2006; Kuwajima et al., 2007), savukārt mērens karnitīna samazinājums pēc mildronāta lietošanas (200 mg/kg) veicina glikozes uzņemšanu sirdī un glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu un transportproteīnu gēnu ekspresijas palielināšanos pelēs (Liepinsh et al., 2008). 2. un 3. tabulā apkopoti mūsu iegūtie rezultāti par to, ka karnitīna samazinājums pat pēc mildronāta lietošanas 400 mg/kg praktiski neietekmē glikozes koncentrāciju asinīs ne ēdušām, ne badinātām veselām *Wistar* žurkām. 1. tabulas dati liecina, ka karnitīna koncentrācijas samazināšanās praktiski neietekmē piruvātdehidrogenāzes kompleksa un Krebsa cikla aktivitāti normoksijas laikā. Šie dati vedina domāt, ka karnitīna samazinājuma ietekme uz glikozes metabolismu ir atkarīga no enerģijas substrātu pieejamības, jo glikozes metabolisma veicināšana ir kompensators mehānisms, ja kavēta taukskābju β -oksidācija (42. attēls). Papildus jāatzīmē, ka kardioprotektīvā efekta sasniegšanai nozīmīgāk būtu veicināt glikozes metabolismu tieši išēmijas-reperfūzijas, nevis normoksijas laikā.



42. attēls. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz glikozes un taukskābju enerģijas metabolismu. Zaļās bultiņas – palielināšanās, sarkanās bultiņas – samazināšanās.

Agrākos pētījumos minēts, ka mildronāts tieši kavē KrAT, un izteikta hipotēze, ka, šādi palielinot acetil-koenzīma A daudzumu, tiek veicināta dažādu mitohondrijos notiekošo metabolisma procesu norise (Shutenko et al., 1989). Tomēr pēdējā laika pētījumi par mildronāta lietošanas stimulēto glikozes metabolismu (Liepinsh et al., 2008) ir pretrunā iepriekš novērotajam, jo acetil-koenzīma A uzkrāšanās kavētu PDH kompleksa reakciju norisi. Lai pilnīgāk raksturotu mildronāta mijiedarbību ar KrAT, mēs veicām pētījumus gan ar attīrītu enzīmu *in vitro*, gan *ex vivo* izolētos mitohondrijos pēc mildronāta 2 nedēļu lietošanas. Bioķīmiskie enzīma aktivitātes mērījumi apliecināja, ka mildronāta saistība ar KrAT karnitīna klātienē ir salīdzinoši vāja, jo noteiktā K_i vērtība reālo karnitīna koncentrāciju gadījumā bija $5,2 \pm 0,6$ mM (23. un 25. attēls). Veicot molekulārās dinamikas skaitļošanu noskaidrojām, ka mildronāts konkurē ar karnitīnu par saistīšanos KrAT aktīvajā centrā. Vienīgā būtiskā atšķirība ir abu molekulu trimetilamonija grupas izvietojumā: karnitīna gadījumā trimetilamonija grupa ir iegremdēta KrAT aktīvā centra hidrofobajā kabatā, bet mildronāta gadījumā – vērsta prom no proteīna virsmas (26. attēls). Tieši tas var izskaidrot, kāpēc tik ļoti pasliktinās mildronāta saistība ar KrAT karnitīna klātbūtnē. Vienlaicīgi noskaidrojām, ka mildronāts neietekmē acetil-koenzīma A saistīšanos ar KrAT; savukārt, izmantojot iepriekš aprakstīto KrAT M564G mutanta enzīmu (564. pozīcijā esošais metionīns aizstāts ar glicīnu), kas spējīgs metabolizēt vidējo

un garo virkņu taukskābes (Cordente et al., 2004), noskaidrojām, ka izmaiņas acilgrupas saistošajā kabatā neietekmē mildronāta spēju saistīties ar enzīmu. Lai gan uzskata, ka visām aciltransferāzēm aktīvie centri pēc to uzbūves ir līdzīgi (Ramsay & Naismith, 2003; Jogl et al., 2004), ir zināms, ka mildronāts neietekmē KPT I aktivitāti (Tsoko et al., 1995; Kuwajima et al., 1999), kas netieši liecina par atšķirīgo mildronāta un, iespējams, arī karnitīna saistīšanos šo enzīmu katalītiskajos centros.

Lai pilnvērtīgi raksturotu mildronāta mijiedarbību ar KrAT, enzīma aktivitāti noteicām sirds mitohondrijos (bez karnitīna koncentrācijas izlīdzināšanas), kas izolēti no *Wistar* žurkām, kurām vadīts mildronāts 100 mg/kg. Lai gan karnitīna koncentrācija citosolā ir samazināta, tomēr ir zināms, ka sirds mitohondrijos pēc mildronāta lietošanas karnitīna koncentrācija ir pat nedaudz palielināta (Degrace et al., 2004). KrAT aktivitātes mērījumi *ex vivo* apliecināja *in vitro* iegūtos datus, jo enzīma aktivitāte, salīdzinot ar kontroles grupu, nemainījās (27. attēls). Iegūtie rezultāti liecina, ka ne mildronāts, ne tā lietošanas ietekmē izmainītā karnitīna koncentrācija citosolā un mitohondrijos tieši neietekmē KrAT aktivitāti normoksijas apstākļos *in vivo*. Tajā pašā laikā nevar izslēgt karnitīna koncentrācijas izmaiņu nozīmi KrAT aktivitātes regulācijā išēmijas un it īpaši reperfūzijas laikā, kad palielinātā karnitīna un samazinātā garo virkņu acilkoenzīmu A koncentrācija mitohondrijos KPT I kavēšanas dēļ, varētu stimulēt enzīma aktivitāti un attiecīgi glikozes metabolisma norises.

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

4.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu

Vairākos pētījumos ir informācija, ka gan karnitīna koncentrācijas palielināšana, gan arī samazināšana var reducēt išēmijas izraisīto sirds šūnu bojājumu. Mūsu pētījuma laikā salīdzinājām karnitīna (100 mg/kg), mildronāta (100 mg/kg) un abu vielu kombinācijas (100 un 100 mg/kg) 14 dienu ilgstošas lietošanas ietekmi uz sirds aizsardzību pret išēmijas-reperfūzijas bojājumu. No agrākiem pētījumiem ir zināms, ka karnitīna lietošana samazina infarkta lielumu pēc paliekošas sirds kreisās koronārās artērijas oklūzijas (Mouhieddine & de Leiris, 1993), bet neietekmē išēmijas-reperfūzijas izsuktā nekrotiskā bojājuma lielumu (Briet et al., 2008). Tajā pašā laikā ir zināms, ka karnitīna samazinājums, ko izraisījusi ilgstoša (līdz pat 12 nedēļām) nātrija pivalāta lietošana, izsauc sirds kreisā kambara disfunkciju (Broderick, 2006), bet mildronāta lietošanas ietekmē samazinātā

karnitīna koncentrācija ir kardioprotektīva (Dambrova et al., 2002; Liepinsh et al., 2006; Sesti et al., 2006). Iepriekšējos pētījumos arī atrasts, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts korelē ar karnitīna biosintēzes prekursora GBB koncentrācijas palielināšanos (Liepinsh et al., 2006). Tā kā gan karnitīna, gan mildronāta lietošana izraisa GBB koncentrācijas palielināšanos, tad īpaši pētījām kardioprotektīvā efekta saistību ar GBB koncentrācijas izmaiņām asins plazmā un sirds audos.

Mildronāta 14 dienu ilga lietošana samazināja karnitīna koncentrāciju sirds audos par 69%, kā arī statistiski ticami samazināja infarkta lielumu par 34%. Lietojot mildronāta un karnitīna kombināciju, karnitīna koncentrācija sirds audos nesamazinājās, bet infarkta lielums bija praktiski līdzīgs kā kontroles grupā (28. attēls). Karnitīna lietošana palielināja tā koncentrāciju sirds audos par 28% (13. attēls), kā arī nedaudz samazināja infarkta lielumu, tomēr šis efekts nebija statistiski ticams. Sirds darbības parametri starp grupām bija vienādi gan normoksijas, gan išēmijas un reperfūzijas laikā (5. tabula). Tas liecina, ka vielu ietekme uz infarkta lielumu nav saistāma ar izmaiņām sirds veiktajā darbā.

Lai gan mildronāta 4, 8 un 12 nedēļu lietošana (100, 200 un 400 mg/kg) ievērojami samazināja karnitīna koncentrāciju, sirds darbības funkcionālie parametri *ex vivo* (7. tabula) nevienā no grupām neatšķīrās, salīdzinot ar kontroles grupu. Arī sirds darbības rādītāji *in vivo* (6. tabula) neatšķīrās no kontroles grupas normoksijas apstākļos.

Mildronāts izraisa GBB koncentrācijas palielināšanos, kavējot GBBH katalizēto GBB pārvēršanu par karnitīnu (Simkhovich et al., 1988), bet, lietojot karnitīnu, GBB koncentrācija palielinās (Sartorelli et al., 1989) gan kavētās GBBH katalizētās reakcijas dēļ (Wehbie et al., 1988), gan saistībā ar GBB resintēzi no karnitīna kuņģa-zarnu trakta mikrofloras ietekmē (Rebouche et al., 1984). Mūsu pētījumā gan pēc karnitīna, gan mildronāta lietošanas GBB koncentrācija palielinājās asins plazmā un sirds audos. Visizteiktāk GBB koncentrācija palielinājās pēc karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošanas (14. attēls), tomēr šajā grupā nesamazinājās infarkta lielums.

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 I aktivitātes samazināšanos (15. attēls), kas kavē taukskābju metabolismu (1. tabula), bet, ņemot vērā iepriekšējo pētījumu rezultātus, stimulē arī glikozes izmantošanu, jo kompensatori palielinās tās metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresija un aktivitāte (Broderick, 2006; Liepinsh et al., 2008).

4.3. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hipertensijas attīstību

Virknē pētījumu konstatēts, ka hipertensija ir miokarda infarkta riska faktors (Girerd & Giral, 2004) un tā veicina arī endoteliālās disfunkcijas (Hirooka et al., 2008) un aterosklerozes attīstību (Biswas et al., 2003). Vienlaicīgi ir vairāki pētījumi par to, ka karnitīna lietošana spēj aizkavēt ar hipertensiju saistīto komplikāciju attīstību (Bueno et al., 2005; de Sotomayor et al., 2007). Līdzīga antiaterosklerotiska un angioprotektīva iedarbība ir mildronātam (Liepinsh et al., 2009; Vilskersts et al., 2009). Mēs pētījuma laikā salīdzinājām karnitīna (100 mg/kg), mildronāta (100 mg/kg) un abu vielu kombinācijas (100 un 100 mg/kg) 8 nedēļu ilgstošas lietošanas ietekmi uz hipertensijas izraisīto komplikāciju attīstību *Dahl* sāls-jutīgo (DS) žurku modelī.

DS žurkām, kas saņēma barību ar palielinātu sāls saturu (PS, 8% NaCl), izteikta hipertensija attīstījās jau pēc 4 nedēļām (39. attēls). Pēc 8 nedēļām attīstījās sirds hipertrofija (9. tabula), tomēr sirds mazspēju nekonstatēja nevienā no grupām, dodot iespēju pārbaudīt karnitīna un mildronāta terapijas ietekmi uz hipertensijas izraisītajām komplikācijām.

PS kontroles žurkām, salīdzinot ar NS žurkām, aptuveni 2 reizes samazinājās karnitīna koncentrācija asins plazmā (8. tabula). Tas varētu būt saistīts ar pastiprinātu karnitīna ekskreciju ar urīnu nieru bojājumu dēļ. Šādu bojājumu attīstība novērota vairākos pētījumos (Forde et al., 2003; Zhu et al., 2009). Karnitīna lietošana pilnībā novērsa tā koncentrācijas samazināšanos žurkām, kuras saņēma barību ar palielinātu sāls saturu. Arī karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana daļēji novērsa karnitīna koncentrācijas samazināšanos (8. tabula). Mildronāta lietošana ievērojami samazināja karnitīna koncentrāciju, ļaujot novērtēt gan neizmainītas, gan ievērojami pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz hipertensijas izraisīto komplikāciju attīstību. Līdzīgi kā *Wistar* žurkās, arī DS žurkās lietotās vielas palielināja GBB koncentrāciju asins plazmā (8. tabula), pie tam visizteiktāk karnitīna un mildronāta kombinācijas grupā.

PS kontroles DS žurkām bija ievērojami augstāka mirstība nekā NS grupas DS žurkām. Karnitīna un mildronāta kombinācija būtiski samazināja mirstību (38. attēls). Tā kā sirds funkcionālie parametri un plaušu/ķermeņa masas indekss starp grupām neatšķīrās, tad iespējama nāves cēlonis varētu būt saistīts ar palielinātu insulta risku, jo iepriekš ir atrasts, ka DS žurkām ir augsta mirstība no insulta (Lin et al., 1999). DS žurkām attīstās arī izteikta sirds kreisā kambara hipertrofija (Zhou et al., 2003), kas ir miokarda infarkta un

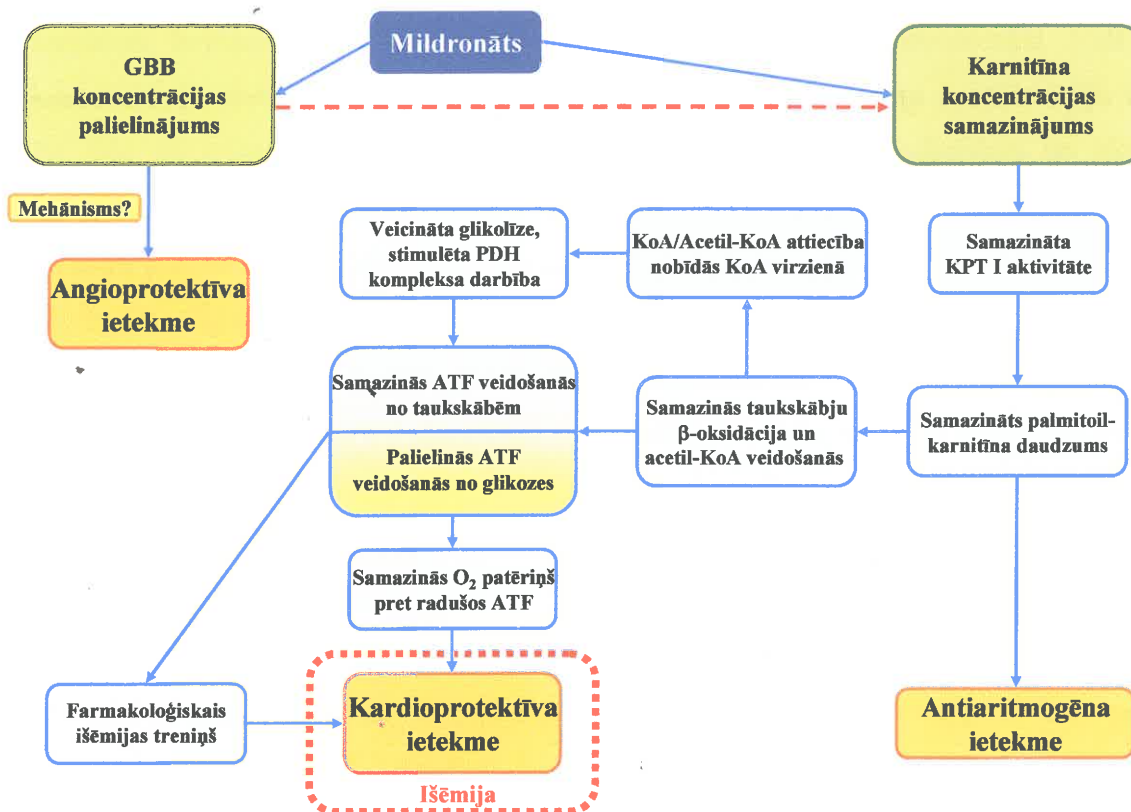
sirds kambaru letālu aritmiju riska faktors (Messerli, 1999), it īpaši, ņemot vērā, ka DS žurkām ir palielināts kambaru tahikardijas risks (Kamei et al., 2007).

Mūsu pētījuma rezultāti *Wistar* žurku modelī liecina, ka mildronātam piemīt antiaritmiska iedarbība, samazinot kopējo dažādas izcelsmes aritmiju attīstības biežumu (34. un 36. attēls), kā arī samazinot laiku, līdz normalizējas sinusa ritms (33. attēls), un kopējo aritmiju ilgumu (35. attēls). Tā kā uzskata, ka acilkarnitīnu uzkrāšanās ir saistīta ar aritmiju attīstību (Bonnet et al., 1999), tad visticamāk mildronāta antiaritmogēnā iedarbība saistīta ar samazināto KPT I aktivitāti (29. attēls), ko izraisa samazinātā karnitīna koncentrācija sirdī (7. un 13. attēls). Rezultātā samazinās acilkarnitīnu koncentrācija sirds audos, tādējādi novēršot to aritmogēno ietekmi. Tā kā arī karnitīnam piemīt antiaritmiskas īpašības (Najafi et al., 2008), tad iespējams tieši šo efektu dēļ karnitīna un mildronāta kombinācija ticami samazina DS žurku mirstību (38. attēls).

Ir zināms, ka sirds ritma paātrināšanās ir saistīta ar mirstības pieaugumu gan normotensijas, gan hipertensijas apstākļos, turklāt mirstības risks šādā gadījumā ir vienāds vai pat lielāks nekā paaugstināta holesterīna līmeņa, asinsspiediena vai smēķēšanas ietekmē (Palatini, 2008). Līdzīgi novērojumi bija arī mūsu pētījumos, jo PS kontroles žurkām pēc 8 nedēļām ticami paātrinājās sirds ritms (40. attēls), kā arī bija vislielākā mirstība, salīdzinot ar NS grupas žurkām (38. attēls). Karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana novērsa sirds ritma paātrināšanos, kā arī ticami samazināja mirstību (38. attēls). Mildronāta lietošana arī novērsa sirds ritma paātrināšanos, tomēr mirstību ticami samazināt nespēja ($0,05 < p < 0,06$, salīdzinot ar PS kontroles grupu). Iegūtie rezultāti liecina, ka samazināto mirstību kombinācijas grupā (38. attēls) var saistīt ar abu savienojumu iepriekš aprakstīto kardiovaskulāro sistēmu aizsargājošo iedarbību.

Hipertensijas izraisīto endotēlija disfunkciju saista gan ar kardiovaskulāro notikumu biežumu, gan orgānu bojājumu attīstību (Perticone et al., 2001; Xu et al., 2009). Mūsu pētījuma ietvaros izvērtējām mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekmi uz endotēlija disfunkcijas attīstību izolētā DS žurku aortas gredzenu modelī. Lai gan agrākos pētījumos novēroja atsevišķus mildronāta un karnitīna angioprotektīvos efektus (Vilskersts et al., 2009), mēs endotēlija funkcijas uzlabošanos konstatējām tikai karnitīna un mildronāta kombinācijas grupā (41. attēls). Pastāv hipotēze, ka endotēlija disfunkcijas attīstības kavēšana ir saistīta ar tiešu aizsargājošo ietekmi uz endotēliju, nevis ar asinsspiedienu samazinošu iedarbību (Schiffrin, 1998; Tzemos et al., 2001). Mūsu iegūtie rezultāti saskan ar šo hipotēzi, jo, lai gan karnitīna mildronāta kombinācija nesamazināja asinsspiedienu (39. attēls), tomēr kavēja endotēlija disfunkcijas attīstību (41. attēls).

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem un literatūras datiem, piedāvājam iespējamo mildronāta izraisītā karnitīna koncentrācijas samazinājuma un GBB koncentrācijas palielinājuma kardioprotektīvo mehānismu (43. attēls).



43. attēls. Iespējamais mildronāta izraisītā karnitīna koncentrācijas samazinājuma kardioprotektīvais mehānisms.

Interesanti ir tas, ka GBB koncentrācijas izmaiņas korelē ar kardioprotekciju išēmijas-reperfūzijas eksperimentālā žurku modelī pēc mildronāta lietošanas (Liepinsh et al., 2006), savukārt mūsu rezultāti liecina, ka šis efekts tomēr ir atkarīgs no karnitīna koncentrācijas samazinājuma (28. attēls). Toties viens no ticamākajiem karnitīna un mildronāta kombinācijas angioprotektīvā efekta skaidrojumiem ir saistīts ar GBB koncentrācijas palielināšanos, jo gan karnitīns, gan mildronāts un it īpaši abu kombinācija palielina GBB koncentrāciju. Tā kā tieši kombinācijas grupā GBB koncentrācija palielinājās visvairāk (14. attēls) un vienlaicīgi bija izteiktākā aizsardzība pret hipertensijas komplikācijām (38. un 41. attēls), tad varētu domāt, ka GBB ir būtiska loma šo efektu sasniegšanā. Vienlaicīgi šie dati vedina domāt, ka GBB angioprotektīvā darbība varētu uzlabot ar karnitīna samazinājumu saistītos kardioprotektīvos efektus, tomēr eksperimentāls pierādījums šādai hipotēzei vēl jāmeklē.

5. Secinājumi

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

6. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes

Promocijas darbs ietver sekojošas publikācijas recenzējamās starptautiskajos izdevumos:

1. Jaudzems K., **Kuka J.**, Gutsaits A., Zinovjevs K., Kalvinsh I., Liepinsh E., Liepinsh E., Dambrova M. Inhibition of carnitine acetyltransferase by mildronate, a regulator of energy metabolism. *J Enzyme Inhib Med Chem*, **2009**; 24(6):1269-1275.
2. Vilskersts R., Liepinsh E., **Kuka J.**, Cirule H., Veveris M., Kalvinsh I., Dambrova M. Myocardial infarct size-limiting and anti-arrhythmic effects of mildronate orotate in the rat heart. *Cardiovasc Drug Ther*, **2009**; 23(4):281-288.
3. Liepinsh E., **Kuka J.**, Svalbe B., Vilskersts R., Skapare E., Cirule H., Pugovics O., Kalvinsh I., Dambrova M. Effects of long-term mildronate treatment on cardiac and liver functions in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **2009**; 105(6):387-394.
4. Vilskersts R., **Kuka J.**, Svalbe B., Cirule H., Liepinsh E., Grinberga S., Kalvinsh I., Dambrova M. Administration of L-carnitine and mildronate improves endothelial function and decreases mortality in hypertensive Dahl rats. Apstiprināta publicēšanai (*Pharmacological Reports*, **2011**; 63(3)).
5. **Kuka J.**, Vilskersts R., Cirule H., Makrecka M., Pugovics O., Kalvinsh I., Dambrova M., Liepinsh E. The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine in an isolated rat heart infarction model. Iesniegts manuskripts žurnālā *International Journal of Cardiology*.

Publikācijas vietējos izdevumos:

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

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās starptautiskās konferencēs:

1. **Kuka J.**, Vilskersts R., Vavers E., Liepinsh E., Dambrova M. Effects of regulation of L-carnitine concentration in experimental heart infarction model, *Frontiers in CardioVascular Biology*, Berlin, Germany, July 16-19, **2010**. Abstracts, S.134.
2. Vilskersts R., **Kuka J.**, Svalbe B., Liepinsh E., Dambrova M. Protective effects of L-carnitine and mildronate in salt-induced hypertension, *Frontiers in CardioVascular Biology*, Berlin, Germany, July 16-19, **2010**. Abstracts, S.54.
3. **Kuka J.**, Skapare E., Liepinsh E., Dambrova M. Effects of L-carnitine availability on carnitine palmitoyltransferase I activity in vivo, *MiPsummer School on Mitochondrial Physiology 2010*, Druskininkai, Lithuania, June 10-16, **2010**. Abstracts, P.9.
4. **Kuka J.**, Zinovjevs K., Skapare E., Liepinsh E. Characterization of mildronate as an inhibitor of carnitine acetyltransferase. *FEBS 2009 Congress: Life's Molecular Interactions*, Prague, Czech Republic, July 4-9, **2009**. Abstracts, P.322.

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

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās Latvijas mēroga konferencēs:

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

7. Pateicības

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

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

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

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

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

Paldies par finansiālo atbalstu pētījumu veikšanai AS „Grindeks”, kā arī AS „Grindeks” fondam „Zinātnes un izglītības atbalstam”. Materiālu iegāde veikta Valsts pētījumu programmas „Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai” apakšprojekta „Diabēta komplikāciju izpēte un kardiovaskulāro preparātu bioloģiskā aktivitāte” ietvaros.

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



8. Izmantotā literatūra

1. 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):429-438.
2. Amin KA, Nagy MA. Effect of Carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetol Metab Syndr*, 2009; 1(1):17-30.
3. Baillet L, Mullur RS, Esser V, McGarry JD. Elucidation of the mechanism by which (+)-acylcarnitines inhibit mitochondrial fatty acid transport. *J Biol Chem*, 2000; 275(47):36766-36768.
4. Baliutyte G, Baniene R, Trumbeckaite S, Borutaite V, Toleikis A. Effects of Ginkgo biloba extract on heart and liver mitochondrial functions: mechanism(s) of action. *J Bioenerg Biomembr*, 2010; 42(2):165-172.
5. Bartuś M, Łomnicka M, Kostogryś RB, Kaźmierczak P, Watała C, Słominska EM, Smoleński RT, Pisulewski PM, Adamus J, Gebicki J, Chłopicki S. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol Rep*, 2008; 60(1):127-138.
6. Beadle RM, Frenneaux M. Modification of myocardial substrate utilisation: a new therapeutic paradigm in cardiovascular disease. *Heart*, 2010; 96(11):824-830.
7. Benton CR, Holloway GP, Campbell SE, Yoshida Y, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Spriet LL, Bonen A. Rosiglitazone increases fatty acid oxidation and fatty acid translocase (FAT/CD36) but not carnitine palmitoyltransferase I in rat muscle mitochondria. *J Physiol*, 2008; 586(6):1755-1766.
8. Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem*, 1988; 57:261-283.
9. Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ. Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J*, 1999; 13(8):805-812.
10. Bird MI, Saggerson ED. Binding of malonyl-CoA to isolated mitochondria. Evidence for high- and low-affinity sites in liver and heart and relationship to inhibition of carnitine palmitoyltransferase activity. *Biochem J*, 1984; 222(3):639-647.
11. Biswas S, Dastidar DG, Roy KS, Pal SK, Biswas TK, Ganguly SB. Complications of hypertension as encountered by primary care physician. *J Indian Med Assoc*, 2003; 101(4):257-259.
12. Bloomer RJ, Farney TM, Trepanowski JF, McCarthy CG, Canale RE, Schilling BK. Comparison of pre-workout nitric oxide stimulating dietary supplements on skeletal muscle oxygen saturation, blood nitrate/nitrite, lipid peroxidation, and upper body exercise performance in resistance trained men. *J Int Soc Sports Nutr*, 2010; 7:16-30.
13. Bonnefont JP, Bastin J, Laforêt P, Aubey F, Mogenet A, Romano S, Ricquier D, Gobin-Limballe S, Vassault A, Behin A, Eymard B, Bresson JL, Djouadi F. Long-term follow-up of bezafibrate treatment in patients with the myopathic form of carnitine palmitoyltransferase 2 deficiency. *Clin Pharmacol Ther*, 2010; 88(1):101-108.
14. Bonnefont JP, 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(5-6):495-520.

15. Bonnet D, Martin D, Pascale De Lonlay, Villain E, Jouvet P, Rabier D, Brivet M, Saudubray JM. Arrhythmias and conduction defects as presenting symptoms of fatty acid oxidation disorders in children. *Circulation*, 1999; 100(22):2248-2253.
16. Bouchireb K, Teychene AM, Rigal O, de Lonlay P, Valayannopoulos V, Gaudelus J, Sellier N, Bonnefont JP, Brivet M, de Pontual L. Post-mortem MRI reveals CPT2 deficiency after sudden infant death. *Eur J Pediatr*, 2010; 169(12):1561-1563.
17. Brass EP. Carnitine and sports medicine: use or abuse? *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:67-78.
18. Brass EP. Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man. *Pharmacol Rev*, 2002; 54(4):589-598.
19. Briet F, Keith M, Leong-Poi H, Kadakia A, Aba-Alkhail K, Giliberto JP, Stewart D, Errett L, Mazer CD. Triple nutrient supplementation improves survival, infarct size and cardiac function following myocardial infarction in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008; 18(10):691-699.
20. Broadway NM, Pease RJ, Birdsey G, Shayeghi M, Turner NA, David Saggerson E. The liver isoform of carnitine palmitoyltransferase 1 is not targeted to the endoplasmic reticulum. *Biochem J*, 2003; 370(Pt 1):223-231.
21. Broderick TL. Hypocarnitinaemia induced by sodium pivalate in the rat is associated with left ventricular dysfunction and impaired energy metabolism. *Drugs R D*, 2006; 7(3):153-161.
22. Brown NF, Weis BC, Husti JE, Foster DW, McGarry JD. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem*, 1995; 270(15):8952-8957.
23. Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA, Kraegen EW. 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):550-558.
24. Brucknerova I, Bzduch V, Behulova D, Ferianec V, Dubovicky M, Ujhazy E, Mach M. Reversible asphyxial status in a newborn due to neonatal form of carnitine palmitoyltransferase II deficiency. *Neuro Endocrinol Lett*, 2008; 29(5):627-630.
25. Bruno IJ, Cole JC, Lommerse JP, Rowland RS, Taylor R, Verdonk ML. IsoStar: a library of information about nonbonded interactions. *J Comput Aided Mol Des*, 1997; 11(6):525-537.
26. Bueno R, Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero C, Gomez-Amores L, Vazquez CM, Herrera MD. L-carnitine and propionyl-L-carnitine improve endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: different participation of NO and COX-products. *Life Sci*, 2005; 77(17):2082-2097.
27. Busch AE, Quester S, Ulzheimer JC, Waldegger S, Gorboulev V, Arndt P, Lang F, Koepsell H. Electrogenic properties and substrate specificity of the polyspecific rat cation transporter rOCT1. *J Biol Chem*, 1996; 271(51):32599-32604.
28. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D'Iddio S, Giordano V, Koverech A, Amato A, Brass EP. Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:52-66.
29. Campbell SE, Tandon NN, Woldegiorgis G, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem*, 2004; 279(35):36235-36241.
30. Chabowski A, Coort SL, Calles-Escandon J, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Insulin stimulates fatty acid transport by regulating expression of

- FAT/CD36 but not FABPpm. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004; 287(4): E781-E789.
31. Chabowski A, Górski J, Glatz JF, P Luiken JJ, Bonen A. Protein-mediated Fatty Acid Uptake in the Heart. *Curr Cardiol Rev*, 2008; 4(1):12-21.
 32. Cook GA, Edwards TL, Jansen MS, Bahouth SW, Wilcox HG, Park EA. Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase-I gene isoforms (CPT-I alpha and CPT-I beta) in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2001; 33(2): 317-329.
 33. Cordente AG, López-Viñas E, Vázquez MI, Swiegers JH, Pretorius IS, Gómez-Puertas P, Hegardt FG, Asins G, Serra D. Redesign of carnitine acetyltransferase specificity by protein engineering. *J Biol Chem*, 2004; 279(32):33899-33908.
 34. Cui J, Das DK, Bertelli A, Tosaki A. Effects of L-carnitine and its derivatives on postischemic cardiac function, ventricular fibrillation and necrotic and apoptotic cardiomyocyte death in isolated rat hearts. *Mol Cell Biochem*, 2003; 254(1-2): 227-234.
 35. Dambrova M, Cirule H, Svalbe B, Zvejniece L, Pugovichs O, Zorenko T, Kalvinsh I, Liepinsh E, Belozertseva I. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance. *Physiol Behav*, 2008; 95(3):341-347.
 36. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 2002; 12(6):275-279.
 37. Davis AT, Monroe TJ. Carnitine deficiency and supplementation do not affect the gene expression of carnitine biosynthetic enzymes in rats. *J Nutr*, 2005; 135(4):761-764.
 38. de Sotomayor MA, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Marhuenda E, Herrera MD. L-carnitine and its propionate: improvement of endothelial function in SHR through superoxide dismutase-dependent mechanisms. *Free Radic Res*, 2007; 41(8):884-891.
 39. Degrace P, Demizieux L, Du ZY, Gresti J, Caverot L, Djaouti L, Jourdan T, Moindrot B, Guillard JC, Hocquette JF, Clouet P. Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem*, 2007; 282(29):20816-20826.
 40. Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Tsoko M, André A, Demaison L, Clouet P. Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. *Mol Cell Biochem*, 2004; 258(1-2):171-182.
 41. Demarquoy J, Georges B, Rigault C, Royer MC, 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):137-142.
 42. Dhar PK, Grupp IL, Schwartz A, Grupp G, Matlib MA. Reduction of Carnitine Content by Inhibition of Its Biosynthesis Results in Protection of Isolated Guinea Pig Hearts Against Hypoxic Damage. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 1996; 1(3):235-242.
 43. Diaz R, Lorita J, Soley M, Ramirez I. Carnitine worsens both injury and recovery of contractile function after transient ischemia in perfused rat heart. *J Physiol Biochem*, 2008; 64(1):1-8.
 44. DiMauro S, DiMauro PM. Muscle carnitine palmityltransferase deficiency and myoglobinuria. *Science*, 1973; 182(115):929-931.
 45. DiRusso CC, Darwis D, Obermeyer T, Black PN. Functional domains of the fatty acid transport proteins: studies using protein chimeras. *Biochim Biophys Acta*, 2008; 1781(3):135-143.

46. Distler AM, Kerner J, Hoppel CL. 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):431-437.
47. Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet*, 2003; 42(11):941-967.
48. Farrell SO, Fiol CJ, Reddy JK, Bieber LL. Properties of purified carnitine acyltransferases of mouse liver peroxisomes. *J Biol Chem*, 1984; 259(21):13089-13095.
49. Ferdinandusse S, Mulders J, IJlst L, Denis S, Dacremont G, Waterham HR, Wanders RJ. Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 263(1):213-218.
50. Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G, Mele D, Fucili A, Ceconi C. Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1033:79-91.
51. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Muñoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacín M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A. Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem*, 1997; 272(11):7085-7092.
52. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*, 2010; 7:30-43.
53. Forde P, Scribner AW, Dial R, Loscalzo J, Trolliet MR. Prevention of hypertension and renal dysfunction in Dahl rats by alpha-tocopherol. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003; 42(1):82-88.
54. Fornasini G, Upton RN, Evans AM. A pharmacokinetic model for L-carnitine in patients receiving haemodialysis. *Br J Clin Pharmacol*, 2007; 64(3):335-345.
55. Foster DW. The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1033:1-16.
56. Fujita M, Nakanishi T, Shibue Y, Kobayashi D, Moseley RH, Shirasaka Y, Tamai I. Hepatic Uptake of γ -Butyrobetaine, a Precursor of Carnitine Biosynthesis, in Rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009; 297(4):G681-G686.
57. Georges B, Le Borgne F, Galland S, Isoir M, Ecosse D, Grand-Jean F, Demarquoy J. Carnitine transport into muscular cells. Inhibition of transport and cell growth by mildronate. *Biochem Pharmacol*, 2000; 59(11):1357-1363.
58. Girerd X, Giral P. Risk stratification for the prevention of cardiovascular complications of hypertension. *Curr Med Res Opin*, 2004; 20(7):1137-1142.
59. Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev*, 2010; 90(1):367-417.
60. González-Ortiz M, Hernández-González SO, Hernández-Salazar E, Martínez-Abundis E. Effect of oral L-carnitine administration on insulin sensitivity and lipid profile in type 2 diabetes mellitus patients. *Ann Nutr Metab*, 2008; 52(4):335-338.
61. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*, 1985; 28(7):849-857.
62. Govindasamy L, Kukar T, Lian W, Pedersen B, Gu Y, Agbandje-McKenna M, Jin S, McKenna R, Wu D. Structural and mutational characterization of L-carnitine binding to human carnitine acetyltransferase. *J Struct Biol*, 2004; 146(3):416-424.

63. Greenberg CR, Dilling LA, Thompson GR, Seargeant LE, Haworth JC, Phillips S, Chan A, Vallance HD, Waters PJ, Sinclair G, Lillquist Y, Wanders RJ, Olpin SE. The paradox of the carnitine palmitoyltransferase type Ia P479L variant in Canadian Aboriginal populations. *Mol Genet Metab*, 2009; 96(4):201-207.
64. Grigat S, Fork C, Bach M, Golz S, Geerts A, Schömig E, Gründemann D. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate. *Drug Metab Dispos*, 2009; 37(2):330-337.
65. Grube M, Meyer zu Schwabedissen HE, Präger D, Haney J, Möritz KU, Meissner K, Rosskopf D, Eckel L, Böhm M, Jedlitschky G, Kroemer HK. Uptake of cardiovascular drugs into the human heart: expression, regulation, and function of the carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5). *Circulation*, 2006; 113(8): 1114-1122.
66. Gründemann D, Gorboulev V, Gambaryan S, Veyhl M, Koepsell H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature*, 1994; 372(6506):549-552.
67. Gulewitsch W, Krimberg R. Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung. Über das Carnitin. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1905; 45:326.
68. Guzmán-Ruiz R, Somoza B, Gil-Ortega M, Merino B, Cano V, Attané C, Castan-Laurell I, Valet P, Fernández-Alfonso MS, 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):1010-1018.
69. Hamed SA, Abdella MM. The risk of asymptomatic hyperammonemia in children with idiopathic epilepsy treated with valproate: relationship to blood carnitine status. *Epilepsy Res*, 2009; 86(1):32-41.
70. Hanaki Y, Sugiyama S, Ozawa T. Effect of 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate, gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on isoproterenol-induced mitochondrial dysfunction. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1989; 64(1):157-160.
71. Hathcock JN, Shao A. Risk assessment for carnitine. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006; 46(1):23-28.
72. Hayashi Y, Ishida H, Hoshiai M, Hoshiai K, Kirimoto T, Kanno T, Nakano M, Tajima K, Miyake H, Matsuura N, Nakazawa H. MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, improves cardiac SR Ca²⁺ uptake activity in rats with congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*, 2000; 209(1-2):39-46.
73. Hayashi Y, Kirimoto T, Asaka N, Nakano M, Tajima K, Miyake H, Matsuura N. Beneficial effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor in rats with heart failure following myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*, 2000; 395(3):217-224.
74. Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Ito K, Sunagawa K. Effects of valsartan or amlodipine on endothelial function and oxidative stress after one year follow-up in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 2008; 30(3):267-276.
75. Hmelnickis J, Pugovics O, Kazoka H, Viksna A, Susinskis I, Kokums K. Application of hydrophilic interaction chromatography for simultaneous separation of six impurities of mildronate substance. *J Pharm Biomed Anal*, 2008; 48(3): 649-656.
76. Holden PR, Tugwood JD. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences. *J Mol Endocrinol*, 1999; 22(1):1-8.

77. Holloway GP, Lally J, Nickerson JG, Alkhateeb H, Snook LA, Heigenhauser GJ, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, Spriet LL, Bonen A. Fatty acid binding protein facilitates sarcolemmal fatty acid transport but not mitochondrial oxidation in rat and human skeletal muscle. *J Physiol*, 2007; 582(Pt 1):393-405.
78. Holness MJ, Sugden MC. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 2003; 31(Pt 6):1143-1151.
79. Hothi DK, Geary DF, Fisher L, Chan CT. Short-term effects of nocturnal haemodialysis on carnitine metabolism. *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21(9):2637-2641.
80. Hulse JD, Ellis SR, Henderson LM. Carnitine biosynthesis. beta-Hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. *J Biol Chem*, 1978; 253(5):1654-1659.
81. Iliceto S, Scrutinio D, Bruzzi P, D'Ambrosio G, Boni L, Di Biase M, Biasco G, Hugenholz PG, Rizzon P. Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico (CEDIM) Trial. *J Am Coll Cardiol*, 1995; 26(2):380-387.
82. Jensen PR, Peitersen T, Karlsson M, In 't Zandt R, Gisselsson A, Hansson G, Meier S, Lerche MH. Tissue-specific short chain fatty acid metabolism and slow metabolic recovery after ischemia from hyperpolarized NMR in vivo. *J Biol Chem*, 2009; 284(52):36077-36082.
83. Ji S, You Y, Kerner J, Hoppel CL, Schoeb TR, Chick WS, Hamm DA, Sharer JD, Wood PA. Homozygous carnitine palmitoyltransferase 1b (muscle isoform) deficiency is lethal in the mouse. *Mol Genet Metab*, 2008; 93(3):314-322.
84. Jogl G, Hsiao YS, Tong L. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1033:17-29.
85. Kamei K, Maehara K, Kimura J, Ishibashi T, Maruyama Y. Comprehensive analyses of arrhythmogenic substrates and vulnerability to ventricular tachycardia in left ventricular hypertrophy in salt-sensitive hypertensive rats. *Circ J*, 2007; 71(3):390-396.
86. Kerbey AL, Randle PJ, Cooper RH, Whitehouse S, Pask HT, Denton RM. Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem J*, 1976; 154(2):327-348.
87. King KL, Stanley WC, Rosca M, Kerner J, Hoppel CL, Febbraio M. Fatty acid oxidation in cardiac and skeletal muscle mitochondria is unaffected by deletion of CD36. *Arch Biochem Biophys*, 2007; 467(2):234-238.
88. 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(2): 163-178.
89. Knudsen J, Neergaard TB, Gaigg B, Jensen MV, Hansen JK. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr*, 2000; 130(2S Suppl):294S-298S.
90. Koepsell H, Lips K, Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res*, 2007; 24(7):1227-1251.

91. 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(12):2247-2254.
92. Kuwajima M, Fujihara H, Sei H, Umehara A, Sei M, Tsuda TT, Sukeno A, Okamoto T, Inubushi A, Ueta Y, Doi T, Kido H. Reduced carnitine level causes death from hypoglycemia: possible involvement of suppression of hypothalamic orexin expression during weaning period. *Endocr J*, 2007; 54(6):911-925.
93. 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(1):93-102.
94. Lamhonwah AM, Tein I. Novel localization of OCTN1, an organic cation/carnitine transporter, to mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 345(4):1315-1325.
95. Lee RS, Lam CW, Lai CK, Yuen YP, Chan KY, Shek CC, Chan AY, Chow CB. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency in three neonates presenting with rapid deterioration and cardiac arrest. *Hong Kong Med J*, 2007; 13(1):66-68.
96. Leibovitz EB. L-Carnitine. The energy nutrient. Keets Publishing, Los Angeles, 1999, P11-12.
97. Lheureux PE, Hantson P. Carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity. *Clin Toxicol (Phila)*, 2009; 47(2):101-111.
98. Lheureux PE, Penaloza A, Zahir S, Gris M. Lheureux PE, Penaloza A, Zahir S, Gris M. *Crit Care*, 2005; 9(5):431-440.
99. Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D, Kirjanova O, Pugovichs O, Kalvinsh I, Dambrova M. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006; 48(6):314-319.
100. Liepinsh E, Vilskersts R, Skapare E, Svalbe B, Kuka J, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M. Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*, 2008; 83(17-18):613-619.
101. 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):1549-1556.
102. Lin KF, Chao J, Chao L. Atrial natriuretic peptide gene delivery reduces stroke-induced mortality rate in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, 1999; 33(1 Pt 2):219-224.
103. 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; 142C(2):77-85.
104. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schonekness BO. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart and disease. *Biochim Biophys Acta*, 1994; 1213:263-276.
105. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*, 2010; 90(1):207-258.
106. Löster H. Effects of L-Carnitine and its Derivatives –Studies on Isolated Hearts. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 2005; 136(8):1443-1466.

107. Luci S, Geissler S, König B, Koch A, Stangl GI, Hirche F, Eder K. PPARalpha agonists up-regulate organic cation transporters in rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 350(3):704-708.
108. Malaguarnera M, Vacante M, Avitabile T, Malaguarnera M, Cammalleri L, Motta M. L-Carnitine supplementation reduces oxidized LDL cholesterol in patients with diabetes. *Am J Clin Nutr*, 2009; 89(1):71-76.
109. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, 1997; 244(1):1-14.
110. McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J*, 1983; 214(1):21-28.
111. Meir K, Fellig Y, Meiner V, Korman SH, Shaag A, Nadjari M, Soffer D, Ariel I. Severe infantile carnitine palmitoyltransferase II deficiency in 19-week fetal sibs. *Pediatr Dev Pathol*, 2009; 12(6):481-486.
112. Mera P, Bentebibel A, López-Viñas E, Cordente AG, Gurunathan C, Sebastián D, Vázquez I, Herrero L, Ariza X, Gómez-Puertas P, Asins G, Serra D, García J, Hegardt FG. C75 is converted to C75-CoA in the hypothalamus, where it inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 and decreases food intake and body weight. *Biochem Pharmacol*, 2009; 77(6):1084-1095.
113. Messerli FH. Hypertension and sudden cardiac death. *Am J Hypertens*, 1999; 12(12 Pt 3):181S-188S.
114. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:99-107.
115. Morillas M, Clotet J, Rubí B, Serra D, Asins G, Ariño J, Hegardt FG. Identification of the two histidine residues responsible for the inhibition by malonyl-CoA in peroxisomal carnitine octanoyltransferase from rat liver. *FEBS Lett*, 2000; 466(1):183-186.
116. Morillas M, Gómez-Puertas P, Rubí B, Clotet J, Ariño J, Valencia A, Hegardt FG, Serra D, Asins G. Structural model of a malonyl-CoA-binding site of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase I: mutational analysis of a malonyl-CoA affinity domain. *J Biol Chem*, 2002; 277(13):11473-11480.
117. Mouhieddine S, de Leiris J. Cardioprotective effect of L-carnitine in rats submitted to permanent left coronary artery ligation. *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1993; 101(6):411-416.
118. Muegge I, Martin YC. A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach. *J Med Chem*, 1999; 42(5):791-804.
119. Müller-Nordhorn J, Binting S, Roll S, Willich SN. An update on regional variation in cardiovascular mortality within Europe. *Eur Heart J*, 2008; 29(10):1316-1326.
120. Murthy MS, Pande SV. Characterization of a solubilized malonyl-CoA-sensitive carnitine palmitoyltransferase from the mitochondrial outer membrane as a protein distinct from the malonyl-CoA-insensitive carnitine palmitoyltransferase of the inner membrane. *Biochem J*, 1990; 268(3):599-604.
121. Murthy MS, Pande SV. Mechanism of carnitine acylcarnitine translocase-catalyzed import of acylcarnitines into mitochondria. *J Biol Chem*, 1984; 259(14):9082-9089.
122. Najafi M, Garjani A, Maleki N, Eteraf Oskouei T. Antiarrhythmic and arrhythmogenic effects of L-carnitine in ischemia and reperfusion. *Bull Exp Biol Med*, 2008; 146(2):210-213.
123. Nakajima Y, Ito T, Maeda Y, Ichiki S, Sugiyama N, Mizuno M, Makino Y, Sugiura T, Kurono Y, Togari H. Detection of pivaloylcarnitine in pediatric patients

- with hypocarnitinemia after long-term administration of pivalate-containing antibiotics. *Tohoku J Exp Med*, 2010; 221(4):309-313.
124. Nakano M, Kirimoto T, Asaka N, Hayashi Y, Kanno T, Miyake H, Matsuura N. Beneficial effects of MET-88 on left ventricular dysfunction and hypertrophy with volume overload in rats. *Fundam Clin Pharmacol*, 1999; 13(5):521-526.
 125. Noland RC, Koves TR, Seiler SE, Lum H, Lust RM, Ilkayeva O, Stevens RD, Hegardt FG, Muoio DM. Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *J Biol Chem*, 2009; 284(34):22840-22852.
 126. Oey NA, van Vlies N, Wijburg FA, Wanders RJ, Attie-Bitach T, Vaz FM. L-carnitine is synthesized in the human fetal-placental unit: potential roles in placental and fetal metabolism. *Placenta*, 2006; 27(8):841-846.
 127. Olson AL, Rebouche CJ. gamma-Butyrobetaine hydroxylase activity is not rate limiting for carnitine biosynthesis in the human infant. *J Nutr*, 1987; 117(6):1024-1031.
 128. Oppedisano F, Fanello D, Calvani M, Indiveri C. Interaction of mildronate with the mitochondrial carnitine/acylcarnitine transport protein. *J Biochem Mol Toxicol*, 2008; 22(1):8-14.
 129. Palatini P. Heart rate as predictor of outcome. *Blood Press Monit*, 2008; 13(3):167-168.
 130. Palmieri F. Mitochondrial carrier proteins. *FEBS Lett*, 1994; 346(1):48-54.
 131. Pande SV. A mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975; 72(3):883-887.
 132. Paulson DJ, Ward KM, Shug AL. Malonyl CoA inhibition of carnitine palmitoyltransferase in rat heart mitochondria. *FEBS Lett*, 1984; 176(2):381-384.
 133. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*, 2001; 104(2):191-196.
 134. Peschechera A, Scalibastri M, Russo F, Giarrizzo MG, Carminati P, Giannessi F, Arduini A, Ricciolini R. Carnitine depletion in rat pups from mothers given mildronate: a model of carnitine deficiency in late fetal and neonatal life. *Life Sci*, 2005; 77(24):3078-3091.
 135. Pierre G, Macdonald A, Gray G, Hendriksz C, Preece MA, Chakrapani A. Prospective treatment in carnitine-acylcarnitine translocase deficiency. *J Inher Metab Dis*, 2007; 30(5):815. (Supplementary material: 1-4).
 136. Poorabbas A, Fallah F, Bagdadchi J, Mahdavi R, Aliasgarzadeh A, Asadi Y, Koushavar H, Vahed Jabbari M. Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. *Eur J Clin Nutr*, 2007; 61(7):892-895.
 137. Rajakumar C, Ban MR, Cao H, Young TK, Bjerregaard P, Hegele RA. 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):1223-1228.
 138. Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta*, 2001; 1546(1):21-43.
 139. Ramsay RR, Naismith JH. A snapshot of carnitine acetyltransferase. *Trends Biochem Sci*, 2003; 28(7):343-346.

140. Ramsay RR, Zammit VA. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Mol Aspects Med*, 2004; 25(5-6):475-493.
141. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1963; 1(7285):785-789.
142. Rahunova TM, Bauman VR, Kalvin'sh I. The cardioprotective action of carnitine and its structural analog 3-(2,2,2-trimethylhydrazine)propionate on cardiac energy metabolism in experimental occlusion of the coronary artery in rats. *Farmakol Toksikol*, 1989; 52(5):24-27.
143. Rebouche CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:30-41.
144. Rebouche CJ, Engel AG. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. *Biochim Biophys Acta*, 1980; 630(1):22-29.
145. Rebouche CJ, Mack DL, Edmonson PF. L-Carnitine dissimilation in the gastrointestinal tract of the rat. *Biochemistry*, 1984; 23(26):6422-6426.
146. Rebouche CJ. Carnitine. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th Edition (edited by Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross, AC). Lippincott Williams and Wilkins, New York, 1999, pp. 505-512.
147. Ringseis R, Eder K. Influence of pharmacological PPARalpha activators on carnitine homeostasis in proliferating and non-proliferating species. *Pharmacol Res*, 2009; 60(3):179-184.
148. Ringseis R, Wege N, Wen G, Rauer C, Hirche F, Kluge H, Eder K. Carnitine synthesis and uptake into cells are stimulated by fasting in pigs as a model of nonproliferating species. *J Nutr Biochem*, 2009; 20(11):840-847.
149. Robitaille PM, Rath DP, Abduljalil AM, O'Donnell JM, Jiang Z, Zhang H, Hamlin RL. Dynamic ¹³C NMR analysis of oxidative metabolism in the in vivo canine myocardium. *J Biol Chem*, 1993; 268(35):26296-26301.
150. Roche TE, Hiromasa Y, Turkan A, Gong X, Peng T, Yan X, Kasten SA, Bao H, Dong J. Essential roles of lipoyl domains in the activated function and control of pyruvate dehydrogenase kinases and phosphatase isoform 1. *Eur J Biochem*, 2003; 270(6):1050-1056.
151. Roe CR, Yang BZ, Brunengraber H, Roe DS, Wallace M, Garritson BK. Carnitine palmitoyltransferase II deficiency: successful anaplerotic diet therapy. *Neurology*, 2008; 71(4):260-264.
152. Ross NS, Hoppel CL. Partial muscle carnitine palmitoyltransferase-A deficiency. Rhabdomyolysis associated with transiently decreased muscle carnitine content after ibuprofen therapy. *JAMA*, 1987; 257(1):62-65.
153. Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Waterham HR, Wanders RJ. Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency, clinical, biochemical and genetic aspects. *Mol Aspects Med*, 2004; 25(5-6):521-532.
154. Saper RB, Eisenberg DM, Phillips RS. Common dietary supplements for weight loss. *Am Fam Physician*, 2004; 70(9):1731-1738.
155. Sartorelli L, Mantovani G, Ciman M. Carnitine and deoxycarnitine concentration in rat tissues and urine after their administration. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 1006(1):15-18.
156. Schaap FG, Binas B, Danneberg H, van der Vusse GJ, Glatz JF. Impaired long-chain fatty acid utilization by cardiac myocytes isolated from mice lacking the heart-type fatty acid binding protein gene. *Circ Res*, 1999; 85(4):329-337.

157. Schiffrin EL: Vascular remodeling and endothelial function in hypertensive patients: effects of antihypertensive therapy. *Scand Cardiovasc J Suppl*, 1998; 47:15-21.
158. Schneider R, Löster H, Aust W, Craatz S, Welt K, Fitzl G. Protective Effects of L-Carnitine on Myocardium of Experimentally Diabetic Rats with Additional Ischaemia and Reperfusion. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 2005; 136(8):1467-1481.
159. Schofield RS, Hill J. A. Role of metabolically active drugs in the management of ischemic heart disease. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2001; 1:23-35.
160. Schürch R, Todesco L, Novakova K, Mevissen M, Stieger B, Krähenbühl S. The plasma carnitine concentration regulates renal OCTN2 expression and carnitine transport in rats. *Eur J Pharmacol*, 2010; 635(1-3):171-176.
161. Semba S, Yasujima H, Takano T, Yokozaki H. Autopsy case of the neonatal form of carnitine palmitoyltransferase-II deficiency triggered by a novel disease-causing mutation del1737C. *Pathol Int*, 2008; 58(7):436-441.
162. Sesti C, Simkhovich BZ, Kalvinsh I, Kloner RA. Mildronate, a novel fatty acid oxidation inhibitor and antianginal agent, reduces myocardial infarct size without affecting hemodynamics. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006; 47(3):493-499.
163. Sharma S, Black SM. Carnitine homeostasis, mitochondrial function and cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech*, 2009; 6(1-4):e31-e39.
164. Shutenko ZhV, Simkhovich BZ, Meirena DV, Kalvin'sh I, Lukevics E. Regulation of carnitine-dependent metabolism of fatty acids in the rat myocardium using 3-(2,2,2-trimethylhydrazinium) propionate. *Vopr Med Khim*, 1989; 35(2):59-64.
165. Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Ureña J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N. CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem*, 2008; 283(11):6878-6885.
166. Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuķe RJ, Molodchina TN, Kalviņš IJ, Lukevics E. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium) propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 1988; 37(2):195-202.
167. Simkhovich BZ, Vitolinia RO, Stivrinia MI, Shutenko ZhV, Meirena DV. Prevention of ischemic myocardial damage by reducing the intracellular free carnitine level. *Kardiologija*, 1987; 27(7):85-88.
168. Smith WA, Fry AC, Tschume LC, Bloomer RJ. Effect of glycine propionyl-L-carnitine on aerobic and anaerobic exercise performance. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 2008; 18(1):19-36.
169. Soupene E, Kuypers FA. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008; 233(5):507-521.
170. Spaniol M, Brooks H, Auer L, Zimmermann A, Solioz M, Stieger B, Krähenbühl S. Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency. *Eur J Biochem*, 2001; 268(6):1876-1887.
171. Spaniol M, Kaufmann P, Beier K, Wüthrich J, Török M, Scharnagl H, März W, Krähenbühl S. Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res*, 2003; 44(1):144-153.
172. Spiegel R, Shaag A, Gutman A, Korman SH, Saada A, Elpeleg O, Shalev SA. Severe infantile type of carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency due to homozygous R503C mutation. *J Inherit Metab Dis*, 2007; 30(2):266. (Supplementary material: 1-3).

173. Srere PA, Brazil H, Gonen L. The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem Scand*, 1963; 17:(Suppl 1):S 129-134.
174. Stanley WC. Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2004; 9 Suppl 1:S31-45.
175. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*, 2005; 85(3):1093-1129.
176. Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, Sipula IJ, Brown NF, O'Doherty RM. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008; 294(5):E969-E977.
177. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol*, 2007; 581(Pt 2):431-444.
178. Strijbis K, Vaz FM, Distel B. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life*, 2010; 62(5):357-362.
179. Sugden MC. In appreciation of Sir Philip Randle: the glucose-fatty acid cycle. *Br J Nutr*, 2007; 97(5):809-813.
180. Sugden MC, Langdown ML, Harris RA, Holness MJ. Expression and regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms in the developing rat heart and in adulthood: role of thyroid hormone status and lipid supply. *Biochem J*, 2000; 352(Pt 3):731-738.
181. Taegtmeier H, King LM, Jones BE. Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. *Am J Cardiol*, 1998; 82(5A):54K-60K.
182. Taegtmeier H. Metabolism--the lost child of cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 36(4):1386-1388.
183. Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem*, 1998; 273(32):20378-20382.
184. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett*, 1997; 419(1):107-111.
185. Tarantini G, Scrutinio D, Bruzzi P, Boni L, Rizzon P, Iliceto S. Metabolic treatment with L-carnitine in acute anterior ST segment elevation myocardial infarction. A randomized controlled trial. *Cardiology*, 2006; 106(4):215-23.
186. Tars K, Rumnieks J, Zeltins A, Kazaks A, Kotelovica S, Leonciks A, Saripo J, Viksna A, Kuka J, Liepinsh E, Dambrova M. Crystal structure of human gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 398(4):634-639.
187. Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J, Demarquoy J, Clouet P. Hypolipidaemic effects of fenofibrate are not altered by mildronate-mediated normalization of carnitine concentration in rat liver. *Biochimie*, 1998; 80(11):943-948.
188. Tsoko M, Beauseigneur F, Gresti J, Niot I, Demarquoy J, Boichot J, Bezard J, Rochette L, Clouet P. Enhancement of activities relative to fatty acid oxidation in the liver of rats depleted of L-carnitine by D-carnitine and a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 1995; 49(10):1403-1410.
189. Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, Cameron-Smith D. Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002; 283(1):E66-72.
190. Tzemos N, Lim PO, MacDonald TM. Nebivolol reverses endothelial dysfunction in essential hypertension: a randomized, double-blind, crossover study. *Circulation*, 2001; 104(5):511-514.

191. Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting malonyl CoA inhibition of mitochondrial fatty acid uptake as an approach to treat cardiac ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol*, 2009; 104(2):203-210.
192. van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res*, 2000; 45(2):279-293.
193. van Knegsel AT, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reprod Nutr Dev*, 2005; 45(6):665-688.
194. van Vlies N, Ofman R, Wanders RJ, Vaz FM. Submitochondrial localization of 6-N-trimethyllysine dioxygenase - implications for carnitine biosynthesis. *FEBS J*, 2007; 274(22):5845-5851.
195. Vaz FM, Fouchier SW, Ofman R, Sommer M, Wanders RJ. Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J Biol Chem*, 2000; 275(10):7390-7394.
196. Vaz FM, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J*, 2002; 361(Pt 3):417-429.
197. Ventura FV, Ijlst L, Ruiter J, Ofman R, Costa CG, Jakobs C, Duran M, Tavares de Almeida I, Bieber LL, Wanders RJ. Carnitine palmitoyltransferase II specificity towards beta-oxidation intermediates--evidence for a reverse carnitine cycle in mitochondria. *Eur J Biochem*, 1998; 253(3):614-618.
198. Vilskersts R, Liepinsh E, Mateuszuk L, Grinberga S, Kalvinsh I, Chlopicki S, Dambrova M. Mildronate, a regulator of energy metabolism, reduces atherosclerosis in apoE/LDLR-/- mice. *Pharmacology*, 2009; 83(5):287-293.
199. Wang W, Lopaschuk GD. Metabolic therapy for the treatment of ischemic heart disease: reality and expectations. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007; 5(6):1123-1134.
200. Wang Y, Kelly MA, Cowan TM, Longo N. A missense mutation in the OCTN2 gene associated with residual carnitine transport activity. *Hum Mutat*, 2000; 15(3):238-245.
201. 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):2356-2360.
202. Wehbie RS, Punekar NS, Lardy HA. Rat liver gamma-butyrobetaine hydroxylase catalyzed reaction: influence of potassium, substrates, and substrate analogues on hydroxylation and decarboxylation. *Biochemistry*, 1988; 27(6):2222-2228.
203. Westin MA, Hunt MC, Alexson SE. Short- and medium-chain carnitine acyltransferases and acyl-CoA thioesterases in mouse provide complementary systems for transport of beta-oxidation products out of peroxisomes. *Cell Mol Life Sci*, 2008; 65(6):982-990.
204. Wilcke M, Hultenby K, Alexson SE. Novel peroxisomal populations in subcellular fractions from rat liver. Implications for peroxisome structure and biogenesis. *J Biol Chem*, 1995; 270(12):6949-6958.
205. Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J*, 1998; 329(Pt 1):197-201.
206. Wu X, George RL, Huang W, Wang H, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V. Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1466(1-2):315-327.

207. Xu JZ, Zhang Y, Wu SN, Niu WQ, Zhu DL, Gao PJ. Impaired endothelial function in hypertensive patients with target organ damage. *J Hum Hypertens*, 2009; 23(11):751-757.
208. 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(5):343-348.
209. Zammit VA, Ramsay RR, Bonomini M, Arduini A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009; 61(14):1353-1362.
210. Zhou MS, Adam AG, Jaimes EA, Raj L. In salt-sensitive hypertension, increased superoxide production is linked to functional upregulation of angiotensin II. *Hypertension*, 2003; 42(5):945-951.
211. Zhu A, Yoneda T, Demura M, Karashima S, Usukura M, Yamagishi M, Takeda Y. Effect of mineralocorticoid receptor blockade on the renal renin-angiotensin system in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *J Hypertens*, 2009; 27(4):800-805.