



Jānis Kūka

**Karnitīna sistēmas
regulācijas loma
kardioprotekcijā**

**The regulation of
carnitine system for
cardioprotection**

Promocijas darba kopsavilkums
Specialitāte – farmācijas ķīmija

Summary of doctoral thesis
Speciality – Pharmacy (Pharmaceutical chemistry)

Rīga, 2011

PRK-3860

468491



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

JĀNIS KŪKA

**KARNITĪNA SISTĒMAS REGULĀCIJAS LOMA
KARDIOPROTEKCIJĀ**

KOPSAVILKUMS

PROMOCIJAS DARBS
farmācijas doktora grāda iegūšanai
Specialitāte – Farmācijas ķīmija

Rīga, 2011

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. pharm. **Maija Dambrova**

Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas
laboratorijas vadītāja

Dr. chem. **Renāte Medne**

Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas ķīmijas katedras vadītāja

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. biol., profesore **Ruta Muceniece**, Latvijas Universitāte

Dr. biol., vad. pētnieks **Andrejs Šķesters**, Rīgas Stradiņa universitāte

MD, Ph.D., profesors **Boris Z. Simkhovich**, Good Samaritan Hospital
(ASV)

Promocijas darba aizstāvēšana paredzēta 2011. gada 17. maijā
plkst.14.00 Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas promocijas padomes
atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

Promocijas padomes priekšsēdētājs:

Profesors, Dr. habil. chem. **Ivars Kalviņš**

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. pharm. **Anna Vītola**

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



Doktorantūras programmas eksperimentālā daļa veikta Latvijas
Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā.



Saturs/Content

1. Pētījuma aktualitāte	5
2. Darba mērķis	6
3. Darba uzdevumi	6
4. Darba zinātniskā novitāte	6
5. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes	7
6. Materiāli un metodes	8
6.1. <i>In vitro</i> metodes.....	9
6.2. <i>Ex vivo</i> un <i>in vivo</i> metodes	10
7. Rezultāti	11
7.1. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā un audos	11
7.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz enzīmu aktivitāti un audu un asins plazmas bioķīmiskajiem parametriem	14
7.3. Mildronāta ietekme uz KrAT	17
7.4. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu	19
7.5. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hemodinamikas rādītājiem <i>Wistar</i> žurkās.....	21
7.6. Mildronāta un mildronāta orotāta ietekme uz aritmiju attīstību	21
7.7. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz hipertensijas attīstību <i>Dahl</i> sāls-jūtīgajās žurkās.....	23
8. Diskusija.....	27
8.1. Karnitīna koncentrācijas samazināšanas ietekme uz sirds funkcionālajiem rādītājiem un asins plazmas un audu bioķīmiskajiem parametriem	27
8.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu	31
8.3. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hipertensijas attīstību.....	32
9. Secinājumi.....	35
10. Pateicības.....	36
11. Topicality of the problem	39
12. Aim of the study	40
13. Objectives of the study	40
14. Novelty of the study	40
15. Approbation of the study.....	41
16. Materials and methods.....	42
16.1. <i>In vitro</i> methods	43
16.2. <i>Ex vivo</i> and <i>in vivo</i> methods	44
17. Results	45

17.1. Effects of mildronate and carnitine treatment on GBB, mildronate and carnitine concentrations in plasma and tissues	45
17.2. Effects of changes in carnitine concentration on enzyme activity and biochemical measures in blood plasma and tissues	48
17.3. Characterization of mildronate binding to CrAT	51
17.4. Effect of changes in carnitine concentration on infarct size	53
17.5. Effects of changes in carnitine concentrations on <i>Wistar</i> rat haemodynamic measurements.....	55
17.6. Anti-arrhythmic effects of mildronate and mildronate orotate.	55
17.7. Effects of treatment with mildronate and carnitine on hypertension in <i>Dahl</i> salt-sensitive rats.....	57
18. Discussion	61
18.1. Effects of decreased carnitine concentration on heart function and blood plasma and tissue biochemical parameters	61
18.2. Effect of changes in carnitine concentration on infarct size	65
18.3. Effects of changes in carnitine concentration on the development of hypertension	66
19. Conclusions	69
20. Acknowledgements	70
21. Literatūras saraksts/References	71

1. Pētījuma aktualitāte

Sirds-asinsvadu sistēmas saslimšanas 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 saslimšanas.

Muskuļu šūnas enerģijas iegūšanai izmanto gan taukskābes, gan ogļhidrātus. Pēc to uzņemšanas šūnās notiek specifiski katabolisma procesi, kuros veidojas šūnu enerģijas avots – adenoziņa 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 (Beadle & Frenneaux, 2010). 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.

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 metabolismā procesos atklāja jau pirms 50 gadiem 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 varētu izprast tā izmantošanas iespējas klīnikā sirds-asinsvadu saslimšanu ārstēšanas jomā.

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

2. Darba mērķis

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

3. Darba uzdevumi

- Pētīt ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz sirds un aknu funkcionalitāti un lipīdu profila izmaiņām audos un 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.

4. 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 sirdsdarbības 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 izsauktā 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.

5. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes

Promocijas darbs ietver sekojošas publikācijas recenzējamos 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):1269-75.
2. 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):387-94.
3. 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):281-8.
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. Pieņemts publicēšanai (*Pharmacological Reports*, 2011; 63(3)).
5. **Kuka J.**, Vilskersts R., Cirule H., Makrecka M., Pugovics O., Kalvinsh I., Dambrova M., Liepinsh E. Treatment with L-carnitine diminishes the cardioprotective effect of mildronate 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, S134.
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, S54.
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 P2-05, 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. Abstracts, **2008**, P.88.

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās Latvijas mēroga konferencēs:

1. Vāvers E., **Kuka 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. **Kuka 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.

6. Materiāli un metodes

Eksperimentiem izmantoja pieaugušus *Wistar* līnijas (RSU Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Latvija) un *Dahl* sāls-juftīgās (DS) līnijas (*Charles River*, Vācija) žurku tēviņus. 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 100, 200 un 400 mg/kg vadīja perorāli *Wistar* žurkām. Kardioprotektīvā efekta izvērtēšanai karnitīnu 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 100 mg/kg un mildronāta orotātu 200 mg/kg *Wistar* žurkas saņēma kopā ar dzeramo ūdeni. *Dahl* sāls-jutīgās žurkas karnitīnu 100 mg/kg, mildronātu 100 mg/kg un abu vielu kombināciju 100 un 100 mg/kg saņēma kopā ar dzeramo ūdeni.

6.1. *In vitro* metodes

6.1.1. Karnitīna, GBB un mildronāta noteikšana audos un plazmā

Mildronāta, GBB un karnitīna koncentrācijas noteikšanai asins plazmā un sirds un aknu audos izmantoja UPLC/MS/MS analīzi (Dambrova et al., 2008).

6.1.2. Bioķīmisko parametru mērījumi

Brīvo taukskābju, triglicerīdu, glikozes, ketonvielu, LDL-C, HDL-C, laktāta koncentrācijas, ALAT, ASAT, ALP aktivitātes un kopējā bilirubīna daudzuma mērījumiem izmantoja *Wako* un *Instrumentation Laboratory* (IL) reaģentu komplektus atbilstoši ražotāja instrukcijām.

KrAT aktivitāti noteica gan izolētos *Wistar* žurku sirds mitohondrijos, gan izmantojot attīrītu baložu krūšu muskuļu enzīmu (*Sigma*, ASV). Mitohondrijos izolēja pēc literatūrā aprakstītas metodes (Wilcke et al., 1995). Reakcijas norises apstākļi: 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) izmantoja, tikai pārbaudot tā mijiedarbību ar attīrīto KrAT. KPT I aktivitāti noteica gan aknu un sirds audu homogenātā, gan arī izolētos mitohondrijos. Reakcijas norises apstākļi: DTNB (0,675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2,5 mM), palmitoil-koenzīms A (0,05 mM) un atbilstošās karnitīna koncentrācijas. Elpošanas mērījumus veica saskaņā ar literatūrā aprakstītu metodi (Baliutyte et al., 2010). Elpošanas buferšķīdums saturēja 40 μM palmitoil-koenzīma A vai 36 μM palmitoil-karnitīna vai 5 mM piruvāta un 5 mM malāta.

6.1.3. Molekulārās dinamikas skaitļošana mildronāta un KrAT mijiedarbības raksturošanai

Molekulārās dinamikas skaitļošanai par mildronāta saistīšanos KrAT aktīvajā centrā izmantoja MOE2007.09 programnodrošinājumu (*Chemical Computing Group, Inc., Kanāda*).

6.2. *Ex vivo* un *in vivo* metodes

6.2.1. Hemodinamikas parametri *in vivo*

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

6.2.2. Langendorffa izolētās žurku sirds infarkta modelis

Infarktu eksperimentu veikšanai izmantoja literatūrā aprakstīto metodi (Liepinsh et al., 2006). No iegūtajiem rezultātiem aprēķināja nekrozes lielumu pret kopējo riska zonas lielumu. Kontroles vērtības pieņēma 100% un pārējos rezultātus attiecīgi pārrēķināja.

6.2.3. Eksperimentālie žurku aritmiju modeļi

Lai novērtētu mildronāta ietekmi uz išēmijas-reperfūzijas izraisītajām sirds aritmijām, izmantoja *Wistar* žurkas, kuras anestezēja ar nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg *i/p*). Pēc traheotomijas 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 zem sirds kreisās lejupejošās koronārās artērijas. Izmantojot Chart 5.5 programmu, reģistrēja EKG no otrā standartnovadījuma. Pēc 20 minūšu adaptācijas kreiso lejupejošo koronāro artēriju uz 10 minūtēm okludēja, kam sekoja 30 minūšu reperfūzija. Lai novērtētu mildronāta ietekmi uz kalcija hlorīda izraisītajām aritmijām, izmantoja *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 atgriežas normāls sirds ritms, kreisā kambara tahikardiju un fibrilāciju skaita biežums un ilgums.

6.2.4. Sāls inducētās hipertensijas modelis *Dahl* žurkās

DS žurku endoteliālo funkciju noteica izolētās aortās, izmantojot izolēto orgānu vanniņu (Bartuš et al., 2008). DS žurku sirds anatomijas un funkcijas novērtēšanai izmantoja iE33 ultrasonogrāfu (*Philips Ultrasound, Inc.*). Žurkas anestezēja ar ketamīna ksilazīna maisījumu (50 un 10 mg/kg *i/p*) un sirds kreisā kambara mērījumus veica M-režīmā.

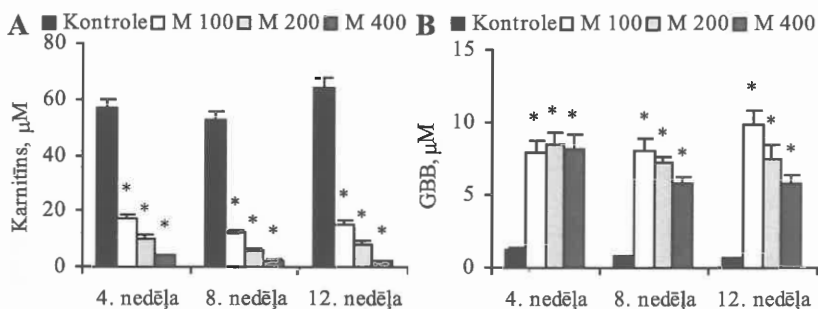
6.2.5. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datu apkopošanu un sistematizāciju veica ar vispārpieņemtām statistikas metodēm, izmantojot programmas *Microsoft Excel 2003* un *GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc.)*. Rezultātus uzskatīja par ticamiem, ja $p < 0,05$. Grupu salīdzināšanai lietoja Manna-Vitnija vai Stjūdenta t-testu, vai atbilstošu dispersijas analīzes metodi ar sekojošu pēctestu (Bonferoni, Tukija tests). Dzīvildzes līknes DS žurkām ieguva ar Kaplana-Meiera metodi. Aritmiju biežuma starpību starp grupām analizēja, izmantojot hī kvadrāta (χ^2) testu.

7. Rezultāti

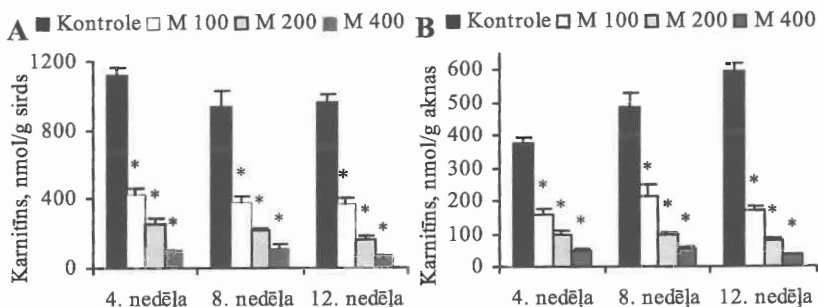
7.1. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā un audos

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 (1.A attēls); tā pēc 12 nedēļām karnitīna koncentrācija samazinājās 35 reizes. Mildronāts GBB koncentrāciju palielināja pat par 14 reizēm, tomēr šīs izmaiņas neietekmēja ne terapijas ilgums, ne deva (1.B attēls).



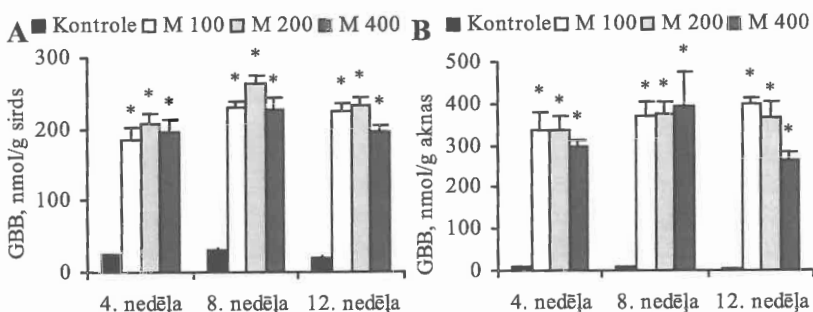
1. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz karnitīna (A) un GBB (B) koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku asins plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Wistar žurku sirds un aknu audos ilgstoša mildronāta lietošana karnitīna koncentrāciju samazināja atkarībā no devas lieluma, bet lietošanas ilguma ietekmi uz karnitīna koncentrācijas samazināšanos novēroja, ja mildronāta deva bija 200 mg/kg (2. attēls).



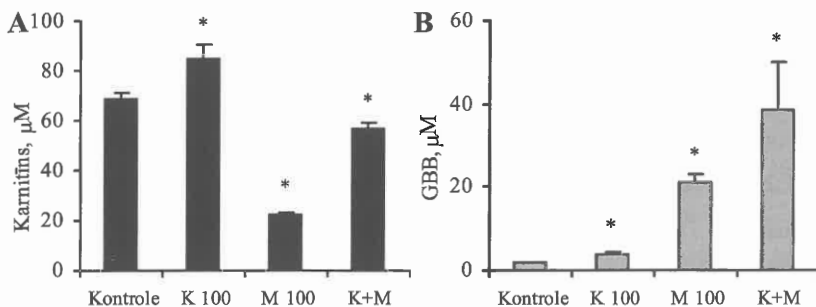
2. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz karnitīna koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds (A) un aknu (B) audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

Sirds audos GBB koncentrācija palielinājās līdz 10 reizēm (3.A attēls), bet aknu audos pat līdz 66 reizēm (3.B attēls), tomēr līdzīgi kā asins plazmā arī šīs izmaiņas neietekmēja ne terapijas ilgums, ne deva.



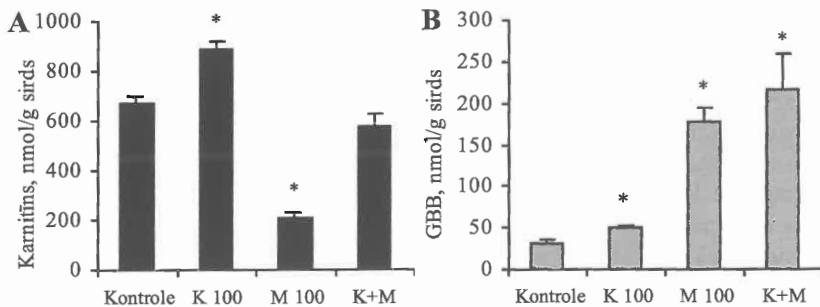
3. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz GBB koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds (A) un aknu (B) audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

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 ietekme uz karnitīna un GBB plazmas koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurkām parādīta 4. attēlā. 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 koncentrāciju asins plazmā par 18% (4.A attēls). Karnitīna lietošana GBB koncentrāciju asins plazmā palielināja tikai 2 reizes, bet mildronāts un abu vielu kombinācija attiecīgi 10 un 20 reizes (4.B attēls).



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

Sirds audos, līdzīgi kā asins plazmā, karnitīna lietošana tā koncentrāciju palielināja par 31%. Mildronāta lietošana karnitīna koncentrāciju sirdī pazemināja tieši tāpat kā plazmā, 3 reizes, savukārt karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana karnitīna koncentrāciju neietekmēja (5.A attēls). Karnitīna lietošana GBB koncentrāciju sirds audos palielināja 2 reizes, bet mildronāts un abu vielu kombinācija palielināja attiecīgi 6 un 7 reizes (5.B attēls).

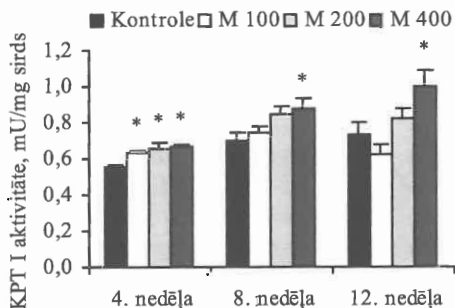


5. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz karnitīna (A) un GBB (B) koncentrācijas izmaiņām *Wistar* žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta *t*-tests, $p < 0,05$).

7.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz enzīmu aktivitāti un asu un asins plazmas bioķīmiskajiem parametriem

7.2.1. Ietekme uz KPT I aktivitāti

6. attēlā parādīta ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz KPT I aktivitāti *Wistar* žurku sirds audos.



6. 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, $p < 0,05$).

Enzīma aktivitāti noteica asu homogenātos pēc mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas 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 tikai, ja ievadīta mildronāta lielākā deva, attiecīgi par 25% un 35%. Aknu audu homogenātos statistiski ticamas KPT I aktivitātes izmaiņas pēc ilgstošas mildronāta lietošanas nenovēroja.

7.2.2. 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 parādīti 1. tabulā. Mildronāta lietošana samazināja mitohondriju elpošanu ar palmitoil-koenzīmu A, bet praktiski neietekmēja elpošanu ar palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu. Mildronāta un karnitīna kombinācijas lietošana stimulēja mitohondriju elpošanu ar palmitoil-karnitīnu un piruvātu/malātu.

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	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*

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos ±SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).

7.2.3. Ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem

Ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme 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 parādīta 2. tabulā.

2. tabula

Karnitīna koncentrācijas samazināšanās ietekme uz aknu funkcionalitātes un patoloģiju marķieriem *Wistar* žurku asins plazmā

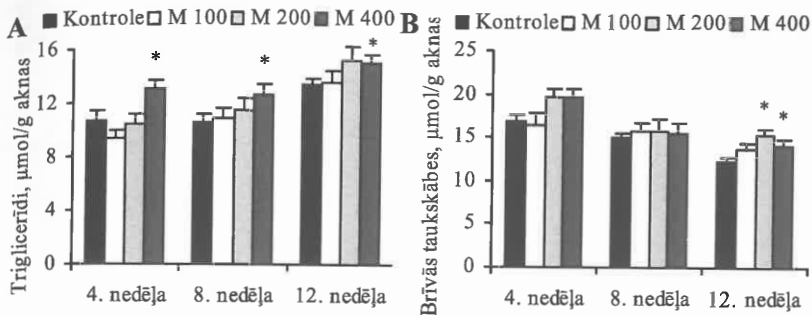
	Kontrole	M 100	M 200	M 400
4. nedēļa				
ASAT, U/l	49.0±3.8	46.5±6.2	48.2±5.8	43.1±4.4
ALAT, U/l	20.6±1.6	19.5±0.6	19.4±1.7	19.9±1.0
ALP, U/l	33.5±3.2	29.8±3.2	34.0±2.9	35.7±3.1
Kop. bilirubīns, mg/dl	0.39±0.17	0.27±0.09	0.17±0.02	0.29±0.05
8. nedēļa				
ASAT, U/l	39.7±3.2	38.2±3.9	41.7±5.1	37.3±3.3
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
Kop. 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*
Kop. bilirubīns, mg/dl	0.23±0.04	0.20±0.03	0.24±0.02	0.19±0.02

*Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos ±SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, p<0,05).*

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.

7.2.4. Ietekme uz lipīdu profilu aknu audos

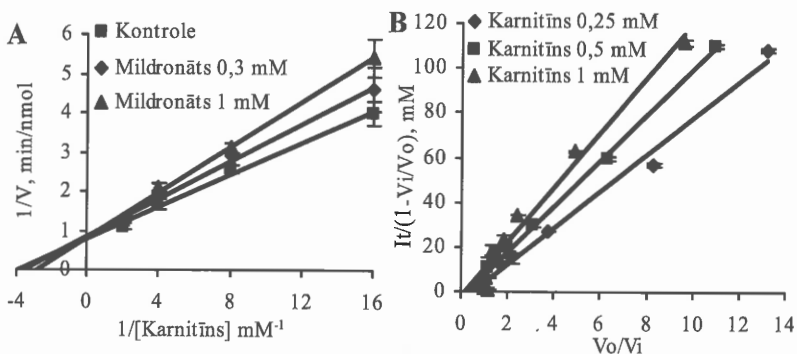
Ilgstoši pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekme uz triglicerīdu un brīvo taukskābju koncentrāciju *Wistar* žurku aknu audos parādīta 7. attēlā. Triglicerīdu koncentrācija aknu audos ticami palielinājās attiecīgi par 21%, 20% un 12% pēc 4, 8 un 12 nedēļām tikai tām žurkām, kas saņēma lielāko mildronāta devu 400 mg/kg (7.A attēls). Savukārt taukskābju koncentrācija aknu audos ticami palielinājās pēc 12 nedēļām tikai tām žurkām, kas saņēma mildronāta devas 200 un 400 mg/kg (7.B attēls).



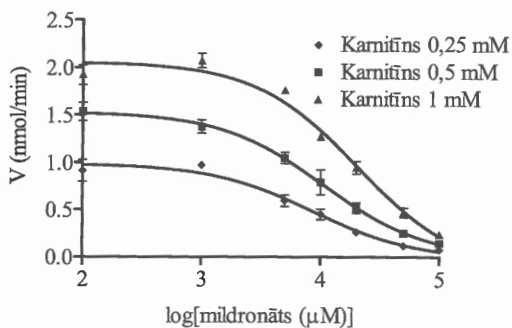
7. attēls. Mildronāta ilgstošas lietošanas ietekme uz triglicerīdu (A) un brīvo taukskābju (B) koncentrāciju Wistar žurku aknu audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 8–10 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $p < 0,05$).

7.3. Mildronāta ietekme uz KrAT

Mildronāta mijiedarbību ar KrAT *in vitro* noteica, izmantojot attīrītu enzīmu (*Columba sp.*). Lai gan mildronāts konkurējoši samazina enzīma aktivitāti (8. attēls), tomēr ir vājš inhibitors (9. attēls), jo tā K_i vērtība saistībā ar KrAT karnīfina klātbūtnē ir $5,2 \pm 0,6$ mM.

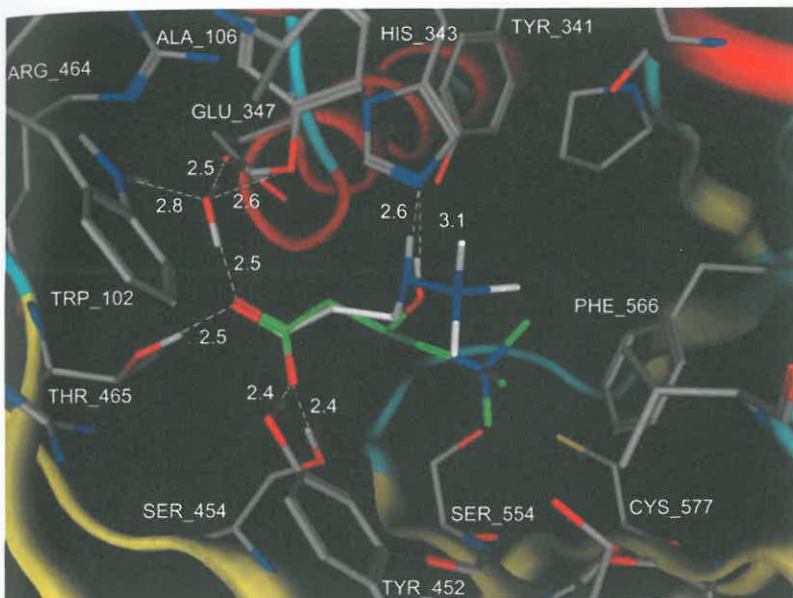


8. attēls. Linevēvera-Burka (A) un Hendersona (B) kinētikas shēmas mildronāta mijiedarbības ar KrAT raksturošanai. Katrs punkts ir vidējais no 3 mērījumiem \pm SEM. I_t -inhibitora koncentrācija; V_0 -reakcijas ātrums bez inhibitora; V_t -reakcijas ātrums inhibitora klātienē.



9. attēls. *KrAT* aktivitāte atkarībā no mildronāta koncentrācijas, izmantojot 3 dažādas karnitīna koncentrācijas. 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 10. attēlā. Gandrīz identisks ir karnitīna un mildronāta karboksilgrupas un α -CH₂ grupas novietojums; savukārt KrAT katalītiskais His-343 veido ūdeņražašaites ar karnitīna hidroksilgrupu, bet mildronāta gadījumā ar NH grupu. Šis atšķirīgās saistības ar His-343 rezultātā, būtiski atšķiras trimetilamonija grupas novietojums; ja karnitīna gadījumā trimetilamonija grupa ir iegremdēta KrAT aktīvā centra hidrofobajā kabatā, tad mildronāta gadījumā tā ir vērsta prom no proteīna virsmas.

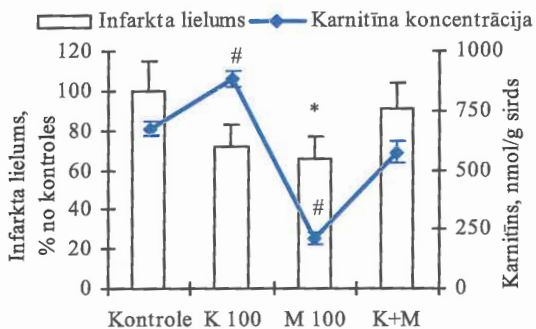


10. attēls. Modelis karnitīna un mildronāta saistībai ar KrAT. Karnitīna C atomi attēloti zaļā, bet mildronāta C atomi gaiši pelēkā krāsā. Attēloti tikai tie H atomi, kas piedalās ūdeņraža saišu veidošanā. Ūdeņraža saites attēlotas ar raustītu balto līniju. Attēls iegūts ar MOE2007.09.

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 14 dienu perorālas lietošanas izraisītās karnitīna koncentrācijas izmaiņas sirds audos, kā arī mildronāta klātbūtne neietekmēja KrAT aktivitāti *in vivo*.

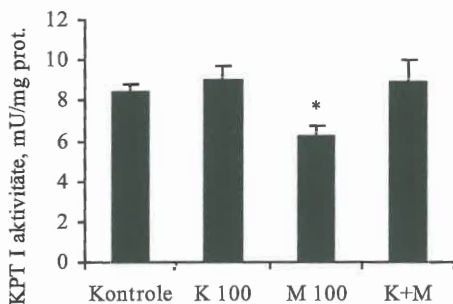
7.4. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 14 dienu perorālas lietošanas ietekme uz infarkta lielumu un atbilstošā karnitīna koncentrācija *Wistar* žurku sirds audos parādīta 11. attēlā. Lai gan karnitīna lietošana infarkta lielumu samazināja 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 praktiski neietekmēja karnitīna koncentrāciju sirds audos, kā arī būtiski neietekmēja infarkta lielumu.



11. 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 (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).

12. attēlā parādīta karnitīna koncentrācijas izmaiņu (5.A attēls) ietekme uz KPT I aktivitāti sirds mitochondrijos pēc mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu perorālas lietošanas. Pēc mildronāta lietošanas KPT I aktivitāte samazinājās par 26%.



12. attēls. Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 14 dienu lietošanas ietekme uz KPT I aktivitāti Wistar žurku sirds mitochondrijos. 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 (5.A attēls). Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 5 dzīvniekos \pm SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).

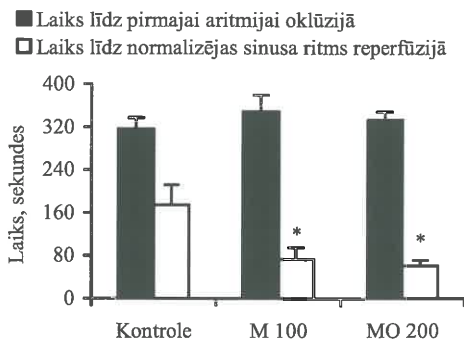
7.5. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hemodinamikas rādītājiem *Wistar* žurkās

Mildronāta (devas 100, 200 un 400 mg/kg) 4, 8 un 12 nedēļu perorālas lietošanas rezultātā samazinātā karnitīna koncentrācija sirds audos neietekmēja hemodinamikas rādītājus (sirds ritmu, koronāro plūsmu, LVDP, sirds kontraktilitāti un relaksācijas spēju, kā arī sirds darbu) izolētās sirdīs.

7.6. Mildronāta un mildronāta orotāta ietekme uz aritmiju attīstību

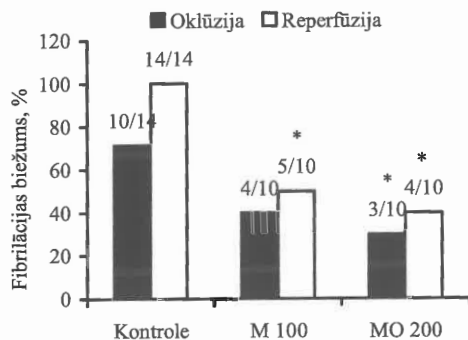
7.6.1. Ietekme uz išēmijas-reperfūzijas izraisītajām aritmijām

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



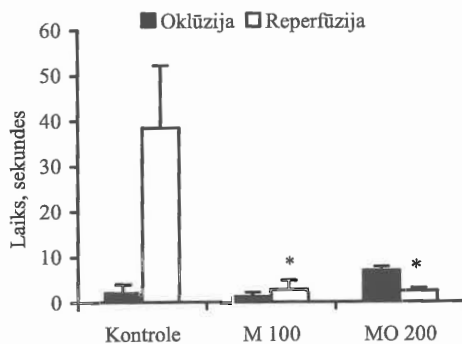
13. attēls. Mildronāta un mildronāta orotāta 14 dienu lietošanas ietekme uz laiku, līdz attīstās aritmijas oklūzijā, un laiku, līdz atjaunojās normāls sinusa ritms reperfūzijā *Wistar* žurkām. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 6 dzīvniekos ±SEM. * statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas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

Lai gan mildronāts un mildronāta orotāts neietekmēja tahikardijas biežumu oklūzijas un reperfūzijas laikā, tomēr mildronāts ticami samazināja sirds kambaru fibrilācijas biežumu reperfūzijas laikā, bet mildronāta orotāts gan oklūzijas, gan reperfūzijas laikā (14. attēls).



14. 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, $p < 0,05$).

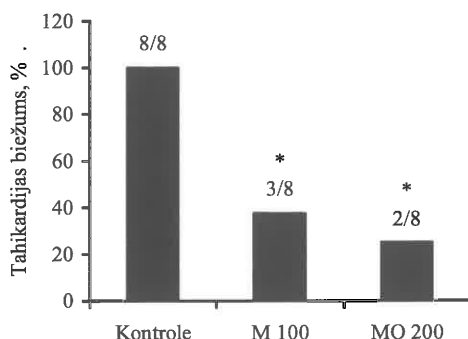
Mildronāts un mildronāta orotāts ievērojami samazināja kopējo sirds kambaru fibrilācijas laiku reperfūzijā (attiecīgi 3 ± 2 s un 2 ± 2 s, salīdzinot ar 38 ± 14 s kontroles grupā), bet neietekmēja to oklūzijas laikā (15. attēls).



15. 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, $p < 0,05$).

7.6.2. 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 tahikardijas biežumu *Wistar* žurkās (16. attēls).



16. 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*, $p < 0,05$).

7.7. Mildronāta un karnitīna lietošanas ietekme uz hipertensijas attīstību *Dahl* sāls-jūtīgajās žurkās

7.7.1. Ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju asins plazmā

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) 8 nedēļu perorālas lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB plazmas koncentrācijas izmaiņām *Dahl* žurkās parādīta 3. 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 un 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 abu vielu kombinācijas lietošanas ietekmē GBB koncentrācija palielinājās attiecīgi 6, 1,5 un 12 reizes, salīdzinot ar PS kontroli.

3. tabula

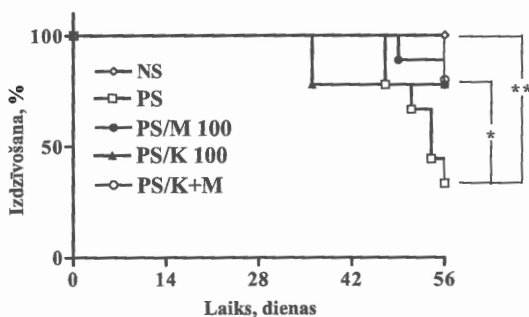
Mildronāta, karnitīna un to kombinācijas 8 nedēļu lietošanas ietekme uz karnitīna un GBB koncentrāciju *Dahl* žurku asins plazmā

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

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 3–10 dzīvniekos $\pm\text{SEM}$.
* statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas; # statistiski ticami atšķiras no PS/M 100 grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$).

7.7.2. Ietekme uz izdzīvošanu

Mildronāta (100 mg/kg), karnitīna (100 mg/kg) un to kombinācijas (100+100 mg/kg) ilgstošas lietošanas ietekme uz *Dahl* žurku izdzīvošanu parādīta 17. attēlā.



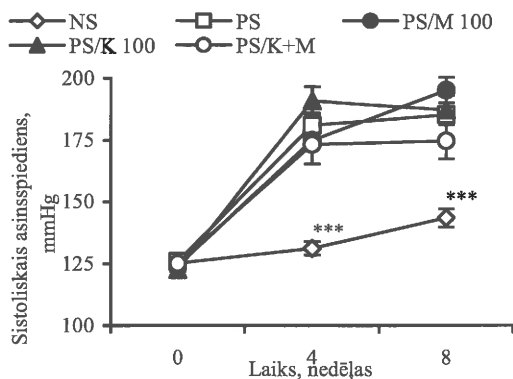
17. attēls. Kaplana-Meiera *Dahl* žurku izdzīvošanas analīzes shēma mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekmes izvērtēšanai. *, ** statistiski ticami atšķiras no PS kontroles grupas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

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) dzīvnieku, bet NS grupā nāves gadījumu nebija. Karnitīna un 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% (8 no 10) dzīvnieku, tomēr šie efekti nebija statistiski ticami, salīdzinot ar kontroli.

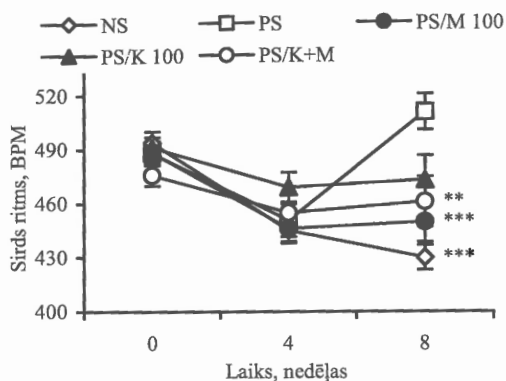
7.7.3. Ietekme uz sistolisko asinsspiedienu un sirds ritmu

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 (18. attēls).



18. 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, $p < 0,001$).

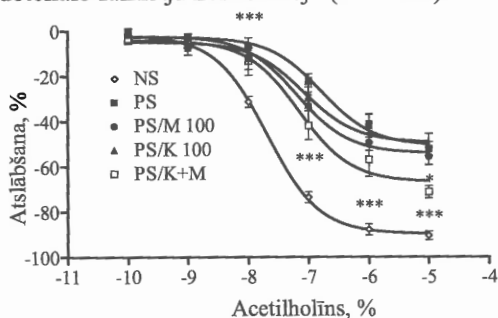
Sirds ritms neatšķīrās starp grupām gan eksperimenta sākumā, gan arī pēc 4 nedēļām. Toties pēc 8 nedēļām PS kontroles grupā sirds ritms palielinājās, sasniedzot 510 ± 10 sitienus minūtē, bet NS, kā arī mildronāta (PS/M 100) un kombinācijas (PS/K+M) grupās sirds ritms bija statistiski ticami zemāks attiecīgi par 16, 12 un 10% (19. attēls).



19. 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, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

7.7.4. 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 karnitīns un mildronāts atsevišķi endoteliālo funkciju neietekmēja (20. attēls).



20. 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, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

8. Diskusija

Promocijas darbs veltīts pētījumiem par karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekmi uz sirds-asinsvadu sistēmas funkcionalitāti normoksijas un išēmijas apstākļos. Karnitīna koncentrācijas izmaiņas panāktas, lietojot gan karnitīnu, gan mildronātu. Pētījumā raksturota karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz sirds aizsardzību išēmijas laikā, hipertensijas attīstību un karnitīna-atkarīgo enzīmu aktivitātes izmaiņām.

8.1. Karnitīna koncentrācijas samazināšanas ietekme uz sirds funkcionālajiem rādītājiem un asins plazmas un audu bioķīmiskajiem parametriem

Karnitīns piedalās glikozes un taukskābju enerģijas metabolisma regulēšanā sirds un skeleta muskuļos un organismā tā homeostāze tiek nodrošināta, aktīvi darbojoties kompleksai transporta sistēmai. Tajā pašā laikā trūkst pētījumu par samazinātas karnitīna 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 pētījumu rezultāti apliecina, ka, lietojot 4–12 nedēļas mildronātu 100, 200 un 400 mg/kg, karnitīna koncentrācija samazinās, bet GBB koncentrācija palielinās asins plazmā (1. attēls) un sirds (2.A un 3.A attēls) un aknu (2.B un 3.B 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 parādīts, ka lipīdu akumulēšanās aknās, ja izteikti ir samazināta karnitīna koncentrācija, vērojama tikai badinātām žurkām un pēc barības uzņemšanas dažu stundu laikā lipīdu līmenis normalizējas (Degrace et al., 2007). Lai pārbaudītu mildronāta (100, 200 un 400 mg/kg) ilgstošas lietošanas (4, 8 un 12 nedēļas) rezultātā samazinātās

karnitīna koncentrācijas ietekmi uz aknu funkcionalitāti, veicām aknu audu griezumu histokīmisko analīzi, noteicām triglicerīdu un taukskābju koncentrācijas aknu audos, kā arī lipīdu profilu un aknu funkcionalitātes marķierus asins plazmā. Aknu audu griezumu histokīmiskā analīze neuzrādīja lipīdu infiltrācijas pazīmes, bet triglicerīdu koncentrācija statistiski ticami palielinājās par 10-20% tikai mildronāta 400 mg/kg devas gadījumā (7.A attēls). Taukskābju koncentrācija aknās ticami palielinājās tikai pēc 12 nedēļām, nepārsniedzot 15%, salīdzinājumā ar kontroles grupu (7.B attēls).

Karnitīna koncentrācijas samazinājums būtiski neietekmēja arī asins plazmas lipīdu profilu, jo vienīgās izmaiņas, kas varētu liecināt par ievērojami kavētu taukskābju β -oksidāciju, novēroja mildronāta 400 mg/kg 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 Kneysel et al., 2005), mūsu pētījumā novērojām tikai pēc 12 nedēļām, ja mildronāta deva bija 400 mg/kg.

Atšķirīgie rezultāti par mildronāta samazinātās karnitīna koncentrācijas ietekmi uz aknu funkcionalitāti, iespējams, ir saistīti ar pētījumos izmantotā 3-(2,2,2-trimetil-hidrazīnija)-propionāta izcelsmi. *Spaniol M. ar kolēģiem* (Spaniol et al., 2003) izmantoja pašu sintezētu vielu, kas, balstoties uz metodes aprakstu un pētījumiem par 3-(2,2,2-trimetil-hidrazīnija)-propionāta 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 (Degrace et al., 2007) 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 samazinātās karnitīna koncentrācijas apstākļos. Virkne pētījumu parādījuši, 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). Iepriekšējos pētījumos parādīts, ka pēc mildronāta lietošanas KPT I aktivitāte ir palielināta sirds un aknu audos, mērījumus veicot izolētos mitohondrijos eksogēni pievienota karnitīna klātbūtnē; ir zināms, ka samazināta karnitīna

koncentrācija audos 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 noteicām, izmantojot reālās karnitīna koncentrācijas audos, bez karnitīna koncentrāciju izlīdzināšanas, kā to darīja iepriekš minētajos pētījumos. KPT I aktivitāte sirds audos palielinājās pēc ilgstošas (4–12 nedēļas) mildronāta lietošanas (6. attēls), bet nemainījās aknu audos. Toties pēc 2 nedēļu ilgas mildronāta (100 mg/kg) lietošanas, KPT I aktivitāte sirdī samazinājās par 26%, salīdzinot ar kontroles grupu (12. attēls), bet no KPT I atkarīgā taukskābju β -oksidācija samazinājās par 27% (1. tabula). Vienlaikus nenovēroja KPT IA un IB mRNS ekspresijas izmaiņas. 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 izteiktas vai ilgstošas 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 (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 sirds un it īpaši aknu audos.

Vairākos pētījumos parādīts, ka izteiktas karnitīna samazinājums izraisa hipoglikēmiju vai stimulē glikozes oksidāciju žurkās (Broderick, 2006), 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). Karnitīna samazinājums pat pēc mildronāta lietošanas devā 400 mg/kg praktiski neietekmēja glikozes koncentrāciju asinīs ne ēdušām, ne badinātām *Wistar* žurkām. Šie dati liecina, ka karnitīna samazinājuma ietekme uz glikozes metabolismu ir atkarīga no enerģijas substrātu pieejamības, jo glikozes metabolisma

veicināšana kalpo kā kompensators mehānisms kavētas taukskābju β -oksidācijas apstākļos. Papildus jāatzīmē, ka kardioprotektīvā efekta sasniegšanai nozīmīgāk būtu veicināt glikozes metabolismu tieši išēmijas-reperfūzijas, nevis normoksijas laikā.

Agrākie pētījumi parādījuši, ka mildronāts kavē KrAT, un izteikta hipotēze, ka, palielinot acetil-koenzīma A daudzumu, tiek veicināta dažādu mitohondrijos notiekošo metabolisma procesu norise. 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 (8. un 9. attēls). Ar molekulārās dinamikas skaitļošanas palīdzību 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 (10. attēls). Tieši tas var izskaidrot, kāpēc tik ļoti pasliktinās mildronāta saistība ar KrAT karnitīna klātbūtnē. Lai gan tiek uzskatīts, ka visām aciltransferāzēm aktīvie centri pēc to uzbūves ir līdzīgi (Jogl et al., 2004), ir zināms, ka mildronāts neietekmē KPT I aktivitāti (Tsoko et al., 1995), 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 samazinās, ir zināms, ka sirds mitohondrijos pēc mildronāta lietošanas karnitīna koncentrācija pat nedaudz palielinās (Degrace et al., 2004). KrAT aktivitātes mērījumi *ex vivo* apliecināja *in vitro* iegūtos datus, jo enzīma aktivitāte, salīdzinot ar kontroles grupu, nemainījās. 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 tādas izmaiņas enerģijas metabolismā iesaistīto enzīmu aktivitātē, kas varētu veicināt sirds šūnu aizsardzību pret išēmijas-reperfūzijas iespējamo bojājumu attīstību.

8.2. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz infarkta lielumu

Gan karnitīna koncentrācijas palielināšanās, gan arī samazināšanās var reducēt išēmijas izraisīto sirds šūnu bojājumu. Karnitīna lietošana samazināja infarkta lielumu pēc paliekošas sirds kreisās koronārās artērijas oklūzijas (Mouhieddine & de Leiris, 1993), bet neietekmēja išēmijas-reperfūzijas izsuktā nekrotiskā bojājuma lielumu (Briet et al., 2008). Mildronāta lietošanas ietekmē samazinātā karnitīna koncentrācija ir kardioprotektīva (Dambrova et al., 2002; Liepinsh et al., 2006). Iepriekšējos pētījumos arī parādīts, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts korelē ar karnitīna biosintēzes prekursora GBB koncentrācijas palielināšanos (Liepinsh et al., 2006).

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. Tā kā gan karnitīna, gan mildronāta lietošana izraisa GBB koncentrācijas palielināšanos, tad īpaši izvērtējam kardioprotektīvā efekta saistību ar GBB koncentrācijas izmaiņām asins plazmā un sirds audos.

Mildronāta 14 dienu lietošana samazināja karnitīna koncentrāciju sirds audos par 69%, kā arī infarkta lielumu par 34%. Lietojot mildronāta un karnitīna kombināciju, karnitīna koncentrācija sirds audos un infarkta lielums praktiski nemainījās. Karnitīna lietošana palielināja tā koncentrāciju sirds audos par 28%, tomēr ticami samazināt infarkta lielumu nespēja (11. attēls). Sirds darbības parametri neatšķirās starp grupām ne normoksijas, ne išēmijas un reperfūzijas laikā, liecinot, ka mildronāta un karnitīna ietekme uz infarkta lielumu nav saistāma ar izmaiņām sirds veiktajā darbā.

Gan pēc karnitīna, gan mildronāta lietošanas GBB koncentrācija bija palielināta asins plazmā (4.B attēls) un sirds audos (5.B attēls). Visizteiktāk GBB koncentrāciju sirds audos palielināja karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana, tomēr šajā grupā nebija vērojams infarkta samazinājums (11. attēls).

Iegūtie rezultāti apliecināja, ka mildronāta kardioprotektīvais efekts saistīts ar izmaiņām sirds enerģijas metabolismā, ko izsauc karnitīna koncentrācijas samazināšanās un nevis GBB koncentrācijas palielināšanās. Karnitīna koncentrācijas samazināšanās ne tikai inhibē KPT I (12. attēls), kas kavē taukskābju metabolismu (1. tabula), bet, balstoties uz iepriekšējo pētījumu rezultātiem, stimulē arī glikozes izmantošanu, jo kompensatori palielinās tās metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresija un aktivitāte (Broderick, 2006; Liepinsh et al., 2008).

8.3. Karnitīna koncentrācijas izmaiņu ietekme uz hipertensijas attīstību

Hipertensija ir miokarda infarkta riska faktors, kā arī veicina endoteliālās disfunkcijas (Hirooka et al., 2008) un aterosklerozes attīstību (Biswas et al., 2003). Savukārt karnitīna lietošana spēj aizkavēt ar hipertensiju saistīto komplikāciju attīstību (de Sotomayor et al., 2007). Līdzīga antiaterosklerotiska un angioprotektīva iedarbība ir mildronātam (Vilskersts et al., 2009). Mūsu pētījumā salīdzinājām karnitīna, mildronāta un abu vielu kombinācijas 8 nedēļu ilgstošas lietošanas ietekmi uz hipertensijas izraisīto komplikāciju attīstību *Dahl* sāls-jutīgo (DS) žurku modeli.

DS žurkām, kas saņēma barību ar palielinātu sāls saturu (PS, 8% NaCl), izteikta hipertensija attīstījās jau pēc 4 nedēļām (18. attēls). Pēc 8 nedēļām attīstījās arī sirds hipertrofija, tomēr sirds mazspēju nenovēroja 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 (3. tabula). Tas varētu būt saistīts ar pastiprinātu karnitīna ekskrēciju ar urīnu nieru bojājumu dēļ (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 (3. tabula). Mildronāta lietošana ievērojami samazināja karnitīna koncentrāciju, ļaujot novērtēt

gan neizmainītas, gan ievērojami pazeminātas karnitīna koncentrācijas ietekmi uz hipertensijas izraisīto komplikāciju attīstību. Līdzīgi, kā novērojām *Wistar* žurkās, arī DS žurkās lietotās vielas palielināja GBB koncentrāciju asins plazmā (3. 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 samazināja mirstību par 80% (17. attēls). Tā kā sirds funkcionālie parametri un plaušu/ķermeņa masas indekss starp grupām neatšķīrās, tad iespējams nāves cēlonis varētu būt saistīts ar sirds kreisā kambara hipertrofijas attīstību, kas ir miokarda infarkta un sirds kambaru letālu aritmiju riska faktors (Messerli, 1999).

Mūsu pētījuma rezultāti *Wistar* žurku modelī liecina, ka mildronātam piemīt antiaritmiska iedarbība, samazinot kopējo dažādas izcelsmes aritmiju attīstības biežumu (14. un 16. attēls), kā arī samazinot laiku, līdz atjaunojas normāls sinusa ritms (13. attēls), un kopējo aritmiju ilgumu (15. attēls). Tā kā tiek uzskatīts, ka acilkarnitīnu uzkrāšanās ir saistīta ar aritmiju attīstību (Bonnet et al., 1999), tad visticamāk mildronāta antiaritmogēnā iedarbība saistīta ar samazināto KPT I aktivitāti (12. attēls), ko izraisa samazinātā karnitīna koncentrācija sirds audos (5.A attēls). Rezultātā samazinās acilkarnitīnu koncentrācija sirds audos un tiek novērsta to aritmogēnā ietekme. Tā kā arī karnitīnam piemīt antiaritmiskas īpašības (Najafi et al., 2008), tad iespējams tieši šo efektu dēļ karnitīna un mildronāta kombinācija ticami samazināja DS žurku mirstību (17. attēls).

Arī 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). Līdzīgus novērojumus izdarījām arī savos pētījumos, jo PS kontroles žurkām pēc 8 nedēļām ticami paātrinājās sirds ritms (19. attēls), kā arī bija vislielākā mirstība, salīdzinot ar NS grupas žurkām (17. attēls). Karnitīna un mildronāta kombinācijas lietošana novērta sirds ritma paātrināšanos, kā arī ticami samazināja mirstību (17. attēls). Mildronāta lietošana arī novērta sirds ritma paātrināšanos, tomēr mirstību ticami samazināt nespēja ($p < 0,06$, salīdzinot ar PS kontroles grupu). Iegūtie rezultāti liecina, ka samazināto mirstību kombinācijas grupā (17. attēls) var saistīt ar abu savienojumu iepriekš apraksīto kardiovaskulāro sistēmu aizsargājošo iedarbību.

Hipertensijas izraisīto endotēlija disfunkciju saista gan ar kardiovaskulāro notikumu biežumu, gan orgānu bojājumu attīstību (Xu et al., 2009). Mūsu pētījuma ietvaros izvērtējam mildronāta, karnitīna un to kombinācijas lietošanas ietekmi uz endotēlija disfunkcijas attīstību DS žurku izolēto aortas gredzenu modelī. Lai gan agrākos pētījumos ir novēroti atsevišķi mildronāta un karnitīna angioprotektīvie efekti (Vilskersts et al., 2009), mēs endotēlija funkcijas uzlabošanas novērojām tikai karnitīna un mildronāta kombinācijas grupā (20. attēls). Pastāv hipotēze, ka endotēlija disfunkcijas attīstības kavēšana ir saistīta ar tiešu aizsargājošo ietekmi uz endotēliju, nevis ar asinsspiedienu samazinošu iedarbību (Tzemos et al., 2001). Mūsu iegūtie rezultāti saskan ar šo hipotēzi, jo, lai gan karnitīna un mildronāta kombinācija nesamazināja asinsspiedienu (18. attēls), tā kavēja endotēlija disfunkcijas attīstību (20. attēls).

Lai gan GBB koncentrācijas izmaiņas sirds audos korelē ar kardioprotekciju išēmijas-reperfūzijas eksperimentālā žurku modelī pēc mildronāta lietošanas (Liepinsh et al., 2006), mūsu rezultāti liecina, ka šis efekts tomēr ir atkarīgs no karnitīna koncentrācijas samazinājuma (11. 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 palielināja GBB koncentrāciju asins plazmā. Tā kā tieši kombinācijas grupā novērojām visizteiktāko GBB koncentrācijas palielināšanos un vienlaicīgi izteiktāko aizsardzību pret hipertensijas komplikācijām, 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.

9. 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 -butirobetaīna (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 -oksidācija. 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.**

10. 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 Rūdolfš Mežapuķe un Olga Žarkova, lietu kārtotāja Raita Brikmane un talantīgie studenti – elpinātāji – Marina Makrečka un Edijs Vāvers.

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

Pateicos par palīdzību rezultātu iegūšanā analītikas meistariem Solveigai Grīnbergai un Osvaldam Pugovičam, 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 No. 2010.10-4/VPP-4 „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.





RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

JĀNIS KŪKA

**THE REGULATION OF CARNITINE SYSTEM FOR
CARDIOPROTECTION**

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

Submitted for the degree of Doctor of Pharmacy
(Pharmaceutical chemistry)

Riga, 2011

Supervisors:

Dr. Pharm. **Maija Dambrova**

Head of Laboratory of Pharmaceutical Pharmacology, Latvian Institute of Organic Synthesis

Dr. Chem. **Renāte Medne**

Head of Department of Pharmaceutical Chemistry, Riga Stradins University

Reviewers:

Dr. habil. Biol., Professor **Ruta Muceniece**, University of Latvia

Dr. Biol., Leading researcher **Andrejs Šķesters**, Riga Stradins University

MD., Ph.D., Professor **Boris Z. Simkhovich**, Good Samaritan Hospital (USA)

Presentation of the thesis will take place in an open session of the Promotion Council in Pharmacy of the Riga Stradins University on 17th of May, 2011, at 14.00 in the Hippocrates auditorium of RSU, Riga, Dzirciema Street 16.

Chairperson of the Promotion Council:

Professor, Dr. habil. Chem. **Ivars Kalviņš**

Secretary of the Promotion Council:

Dr. Pharm. **Anna Vītola**

The doctoral studies were supported by the ESF Project "Support for PhD Program Studies and Earning of Scientific Degree at RSU".



The doctoral thesis was elaborated in Latvian Institute of Organic Synthesis in Laboratory of Pharmaceutical Pharmacology.



11. Topicality of the problem

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in Latvia and European Union. The highest mortality rates are observed in Central and East European countries, while the lowest rates are characteristic for Western and Northern European countries (Müller-Nordhorn et al., 2008). Therefore, the investigations of novel treatments to improve the survival and quality of life of cardiovascular patients are of great importance worldwide.

In order to produce adenosine triphosphate, muscle cells utilize both glucose and fatty acids as energy substrates. Under normal conditions the main energy supply for the heart is generally provided by the oxidation of fatty acids. However, under ischemic conditions a shift from fatty acid oxidation to glucose oxidation is supposed to lead to lower oxygen consumption (Beadle & Frenneaux, 2010). Carnitine regulates the intensity of long chain fatty acid utilization, and plays an important role in the regulation of glucose and fatty acid energy metabolism.

It is well-known, that carnitine facilitates the transport of fatty acids into the mitochondrial matrix, so they could be metabolized through β -oxidation to obtain energy (Strijbis et al., 2010). Physiological effects of carnitine in the muscle metabolism were discovered more than 50 years ago. Nowadays carnitine is widely used as a nutritional supplement; however pharmacological effects of carnitine, including cardioprotective activity, are not well described and studied in details. Experimental evidence suggests that different effects can be induced through changing carnitine concentration. While severe carnitine deficiency leads to conditions similar to muscular dystrophy (Georges et al., 2000), a moderate decrease in heart tissue carnitine concentration adapts the cellular metabolism to ischemic stress conditions (Dambrova et al., 2002). The investigations of the pharmacological and physiological consequences of the regulation of carnitine system could provide evidence for novel treatment possibilities for clinical treatment of cardiovascular diseases.

After summarizing the available theoretical and experimental evidence, the **hypothesis** of the present doctoral thesis was set as follows: the molecular mechanism of the cardioprotective effect of mildronate is based on mildronate-induced decrease in carnitine concentration and subsequent inhibition of fatty acid metabolism.

12. Aim of the study

To test the hypothesis that the cardioprotective effect can be achieved by altering carnitine concentration and inducing changes in the carnitine-related energy metabolism pathways of cardiac cell.

13. Objectives of the study

- To study the effects of long-term decrease in carnitine concentration on heart and liver function and changes in plasma and tissue lipid profile.
- To study the effects of changed carnitine concentration on fatty acid metabolism related enzymes carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) and carnitine acetyltransferase (CrAT) activity and glucose metabolism related pyruvate dehydrogenase complex activity in heart mitochondria.
- To characterize the interactions of mildronate and CrAT *in vitro* and effect of mildronate on enzyme activity *in vivo*.
- To study the effects of mildronate in an isolated rat heart infarction model as well as the angioprotective effect of mildronate in a *Dahl* salt-sensitive rat hypertension model.

14. Novelty of the study

The differential roles of changed concentrations of carnitine and its biosynthetic precursor gamma-butyrobetaine for the cardio- and angioprotective activity of mildronate were studied.

- Obtained results support the safety of long-term administration of mildronate; it was shown that 3 month mildronate treatment at doses up to 400 mg/kg is not associated with any cardiac impairments or disturbances of liver functions and lipid profile.
- The long-term decrease in carnitine concentration induces a dose-dependent compensatory increase in carnitine palmitoyltransferase I activity.
- For the first time the binding of mildronate to CrAT active site is characterized and it is established that mildronate is a weak inhibitor *in vitro* and it does not influence CrAT activity *in vivo*.
- Evidence is provided that the cardioprotective effect of mildronate depends on decrease in carnitine heart concentration, while the angioprotective effect in *Dahl* salt-sensitive rat hypertension model depends on changes in carnitine and gamma-butyrobetaine concentrations.

15. Approbation of the study

Doctoral thesis is based on following SCI publications:

6. 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):1269-75.
7. 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):387-94.
8. 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):281-8.
9. 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. Accepted for publication (*Pharmacological Reports*, 2011; 63(3)).
10. **Kuka J.**, Vilskersts R., Cirule H., Makrecka M., Pugovics O., Kalvinsh I., Dambrova M., Liepinsh E. Treatment with L-carnitine diminishes the cardioprotective effect of mildronate in an isolated rat heart infarction model. Iesniegts manuskripts žurnālā *International Journal of Cardiology*.

Non SCI publications:

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

Results are reported in following international conferences:

8. **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, S134.
9. 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, S54.
10. **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 P2-05, P.9.
11. **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.
 12. 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.
 13. 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**.
 14. **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. Abstracts, **2008**, P.88.

Results are reported in following local conferences:

3. 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.
4. **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.

16. Materials and methods

Male *Wistar* (Laboratory of Experimental Animals, Riga Stradins University, Latvia) and *Dahl* salt-sensitive (*Charles River*, Germany) rats were used. The experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the European Community (86/609/EEC) and local laws and policies, and the procedures were approved by the Latvian Animal Protection Ethical Committee of the Food and Veterinary Service. *Wistar* rats were perorally treated daily with a mildronate dose of 100, 200 or 400 mg/kg to study the effects of long-term decrease in carnitine concentration. *Wistar* rats were perorally treated daily with

carnitine 100 mg/kg, mildronate or combination of both (100+100 mg/kg) to study the cardioprotective effect. *Wistar* rats were perorally treated daily with mildronate 100 mg/kg, orotic acid 100 mg/kg or mildronate orotate 200 mg/kg to study the antiarrhythmic effect. *Dahl* salt-sensitive rats received carnitine 100 mg/kg, mildronate or combination of both (100+100 mg/kg) with drinking water.

16.1. *In vitro* methods

16.1.1. Determination of carnitine, GBB and mildronate in tissues and blood plasma

The determination of carnitine, GBB and mildronate concentrations in the blood plasma and liver and heart tissues was performed by UPLCMSMS (Dambrova et al., 2008).

16.1.2. Biochemical measurements

Free fatty acids, triglycerides, glucose, ketone bodies, LDL-C, HDL-C, lactate, total bilirubin and activity of ALAT, ASAT and ALP were determined using kits from *Wako* and *Instrumentation Laboratory* according to manufacturers' instructions.

CrAT activity was determined in both isolated *Wistar* rat heart mitochondria and using purified pigeon breast muscle enzyme (*Sigma*, USA). Mitochondria were isolated as previously described (Wilcke et al., 1995). Assay conditions were DTNB (0.675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2.5 mM), acetyl-coenzyme A (0.1 mM), carnitine (0.0625 to 0.5 mM). Mildronate (10 μ M to 1 mM) was used only to characterize interplay of mildronate and purified CrAT *in vitro*. CPT I activity was determined in isolated mitochondria and whole liver and heart tissue homogenates. Assay conditions were DTNB (0.675 mM), HEPES (125 mM), EDTA (2.5 mM), palmitoyl-coenzyme A and corresponding carnitine concentrations. Mitochondrial respiration was measured as previously described (Baliutyte et al., 2010). Respiration buffer solution contained 40 μ M palmitoyl-coenzyme A, 36 μ M palmitoyl-carnitine or 5 mM pyruvate/5 mM malate.

16.1.3. Molecular docking to characterize binding of mildronate to CrAT

Mildronate docking in the active site of CrAT was performed with the MOE2007.09 software (*Chemical Computing Group, Inc.*, Canada).

16.2. Ex vivo and in vivo methods

16.2.1. Haemodynamic measurements *in vivo*

Systolic blood pressure and heart rate were measured in DS rats at the beginning of the experiment and after 4 and 8 weeks of administration of the compounds using a Non-Invasive Blood Pressure Controller MLT125 connected to *ADInstruments* PowerLab8/30 system.

16.2.2. Isolated rat heart infarction model according to Langendorff

The infarction study was performed as described previously (Liepish et al., 2006). The infarct size was calculated as a percentage of the risk area. The control values were normalized to 100%, and all of the results are expressed as values compared to the controls

16.2.3. Experimental models of arrhythmia in rats

To examine effect of mildronate on ischemia-reperfusion induced arrhythmia, *Wistar* rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i/p). Tracheotomy was performed, and the animals were ventilated with ambient air (15 ml/kg, 55 strokes per minute) using a rodent ventilator 7025, *Ugo Basile*). The chest was opened and a sling (5/0 Surgipro II) was placed around the left coronary artery. Rats were allowed to stabilize for 20 min and then the coronary artery was occluded for 10 minutes, followed by 30 min reperfusion. To examine effect of mildronate on calcium chloride induced arrhythmias, *Wistar* rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i/p). The left femoral vein was cannulated for the administration of 10% calcium chloride solution. Experimental heart rhythm disturbances were induced by intravenously infusing (0.01 ml/s) 10% calcium chloride solution in an arrhythmogenic dose (180 mg/kg). ECG was recorded from II standard lead using Chart 5.5 software during calcium chloride administration and 10 min after discontinuation. The following parameters were monitored: mortality, time to onset of arrhythmias and time to normal sinus rhythm and incidence of ventricular tachycardia and fibrillation.

16.2.4. Salt induced hypertension in *Dahl* rats

Endothelial function was examined in aortic rings using an organ chamber bath as described previously (Bartuś et al., 2008). DS rat heart anatomy and function was examined using iE33 ultrasonograph (*Philips Ultrasound, Inc.*). Rats were lightly anesthetized with an intraperitoneal

injection of ketamine and xylazine (50 and 10 mg×kg⁻¹) and M-mode tracings of the left ventricle were recorded.

16.2.5. Data analysis

Established statistical methods were used and calculations were performed with MS Excel 2003 and GraphPad Prism 3.0 (*GraphPad Software, Inc.*). p-value <0.05 was considered to be significant. Mann-Whitney or Student's t-test, analysis of variance followed by Tukey's or Bonferroni test were used to compare effects. Survival curves for DS rats were constructed for each group using the Kaplan-Meier method. Differences in the incidence of arrhythmias among groups were analyzed by Chi-Square test.

17. Results

17.1. Effects of mildronate and carnitine treatment on GBB, mildronate and carnitine concentrations in plasma and tissues

4, 8 and 12 week treatment with 100 (M 100), 200 (M 200) and 400 mg/kg (M 400) of mildronate induced dose-dependent decrease in the carnitine concentration in *Wistar* rat blood plasma. After 4 weeks of treatment with mildronate significant decreases of 3-, 5- and 13-fold, respectively, in the carnitine concentrations were observed. Time-dependent decrease in carnitine concentration was observed only in the rats treated at the 400 mg/kg dose, reaching a decrease of 35-fold at the end of the 12-week treatment (Figure 1A). Mildronate treatment induced up to a 14-fold increase in the GBB concentration, but this effect was dose and time independent (Figure 1B).

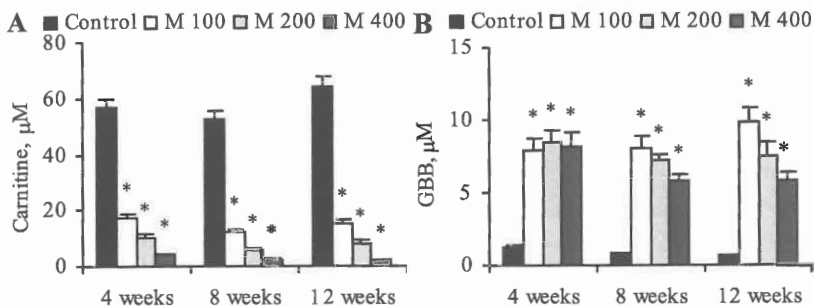


Figure 1. Effect of long-term mildronate treatment on changes in carnitine (A) and GBB (B) concentrations in *Wistar* rat blood plasma.

Values are represented as average \pm SEM of 8–10 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

Long-term mildronate treatment induced a dose-dependent decrease in the carnitine concentration in Wistar rat heart and liver tissue. Time-dependent decrease in carnitine concentration was observed only in the rats treated at the 200 mg/kg dose (Figure 2).

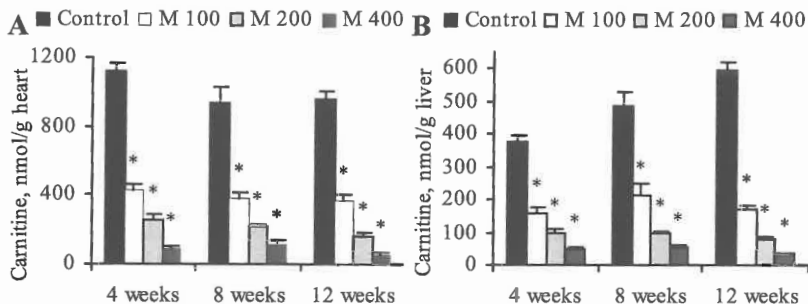


Figure 2. Effect of long-term mildronate treatment on changes in carnitine concentration in Wistar rat heart (A) and liver (B) tissue. Values are represented as average \pm SEM of 8–10 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

GBB concentration increased up to 10-fold in heart tissue (Figure 3A), and up to 66-fold in liver tissue (Figure 3B), however none of these changes were dose or time-dependent.

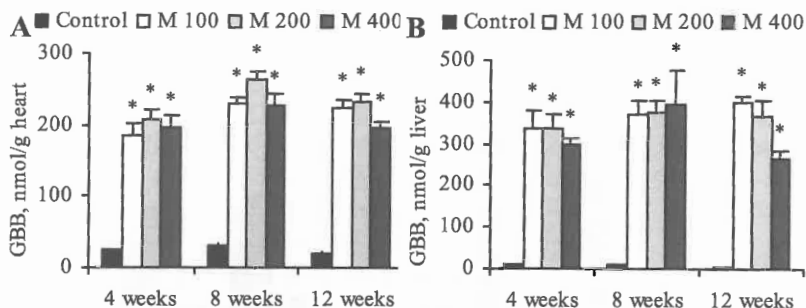


Figure 3. Effect of long-term mildronate treatment on changes in GBB concentration in Wistar rat heart (A) and liver (B) tissue. Values are represented as average \pm SEM of 8–10 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

Effects of 14-day treatment with carnitine (100 mg/kg; C 100), mildronate (100 mg/kg; M 100) or both (100+100 mg/kg; C+M) on carnitine and GBB concentrations in *Wistar* rat blood plasma are shown in figure 4. Treatment with carnitine induced a significant increase in its blood plasma concentration by 24% as compared to control; mildronate treatment induced a 3-fold decrease in carnitine concentration. Treatment with a combination of both substances decreased carnitine concentration by 18% (Figure 4A). Treatment with carnitine induced only a slight 2-fold increase in GBB concentration, whereas treatment with mildronate or the combination of both substances increased GBB concentration by up to 10- and 20-fold, respectively (Figure 4B).

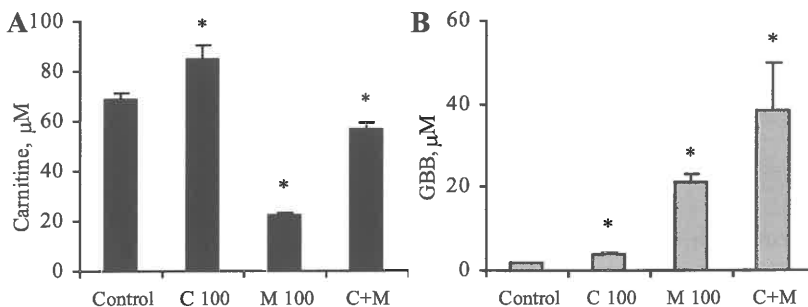


Figure 4. Effects of 14-day treatment with carnitine, mildronate or both on carnitine (A) and GBB (B) concentrations in *Wistar* rat blood plasma. Values are represented as average \pm SEM of 10 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Student's *t*-test).

As in blood plasma, treatment with carnitine increased its heart tissue concentration (by 31%). After treatment with mildronate, the carnitine concentration in heart tissue was decreased by 69%. Treatment with carnitine and mildronate combination had no significant impact of carnitine concentration in heart tissue as compared to control (Figure 5A). Similar to the findings in blood plasma, treatment with carnitine induced only a slight 2-fold increase in GBB concentration in heart tissue, whereas treatment with mildronate or the combination of both substances increased the GBB concentration in heart tissue by 5- and 7-fold, respectively.

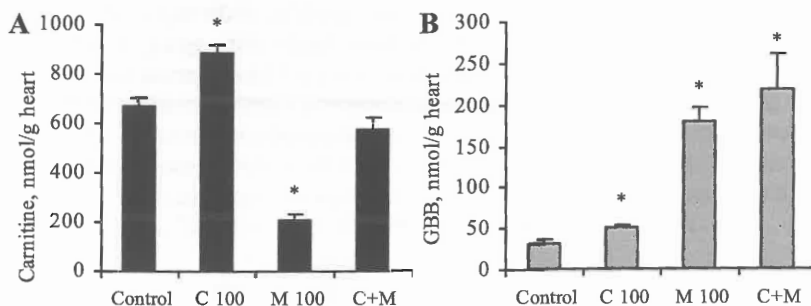


Figure 5. Effects of 14-day treatment with carnitine, mildronate or both on carnitine (A) and GBB (B) concentrations in Wistar rat heart tissue. Values are represented as average \pm SEM of 10 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Student's *t*-test).

17.2. Effects of changes in carnitine concentration on enzyme activity and biochemical measures in blood plasma and tissues

17.2.1. Effect on CPT I activity

The effect of mildronate treatment on CPT I activity in Wistar rat heart tissues is shown in figure 6.

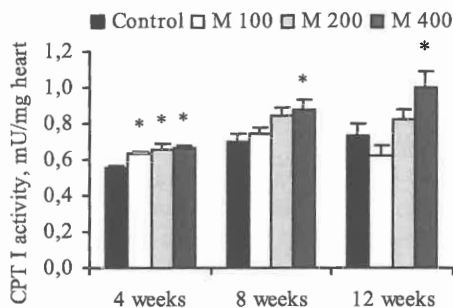


Figure 6. Effect of long-term mildronate treatment on Wistar rat heart CPT I activity. Values are represented as average \pm SEM of 6 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

CPT I activity was determined in tissue homogenates after 4, 8 and 12 weeks of treatment with 100, 200 and 400 mg/kg of mildronate. In heart tissue homogenates after 4 weeks mildronate treatment, the basal CPT I activity was significantly increased by up to 21% in all of the

mildronate treated groups, whereas after 8 and 12 weeks of treatment, the CPT I activity was significantly increased by 25% and 35%, respectively, only in the rats treated with a 400 mg/kg dose of mildronate. In liver tissue homogenates, no significant changes in the basal CPT I activity were observed.

17.2.2. Effect on mitochondrial respiration

Mitochondrial respiration was measured in isolated *Wistar* rat heart mitochondria after 14 day treatment with carnitine (100 mg/kg), mildronate (100 mg/kg) or both (100+100 mg/kg), using palmitoyl-coenzyme A, palmitoyl-carnitine and pyruvate/malate as a substrates. Mitochondrial respiration results are shown in table 1. Treatment with mildronate decreased the mitochondrial respiration on palmitoyl-coenzyme A, but did not have any statistically significant impact on mitochondrial respiration on pyruvate/malate or palmitoyl-carnitine. Treatment with combination of mildronate and carnitine increased mitochondrial respiration on palmitoyl-carnitine and pyruvate/malate.

Table 1

Effects of 14-day treatment with carnitine, mildronate or both on isolated *Wistar* rat heart mitochondria respiration on different energy substrates

Substrate	Control	C 100	M 100	C+M
	O ₂ consumption, nmol/min/mg protein			
40 μM palmitoyl-coenzyme A	36.9±3.8	41.0±4.9	26.8±0.8*	36.8±1.4
36 μM palmitoyl-carnitine	16.4±1.2	21.4±2.8	19.2±0.9	21.3±1.2*
5 mM pyruvate/5 mM malate	41.3±2.7	44.7±6.0	42.6±4.1	52.4±2.4*

Values are represented as average ±SEM of 6 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Student's *t*-test).

17.2.3. Effect on liver functionality markers

Effects of long-term (4–12 weeks) decrease in carnitine concentration induced by treatment with 100, 200 and 400 mg/kg of mildronate on the levels of *Wistar* rat liver function markers are shown in table 2.

Table 2

The effect of decreased carnitine concentration on liver function markers in *Wistar* rat blood plasma

	Control	M 100	M 200	M 400
4 weeks				
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
Total bilirubine, mg/dl	0.39±0.17	0.27±0.09	0.17±0.02	0.29±0.05
8 weeks				
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
Total bilirubine, mg/dl	0.31±0.04	0.33±0.05	0.30±0.04	0.30±0.03
12 weeks				
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*
Total bilirubine, mg/dl	0.23±0.04	0.20±0.03	0.24±0.02	0.19±0.02

Values are represented as average ±SEM of 8–10 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

Mildronate treatment did not affect the total bilirubine, ASAT and ALAT values. The ALP level was significantly increased by 28% after 8 weeks of treatment with 100 mg/kg of mildronate and by 23% after 12 weeks of treatment with 400 mg/kg of mildronate.

17.2.4. Effect on lipid profile in liver tissue

Effects of long-term decrease in carnitine concentration on triglyceride and fatty acid concentrations in *Wistar* rat liver tissues are shown in figure 7. The triglyceride concentration in the livers of fed rats that received the 400 mg/kg dose of mildronate was significantly increased after 4, 8 and 12 weeks of treatment by 21%, 20% and 12%, respectively (Figure 7A). The fatty acid concentration in the liver was significantly increased by 24% and 14% only after 12 weeks of treatment with 200 and 400 mg/kg of mildronate, respectively (Figure 7B).

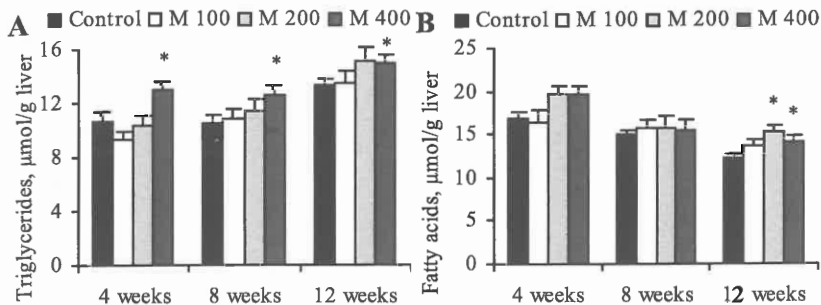


Figure 7. Effects of long-term mildronate treatment on triglyceride and fatty acid concentrations in Wistar rat liver tissues. Values are represented as average \pm SEM of 8–10 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

17.3. Characterization of mildronate binding to CrAT

Binding of mildronate to CrAT was determined *in vitro* using purified enzyme (*Columba sp.*). Mildronate inhibits CrAT in a competitive manner (Figure 8); however it is weak inhibitor with a K_i value of 5.2 ± 0.6 mM (Figure 9).

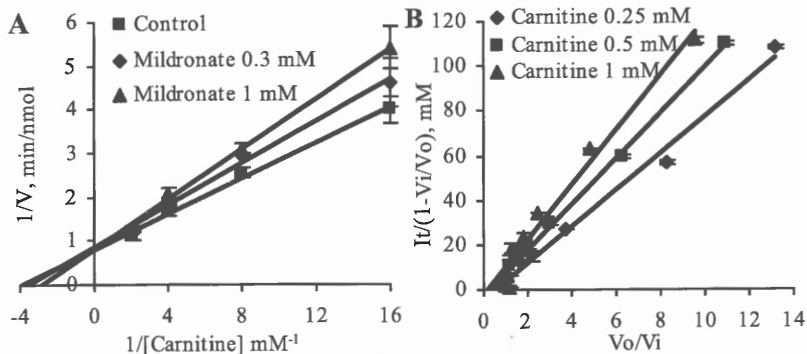


Figure 9. Lineweaver–Burk (A) and Henderson (B) plots to characterize binding of mildronate to CrAT. Points represent average \pm SEM of 3 measures. I_T —total concentration of inhibitor; V_0 —control velocity; V_i —velocity in presence of inhibitor.

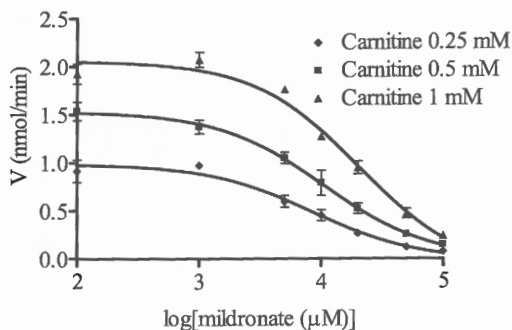


Figure 9. Dose–response curves for the inhibition of CrAT by mildronate at carnitine concentrations 0.25, 0.5, and 1 mM. Points represent average \pm SEM of 3 measures.

For detailed characterization of the mildronate molecule on CrAT, molecular docking was used. Docking results (Figure 10) showed the conformation, where the trimethylammonium group of the mildronate was exposed to the solvent. However, the carboxyl and α -CH₂ groups of mildronate and carnitine were bound to CrAT very similarly. The catalytic His343 is hydrogen-bonded to the NH group of mildronate, instead of the OH moiety in carnitine. This caused differences in binding of both ligands. The trimethylammonium group of mildronate was situated in a channel approximately 4 Å away from the protein surface and was exposed to the solvent, whereas the trimethylammonium group of carnitine was buried in a hydrophobic pocket.

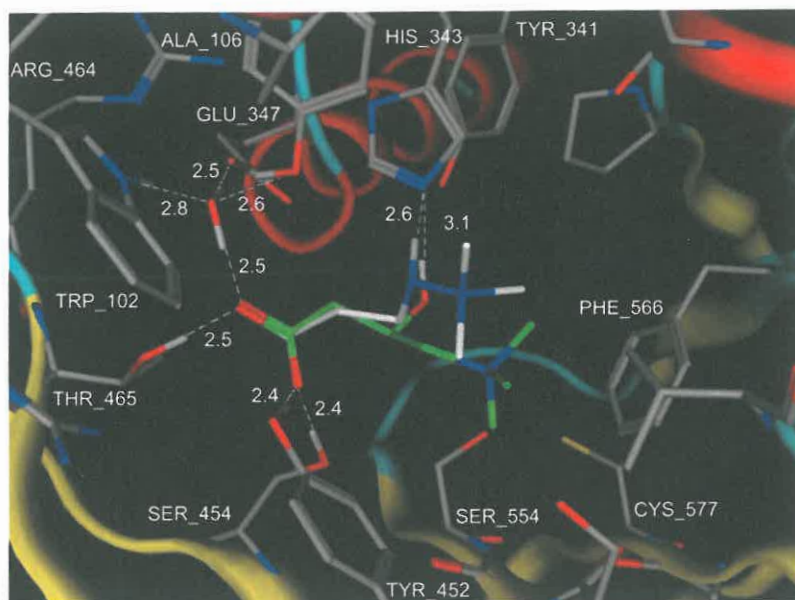


Figure 10. Proposed model for the positioning of carnitine and mildronate in CrAT enzyme. Carnitine carbons are shown in green and mildronate carbons are shown in light gray. All hydrogen atoms, except those involved in hydrogen bonds, are omitted. Hydrogen bonds are shown as white dashed lines. Produced with MOE 2007.09.

14-day treatment with carnitine (100 mg/kg; C 100), mildronate (100 mg/kg; M 100) or both (100+100 mg/kg) did not affect CrAT activity in heart mitochondria *in vivo*.

17.4. Effect of changes in carnitine concentration on infarct size

Effects of 14-day treatment with carnitine (100 mg/kg), mildronate (100 mg/kg) or both (100+100 mg/kg) on infarct size and carnitine concentrations in the *Wistar* rat heart tissues are shown in figure 11. Mildronate decreased carnitine concentration in heart tissue and reduced infarct size by 34% compared to control group. Carnitine treatment reduced infarct size by 28%, but this effect was not statistically significant. Mildronate and carnitine combination had no significant impact on infarct size or carnitine concentration.

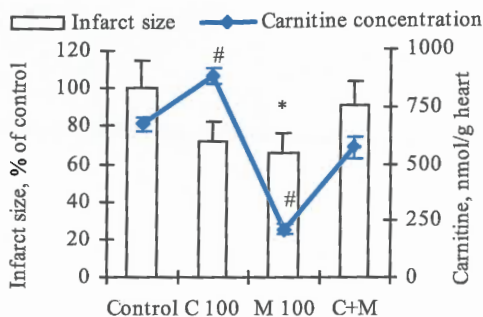


Figure 11. Effects of 14-day treatment with carnitine, mildronate or both on carnitine concentration and infarct size in Wistar rat heart tissue. Values are represented as average \pm SEM of 10 animals. #, * - $p < 0.05$, vs. control group (Student's *t*-test).

Effects of changes in carnitine concentration (Figure 5A) induced by 14-day treatment with carnitine, mildronate or both on CPT I activity in mitochondria isolated from Wistar rat hearts are shown in figure 12. Treatment with mildronate decreased CPT I activity by 26%.

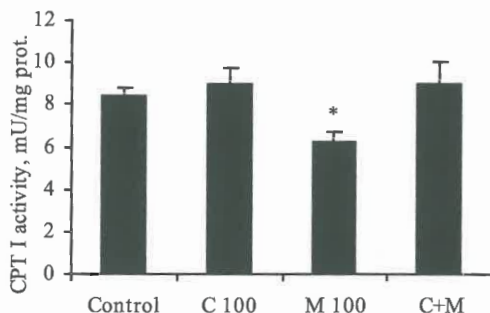


Figure 12. Effects of treatment with carnitine, mildronate or both on CPT I activity in the presence of carnitine concentrations found in the heart tissue after the treatment (700 μ M for control, 900 μ M for C 100, 200 μ M for M 100 and 600 μ M for C+M group). Values are represented as average \pm SEM of 5 animals. * - $p < 0.05$, vs. control group (Student's *t*-test).

17.5. Effects of changes in carnitine concentrations on *Wistar* rat haemodynamic measurements

Decrease in carnitine concentration after treatment with mildronate (100, 200 and 400 mg/kg) for 4, 8 and 12 weeks did not induce any changes in isolated heart parameters (heart rate, coronary flow, LVDP, left ventricle contractility and relaxation, cardiac work).

17.6. Anti-arrhythmic effects of mildronate and mildronate orotate

17.6.1. Effects on ischemia-reperfusion induced arrhythmia

Effects of mildronate (100 mg/kg) and mildronate orotate (200 mg/kg) on time to onset of arrhythmias during occlusion and time to onset of normal sinus rhythm during reperfusion are shown in figure 13. In all the experimental groups the first arrhythmia episodes started approximately 320 s after the start of coronary artery occlusion, however both drugs significantly reduced the time elapsed prior to onset of normal sinus rhythm during reperfusion (175±36 s in the control group, 73±21 s in the mildronate group and 60±8 s in the mildronate orotate group).

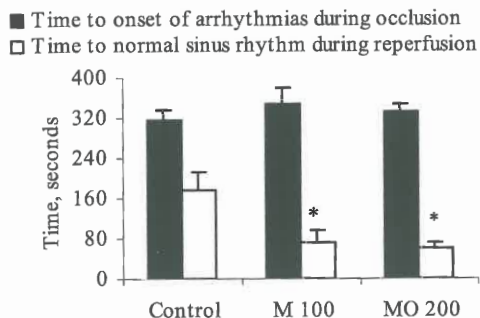


Figure 13. Effects of 14-day treatment with mildronate and mildronate orotate on time to onset of arrhythmias during occlusion and time to normal sinus rhythm during reperfusion in ischemia-reperfusion induced experimental arrhythmia model in *Wistar* rats. Values are represented as average \pm SEM of at least 6 rats. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

Treatment with mildronate and mildronate orotate had no effect on ventricular tachycardia during occlusion and reperfusion, but protected rat hearts against ventricular fibrillation during occlusion (only mildronate orotate) and reperfusion (both drugs) (Figure 14).

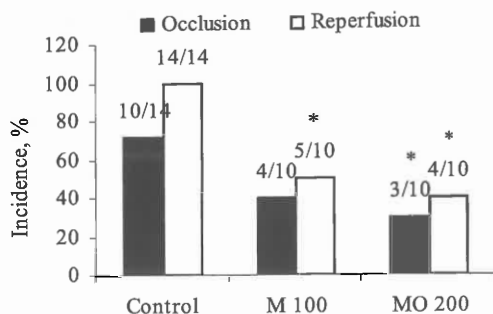


Figure 14. Effects of 14-day treatment with mildronate and mildronate orotate on incidence of ventricular fibrillation during occlusion and reperfusion in Wistar rats. * - $p < 0.05$ vs. control group (Chi-Square test).

Mildronate and mildronate orotate significantly decreased the cumulative duration of fibrillation during reperfusion (38 ± 14 s in the control group, 3 ± 2 s in the mildronate group and 2 ± 2 s in mildronate orotate group), but had no significant effect on fibrillation duration during occlusion (Figure 15).

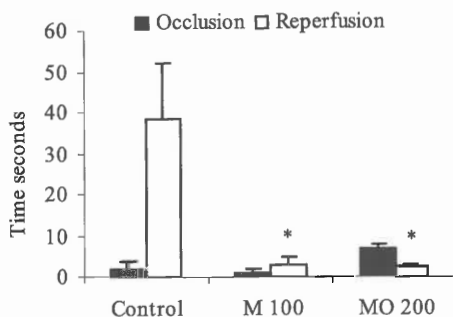


Figure 15. Effects of 14-day treatment with mildronate and mildronate orotate on duration of fibrillation during occlusion and reperfusion in Wistar rats. Values are represented as average \pm SEM of at least 6 rats. * - $p < 0.05$, vs. control group (Tukey's test).

17.6.2. Effect on calcium chloride induced arrhythmia

Treatment with mildronate and mildronate orotate had no effect on time to the onset of arrhythmias after infusion of calcium chloride

(26 ± 4 and 25 ± 4 s, respectively as compared to 30 ± 4 s in the control group) and on times to normal sinus rhythm (119 ± 20 and 97 ± 12 s, respectively as compared to 159 ± 39 s in the control group). Mildronate and mildronate orotate treatment decreased the incidence of ventricular tachycardia induced by calcium chloride in *Wistar* rats (Figure 16).

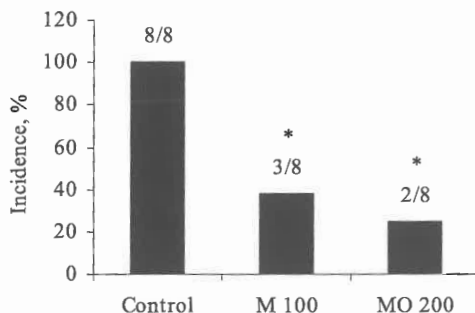


Figure 16. Effects of 14-day treatment with mildronate and mildronate orotate on the incidence of ventricular tachycardia in *Wistar* rats. * - $p < 0.05$, vs. control group (Chi-Square test).

17.7. Effects of treatment with mildronate and carnitine on hypertension in *Dahl* salt-sensitive rats

17.7.1. Effects on carnitine and GBB concentration in blood plasma

Effects of 14-week treatment with carnitine (100 mg/kg), mildronate (100 mg/kg) or both (100+100 mg/kg) on carnitine and GBB concentrations in *Dahl* rat blood plasma are shown in table 3. Consumption of diet with high salt (PS, 8% NaCl) load decreased concentration of carnitine nearly 2-fold compared with that of rats consuming diet with normal salt (NS, 0.3% NaCl) load. Administration of carnitine (PS/C 100) or combination (PS/C+M) significantly increased the concentration of carnitine in the plasma, but the treatment with mildronate (PS/M 100) decreased it as compared to PS control group animals. Consumption of high or normal salt load did not affect GBB concentration, but administration of mildronate, carnitine or their combination significantly increased the concentration of GBB in blood plasma samples 6-, 1.5- and 12-fold.

Table 3

Effects of treatment with mildronate, carnitine and their combination on carnitine and GBB concentrations in *Dahl* rat blood plasma

	NS group	High salt diet (PS)			
		Control	M 100	C 100	C+M
Carnitine, 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 ^{*,#}

Values are represented as average \pm SEM of 3–10 animals. * $p < 0.05$, vs. PS Control; # $p < 0.05$, vs. HS/M 100 group.

17.7.2. Effect on survival rate

Effects of long-term treatment with mildronate (100 mg/kg), carnitine (100 mg/kg) and their combination (100+100 mg/kg) on *Dahl* rat survival rate are shown in figure 17.

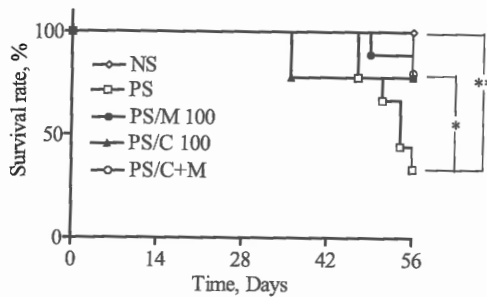


Figure 17. Kaplan–Meier plots of the survival rate of DS rats fed a normal-salt diet or a high salt diet and treated either with vehicle, carnitine, mildronate or their combination. *, $p < 0.05$, vs. PS Control; ** $p < 0.01$, vs. PS Control.

Kaplan–Meier analysis revealed that the survival rate of PS group rats was markedly reduced compared with that of animals from the NS group. In the PS group after 8 weeks of treatment, the survival rate was 30% (3 of 10 animals), while there were no lethal cases in the NS group. Administration of a combination of carnitine and mildronate significantly increased the survival rate compared with the PS group, and after 8 weeks of treatment, the PS/C+M group survival rate was 80% (8 of 10 animals). The obtained data showed that there was no statistically significant increase in survival rate in the PS/C 100 (80%, 8 of 10 animals) and PS/M 100 (80%, 8 of 10 animals) groups compared

with the PS control group although the number of animals that survived was similar as in PS/C+M group.

17.7.3. Effects on systolic blood pressure and heart rate

At the beginning of the experiment in all of the experimental groups the average systolic blood pressure was about 125 mmHg. Treatment with mildronate (100 mg/kg), carnitine (100 mg/kg) and their combination (100+100 mg/kg) did not influence the systolic blood pressure, which had increased to above 170 mmHg in all the groups, reaching as high as 195 mmHg (Figure 18).

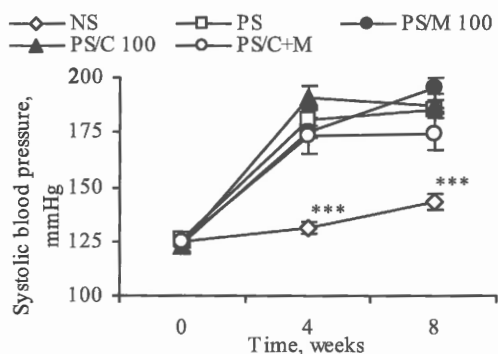


Figure 18. Effects of 8-week treatment with mildronate, carnitine and their combination on systolic blood pressure in Dahl rats. Values are represented as average \pm SEM of 3–10 animals. *** $p < 0.001$, vs. PS Control (Mann-Witney test).

No differences were among the heart rate of animals of all of the experimental groups before switching to the high salt diet or on the fourth week of the treatment. However, on the eighth week of the experiment, the mean heart rate in the PS control group was 510 ± 10 bpm, but in the NS group and after administration of mildronate (PS/M 100) and a combination of mildronate and carnitine (PS/C+M) heart rate was lower by 16, 12 and 10%, respectively (Figure 19).

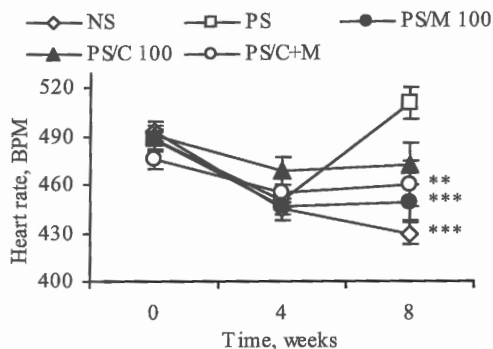


Figure 19. Effects of 8-week treatment with mildronate, carnitine and their combination on heart rate in Dahl rats. Values are represented as average \pm SEM of 3–10 animals. **, $p < 0.001$, vs. PS Control; *** $p < 0.001$, vs. PS Control (Mann-Witney test).

17.7.4. Effects on endothelial function

Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the aortic rings of PS group animals was significantly impaired compared with NS group animals. Treatment with a combination of mildronate and carnitine improved endothelium-dependent relaxation, but mildronate or carnitine alone had no impact on acetylcholine-induced relaxation (Figure 20).

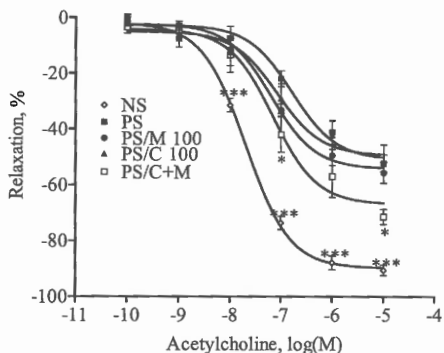


Figure 20. Effects of 8-week treatment with mildronate, carnitine and their combination on endothelial function in Dahl rats. Values are represented as average \pm SEM of 3–10 animals. *** $p < 0.001$, vs. PS Control (Mann-Witney test).

18. Discussion

The present work describes the effects of changes in carnitine concentration on functionality of cardiovascular system under normoxic and ischemic conditions. Treatment with carnitine and mildronate were used to induce changes in carnitine concentration. The cardioprotective effects of altered carnitine concentration during ischemia, development of hypertension and changes in carnitine-dependent enzyme activities were characterized.

18.1. Effects of decreased carnitine concentration on heart function and blood plasma and tissue biochemical parameters

Carnitine regulates the energy metabolism pathways in the heart and skeletal muscle. The physiological range of carnitine concentration in various tissues is maintained by a complex transporter system. However, the critical levels of carnitine for the function of the heart and the liver are not well-established.

Mildronate is known to decrease carnitine concentration through inhibition of biosynthesis of carnitine (Simkhovich et al., 1988) and its reabsorption in the kidneys (Spaniol et al., 2001). As a result of biosynthesis inhibition, mildronate treatment is known to elevate GBB concentrations in blood plasma and tissues (Liepinsh et al., 2006). The present study confirms that 4-12 week treatment with mildronate (100, 200 and 400 mg/kg) induces a significant decrease in the carnitine concentration simultaneously with increase in GBB concentration in blood plasma (Figure 1) and heart (Figure 2A and 3A) and liver (Figure 2B and 3B) tissues. Unlike GBB, changes in carnitine concentration were mildronate dose-dependent. This suggests that mildronate doses equally inhibit GBBH, but the dose-dependent decrease in carnitine concentration is most likely due to decreased reabsorption of carnitine in the kidneys, because of increasing inhibition of OCTN2.

Some controversy is present in literature regarding effects of mildronate induced decrease in carnitine concentration on liver functions. It has been suggested that decrease in carnitine concentration induced by 6-week treatment with mildronate (200 mg/kg) may develop liver steatosis (Spaniol et al, 2003). However, it was shown that steatosis is transient in fasted rats and disappears upon refeeding (Degrace et al., 2007). In the present study, to examine effects of long-term (4-12 weeks) mildronate (100, 200 and 400 mg/kg) treatment induced decrease in carnitine concentration on liver functions, we performed a histological

examination of liver cryosections, measured liver triglyceride and fatty acid contents, as well as assayed for liver damage markers and measured lipid profile in the blood plasma. In liver cryosections we did not find any signs of fat accumulation, while a statistically significant increase in the triglyceride concentration by 10-20% was only observed after treatment with a 400 mg/kg dose of mildronate (Figure 7A). A statistically significant increase (of 15%) in the liver fatty acid concentration was observed only after 12 weeks of treatment (Figure 7B).

Decrease in carnitine concentration had no significant effect on blood plasma lipid profile; the only changes that could indicate about decreased fatty acid β -oxidation were observed after treatment with 400 mg/kg dose of mildronate and more pronounced these changes were in fasted rats. Thus, decrease in β -hydroxybutyrate concentration that could indicate about decreased fatty acid and increased glucose metabolism (van Knegsel et al, 2005), we observed only after 12 weeks of treatment with a 400 mg/kg dose of mildronate.

Diverse effects of decreased carnitine concentration on liver function observed after treatment with mildronate, might be related to the origin of 3-(2,2,2-trimethyl-hydrazinium)-propionate used for studies. *Spaniol et al.* (Spaniol et al., 2003) have used custom prepared 3-(2,2,2-trimethyl-hydrazinium)-propionate, that may have been contaminated with several highly hepatotoxic impurities, such as 1,1,1-trimethylhydrazinium salts and hydrolysis products of the fully substituted hydrazinium derivative (Hmelnickis et al., 2008). In our studies and study by *Degrace et al.* (Degrace et al., 2007), only commercial 3-(2,2,2-trimethyl-hydrazinium)-propionate or mildronate from the original manufacturer JSC Grindeks was used and no toxic effects have ever been observed.

CPT I converts carnitine to form acyl-carnitine that can be transported in mitochondria. Therefore, it was important to determine how decrease in carnitine concentration affect CPT I activity. Previously it was shown that decrease in carnitine concentration after treatment with mildronate induces an increase in CPT I mRNA and protein levels in both heart and liver tissues (Degrace et al., 2004; Degrace et al., 2007; Liepinsh et al., 2008). After treatment with mildronate CPT I activity was increased in heart and liver tissues when activity measurements were performed in isolated mitochondria in the presence of fixed carnitine concentrations. Decrease in carnitine tissue concentration does not affect

the sensitivity of CPT I to malonyl-coenzyme A inhibition (Tsoko et al., 1995; Degrace et al., 2004; Degrace et al., 2007).

We determined CPT I activity in the presence of carnitine concentrations that are found in tissues (i.e. carnitine concentrations were not equalized as in previous studies). CPT I activity was increased after long-term (4-12 weeks) treatment with mildronate in the heart tissue (Figure 6), but not in liver tissues. After 2 week treatment with mildronate CPT I activity in heart tissue was significantly reduced for 26% as compared to the control (Figure 12), but CPT I dependent fatty acid β -oxidation was significantly reduced for 27% (Table 1). Previously, it was shown that treatment with mildronate at a doses of 200 mg/kg (21 days, mice) and 800 mg/kg (10 days, rats) induces a compensatory increase in CPT I mRNA expression (Degrace et al., 2004; Liepinsh et al., 2008). In this study we did not observe any significant changes in CPT I mRNA expression.

The obtained results indicate that changes in CPT I activity, protein and mRNA expression after treatment with mildronate depend on decrease itself and duration of decrease in carnitine concentration. This could be explained by observation that different tissues have different isoforms of CPT I, which are differentially sensitive to carnitine. For example, the rat isoforms of CPT I in the liver (CPT IA) and muscle (CPT IB) have a K_m for carnitine that is 30 and 500 μ M, respectively. In the heart, both CPT I isoforms, CPT IA and CPT IB, are present and as a result, the average K_m for carnitine in the heart is about 200 μ M (Brown et al., 1995). Therefore, carnitine concentrations found in heart (0.6-3 mM, depending on species) and liver tissues (0.4-3 mM, depending on species) in normal conditions are more than enough to facilitate the transport of fatty acid in mitochondria. We can conclude that only marked or long-term decrease in carnitine concentration induces a compensatory increase in CPT I protein and mRNA expression as well as an increase in CPT I enzyme activity in heart and liver tissues.

It was shown that marked decrease in carnitine concentration induces hypoglycemia or facilitates glucose oxidation in rats (Broderick, 2006), while moderate decrease in carnitine concentration after treatment with mildronate (200 mg/kg) facilitates glucose uptake and increases glucose metabolism-related gene expression in mice (Liepinsh et al., 2008). Decrease in carnitine concentration even after treatment with mildronate at a dose of 400 mg/kg did not affect glucose concentration in the fed and fasted *Wistar* rat blood. This result suggests that the effect of

decrease in carnitine concentration on glucose metabolism strongly depends on substrate availability and energy requirements. Thus, in cases of partially decreased fatty acid β -oxidation, changes in glucose metabolism could play a compensatory role. It should be noted that it is more important to facilitate glucose metabolism during ischemia-reperfusion rather than under normoxic conditions in order to achieve cardioprotection.

Previous studies have shown that mildronate inhibits CrAT activity to some extent; it was suggested that the inhibition of CrAT by mildronate and increase in acetyl-coenzyme A concentration might be an important pharmacological mechanism for maintenance of intra-mitochondrial metabolic pathways. However, recent findings of facilitation of glucose metabolism after treatment with mildronate (Liepinsh et al., 2008) contradict previous findings, because increase in acetyl-coenzyme A levels would decrease PDH activity. To give insights into the CrAT binding of mildronate we performed experiments with purified enzyme *in vitro* and we also measured the activity of the enzyme *ex vivo* in isolated mitochondria after treatment with mildronate for 2 weeks. Biochemical measurements confirmed that mildronate is a weak inhibitor of CrAT as the K_i value in the presence of carnitine was 5.2 ± 0.6 mM (Figure 8 and 9). Molecular docking suggested that mildronate competes with carnitine for binding in the active site of CrAT. The bound conformation of mildronate closely resembles that of carnitine except for the orientation of the trimethylammonium group, which in the mildronate molecule is exposed to the solvent (Figure 10). This might explain why binding of mildronate to CrAT declines so much in the presence of carnitine. Although it has been suggested that the active sites of all acyltransferases are similar (Jogl et al., 2004), it was demonstrated that mildronate does not inhibit CPT I (Tsoko et al., 1995); this indirectly suggests that mildronate and carnitine bind differently to the catalytic sites of these enzymes.

To give additional insights about effects of mildronate on CrAT, we determined the activity of enzyme in isolated *Wistar* rat heart mitochondria after treatment with mildronate at a dose of 100 mg/kg. Although carnitine concentration is decreased in cytosol, it was shown that treatment with mildronate increases carnitine concentration in heart mitochondria (Degrace et al., 2004). Activity measurements of CrAT *ex*

vivo confirmed *in vivo* data, because no changes in enzyme activity as compared to the control group were observed. These results suggest that neither mildronate, nor changes in carnitine concentration do affect CrAT activity directly under normal conditions *in vivo*. However, the changes in carnitine concentration might play an important role in the regulation of CrAT activity during ischemia-reperfusion. Thus, increase in the mitochondrial carnitine concentration and decrease in long-chain acyl-coenzyme A concentrations could increase CrAT activity and facilitate glucose metabolism.

Altogether present findings indicate that the decreased carnitine concentration after treatment with mildronate induces changes in energy metabolism-related enzyme activity that lays grounds for cardioprotective effects under ischemic conditions.

18.2. Effect of changes in carnitine concentration on infarct size

Both increase and decrease in carnitine concentration are known to reduce ischemia induced cardiac cell injury. Treatment with carnitine decreased the myocardial infarct size after permanent occlusion of the left coronary artery by ligation (Mouhieddine & de Leiris, 1993), but it did not influence the infarct size after ischemia-reperfusion injury (Briet et al., 2008). Decrease in carnitine concentration after treatment with mildronate was shown to be cardioprotective (Dambrova et al., 2002; Liepinsh et al., 2006). Previously it was shown that the cardioprotective effect of mildronate correlates with the increase in carnitine biosynthesis precursor GBB concentration (Liepinsh et al., 2006).

This study evaluated the anti-infarction effects of mildronate (100 mg/kg), carnitine (100 mg/kg) and, in particular, a combination of both substances (100+100 mg/kg) in an isolated rat heart ischemia-reperfusion injury model; the cardioprotective effects were analyzed with respect to the observed changes in carnitine and particularly GBB levels in blood plasma and heart tissue.

14-day treatment with mildronate resulted in a marked decrease in carnitine concentration in heart tissues by 69% as well as a significant decrease in infarct size by 34%. Treatment with mildronate plus carnitine diminished both the mildronate-induced decrease in carnitine tissue concentration and the cardioprotective effect of mildronate. Treatment with carnitine alone increased its heart tissue concentration by 28%, but the decrease in the infarct size was not significant (Figure 11). No significant differences were observed in the haemodynamic parameters

during ischemia-reperfusion in any of the treatment groups when compared to the control group, indicating that the observed effects of mildronate and carnitine on infarct size are not related to changes in cardiac workload.

Treatment with carnitine or mildronate alone or with the combination of mildronate and carnitine induced an increase in GBB blood plasma (Figure 4B) and heart tissue (Figure 5B) concentrations. The highest GBB concentration was observed in the combination treatment group; however, the combination treatment did not reduce the infarct size (Figure 11).

Obtained results confirm that the mildronate-induced long-term decrease in carnitine concentration, as opposed to an increase in GBB concentration, in heart tissue is a key mechanism of action leading to the cardioprotective effects of mildronate. Decrease in carnitine concentration not only leads to inhibited CPT I dependant fatty acid metabolism, but it also compensatory facilitates glucose metabolism by increasing glucose metabolism related gene expression and enzyme activity (Broderick, 2006; Liepinsh et al., 2008).

18.3. Effects of changes in carnitine concentration on the development of hypertension

Hypertension is a well established risk factor for myocardial infarction and the development of endothelial dysfunction (Hirooka et al., 2008) and atherosclerosis (Biswas et al., 2003). Meanwhile treatment with carnitine has a certain impact on the development of hypertension-related complications (de Sotomayor et al., 2007). Mildronate also possess anti-atherosclerotic and angioprotective effects (Vilskersts et al., 2009). The aim of the present study was to investigate whether the administration of carnitine, mildronate or their combination for 8 weeks is protective against hypertension-induced complications in *Dahl* salt-sensitive (DS) rats.

DS rats fed with a high salt diet (PS, 8% NaCl) developed marked hypertension already after 4 weeks of treatment (Figure 18). After 8 weeks of treatment elevated systolic blood pressure lead to the development of cardiac hypertrophy, but we did not observe the development of heart failure. Thus, in our study, we investigated the effects of the test compounds on hypertension-induced complications.

Experimental animals from PS group had decreased plasma concentration of carnitine compared with NS group animals (Table 3).

Differences between both groups could be result of an increased renal loss of carnitine due to development of renal injuries (Zhu et al., 2009). Treatment with carnitine (PS/C 100) completely restored, while combination treatment (PS/C+M) partially restored blood plasma concentration of carnitine (Table 3). Treatment with mildronate significantly decreased carnitine concentration, so it was possible to study effects of different carnitine availability on the development of hypertension-induced complications. Similarly to effects in *Wistar* rats, test compounds increased GBB concentration also in DS rat blood plasma (Table 3), especially in the combination treatment group.

Mortality in the PS control group was significantly increased compared to the NS group and administration of a combination of carnitine and mildronate significantly decreased mortality by 80% (Figure 17). Because there were no differences between the functional parameters of the heart and lung to body weight indexes between groups, the possible cause of death could be the left ventricular hypertrophy, a recognized risk factor for myocardial infarction and lethal ventricular arrhythmias (Messerli, 1999).

Our results obtained in *Wistar* rat model suggest that mildronate possess an anti-arrhythmic effect which is presented as a decreased incidence of different types of arrhythmias (Figure 14 and 16), decreased time elapsed prior to onset of normal sinus rhythm (Figure 13), decreased duration of arrhythmias (Figure 15). It was hypothesized that increase in acyl-carnitines could provoke arrhythmias (Bonnet et al., 1999), therefore the anti-arrhythmic effect of mildronate could be related to decrease in CPT I activity (Figure 12) induced by decreased carnitine concentration in heart tissue (Figure 5A). As a result, also the concentration of acyl-carnitine should be decreased in mildronate treated heart tissues. In addition, some anti-arrhythmic effects of carnitine have been described (Najafi et al., 2008). Thus, the increased survival of DS rats after treatment with a combination of mildronate and carnitine could be result of both mechanisms (Figure 17).

It has been shown that resting heart rate is an independent predictor of cardiovascular morbidity and mortality, irrespective of the presence of co-morbidities (Palatini, 2008). Our results are in agreement with this observation, because after 8 week treatment the highest heart rate was found in PS group animals (Figure 19), along with the highest mortality (Figure 17) compared to NS group animals. Treatment with a combination of mildronate and carnitine decreased heart rate and also

significantly reduced mortality (Figure 17). Although mildronate treatment for 8 weeks also decreased heart rate, the protective effect against mortality was not so pronounced ($p < 0.06$ vs. PS group) as in the combination group. These findings indicate that reduction of mortality in the PS/C+M group (Figure 17) could be related to the previously described cardioprotective effects of the tested compounds in the heart.

Similar to resting heart rate, endothelial dysfunction has been shown to be associated with the occurrence of cardiovascular events and hypertension-induced organ damage (Xu et al., 2009). In our study, the effects of treatment with carnitine, mildronate or their combination on the development of endothelial dysfunction were assessed in isolated DS rat aortic rings. Angioprotective effects of mildronate and carnitine have been described before (Vilskersts et al., 2009), however in the present study only administration of their combination attenuated the development of endothelial dysfunction (Figure 20). It has been suggested that the mechanism of attenuation of the development of endothelial dysfunction is based on direct influence on endothelium and vascular tissues, and not on the anti-hypertensive activity (Tzemos et al., 2001). Our results support this theory, as endothelial function was improved (Figure 20) without significant effect on arterial blood pressure (Figure 18).

Although changes in GBB concentration in the heart tissue correlate with the cardioprotective effect of mildronate in an experimental ischemia-reperfusion model in rats (Liepinsh et al., 2006), our results suggest that this effect depends on decrease in carnitine concentration (Figure 11). Meanwhile the angioprotective effect of combination of mildronate and carnitine most likely is related to increase in GBB concentration. Altogether, mildronate, carnitine and especially their combination increased GBB concentration in blood plasma. The most pronounced increase in GBB concentration and protection against hypertension-induced complications were observed in the combination group, thus suggesting the importance of GBB. These data suggest that the angioprotective action of GBB could improve the cardioprotective effects related to decrease in carnitine concentration, however experimental proof for such hypothesis remains to be found.

19. Conclusions

- Obtained results support the safety of long-term administration of mildronate. Treatment with mildronate for up to 3 month at doses that in the heart tissue decrease carnitine concentration 8- to 16-fold and increase GBB concentration 8- to 10-fold, but in the liver tissue decrease carnitine concentration 8- to 17-fold and increase GBB concentration 30- to 66-fold is not associated with cardiac impairment or disturbances in liver function and does not induce significant changes in lipid profile in tissues and blood plasma.
- Long-term treatment with mildronate inhibits CPT I dependent fatty acid β -oxidation. Decrease in carnitine concentration induced by 14-day mildronate treatment inhibits CPT I activity, therefore, mitochondrial respiration on palmitoyl-coenzyme A is decreased by 27%. A compensatory increase in enzyme activity in the heart tissue is observed only after at least a month-long decrease in carnitine concentration.
- Under normal conditions mildronate does not affect pyruvate metabolism, since CrAT and pyruvate dehydrogenase complex activities in heart mitochondria are unchanged. Although mildronate is weak inhibitor of CrAT *in vitro* and competes with carnitine for binding to the catalytic site of an enzyme, *in vivo* it does not affect the enzyme activity.
- A mildronate-induced decrease in carnitine concentration in the heart tissue is a key mechanism of action for the cardioprotective effects of mildronate during ischemia. When mildronate induced decrease in carnitine tissue concentration is diminished, no cardioprotective effect can be observed.
- Angioprotective effect of mildronate and its combination with carnitine in the salt-induced hypertension model is based on the increase in GBB concentration in the blood plasma of *Dahl* rats.
- **Molecular mechanism of the cardioprotective effect of mildronate is based on the decreased carnitine concentration that decreases CPT I activity and inhibits fatty acid metabolism.**
- **Carnitine system regulation is a new tool for pharmaceutical industry to develop new medicines for the treatment of cardiovascular diseases.**

20. Acknowledgements

I would like to thank my supervisors Maija Dambrova and Renāte Medne who coordinated and supported my work.

Thanks to my colleagues without whom this work would not be possible: theoreticians and practitioners Edgars Liepiņš and Reinis Vilšķērsts, brain specialist Līga Zvejniece, animal caretakers Helēna Cīrule and Līgita Kariņa, masters in biochemistry Elīna Škapare and Baiba Švalbe, assistants Rūdolfs Mežapuķe and Olga Žarkova, document organizer Raita Brikmane and talented students Marina Makrecka and Edijs Vāvers.

I would like to say thanks to direction of Latvian Institute of Organic Synthesis, in person to Ivars Kalviņš.

I would like to say thanks to Solveiga Grīnberga and Osvalds Pugovičs, Edvards Liepiņš and Kristaps Jaudzems, Aleksandrs Gutsaits and Kirils Zinovjevs for their help in obtaining results.

Special thanks to my family.

Thanks for financial support to JSC “Grindeks” and JSC “Grindeks” foundation “Support for science and education”. Materials were obtained with the help of Latvian State Research Program grant No. 2010.10-4/VPP-4.

The doctoral studies were supported by the ESF Project "Support for PhD Program Studies and Earning of Scientific Degree at RSU".



21. Literatūras saraksts/References

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.

Bartus M, Lomnicka M, Kostogryś RB, Kaźmierczak P, Watała C, Słominska EM, Smoleński RT, Pisulewski PM, Adamus J, Gebicki J, Chlopicki S. 1-Methylnicotinamide (MNA) prevents endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic and diabetic rats. *Pharmacol Rep*, 2008; 60(1):127-138.

Beadle RM, Frenneaux M. Modification of myocardial substrate utilisation: a new therapeutic paradigm in cardiovascular disease. *Heart*, 2010; 96(11):824-830.

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.

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):2248-53.

Briet F, Keith M, Leong-Poi H, Kadakia A, Aba-Alkhalil 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.

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.

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.

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.

Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 2002; 12(6):275-279.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Jogl G, Hsiao YS, Tong L. Structure and function of carnitine acyltransferases. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1033:17-29.

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.

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.

Messerli FH. Hypertension and sudden cardiac death. *Am J Hypertens*, 1999; 12(12 Pt 3):181S-188S.

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.

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.

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.

Palatini P. Heart rate as predictor of outcome. *Blood Press Monit*, 2008; 13(3):167-168.

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.

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.

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.

Strijbis K, Vaz FM, Distel B. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life*, 2010; 62(5):357-362.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.