



Marina Makrecka-Kūka

**JAUNA KARDIOPROTEKTĪVA
SAVIENOJUMA METIL-GBB
ATKLĀŠANA:
farmakoloģiska pieeja
acil-karnitīnu samazināšanai**

Promocijas darba kopsavilkums
farmācijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – farmaceitiskā farmakoloģija

Rīga, 2015



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Marina Makrecka-Kūka

JAUNA KARDIOPROTEKTĪVA
SAVIENOJUMA METIL-GBB
ATKLĀŠANA:
farmakoloģiska pieeja acil-karnitīnu
samazināšanai

Promocijas darba kopsavilkums
farmācijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2015

Promocijas darbs izstrādāts:

Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās
farmakoloģijas laboratorijā

Darba zinātniskā vadītāja:

Dr. pharm. asociētā profesore **Maija Dambrova**,
Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas ķīmijas katedra,
Latvijas Organiskās sintēzes institūta
Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītāja

Oficiālie recenzenti:

Dr. habil. biol. profesore **Ruta Muceniece**,
Latvijas Universitāte
Dr. biol. docente **Renāte Ranka**,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
MD, PhD profesors **Boris Z. Simkhovich**,
Labā Samarieša slimnīcas Sirds institūts
(Amerikas Savienotās Valstis)

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2015. gada 21. augustā plkst.
12.00 Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas promocijas padomes
atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Senāta zālē.

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU mājas lapā:
www.rsu.lv



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



Promocijas darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta
Nr. 2009/0147/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/009

“Atbalsts doktorantiem studiju programmas apguvei un zinātniskā grāda
ieguvei Rīgas Stradiņa universitātē” finansiālu atbalstu

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. pharm. docente **Dace Bandere**

SATURS

Ievads.....	6
Darba mērķis.....	7
Darba uzdevumi.....	7
Darba hipotēzes.....	7
Darba zinātniskā novitāte.....	8
1. Materiāli un metodes.....	9
1.1. Dzīvnieki un ārstēšana.....	9
1.2. Metodes.....	9
1.2.1. <i>In vitro</i> metodes.....	9
1.2.1.1. Bioķīmiskie parametri.....	9
1.2.1.2. Enerģijas substrātu oksidācija izolētos sirds mitohondrijos un audu homogenātos.....	10
1.2.1.3. Skābekļa patēriņa mērījumi izolētos mitohondrijos un permeabilizētās sirds muskuļu šķiedrās.....	10
1.2.1.4. BBOX aktivitāte un OCTN2-nodrošinātais L-karnitīna transports.....	11
1.2.1.5. L-karnitīna un ievadīto savienojumu koncentrācijas sirds audos un plazmā.....	12
1.2.2. <i>Ex vivo</i> un <i>in vivo</i> metodes.....	12
1.2.2.1. Enerģijas substrātu oksidācija izolētas sirds modelī.....	12
1.2.2.2. <i>Ex vivo</i> un <i>in vivo</i> žurku sirds infarkti.....	13
1.2.3. Datu apstrādes statistiskās metodes.....	13
2. Rezultāti.....	14
2.1. Enerģijas metabolisma norišu ietekme uz miokarda infarktu.....	14
2.1.1. Miokarda infarkts pēc ēšanas un tukšā dūšā.....	14
2.1.2. Atšķirības enerģijas metabolisma norisēs tukšā dūšā un pēc ēšanas.....	16
2.2. Garķēžu acil-karnitīnu ietekme uz enerģijas metabolisma regulāciju.....	17
2.2.1. Mitohondriju enerģijas substrātu koncentrāciju izmaiņas plazmā un sirds audos tukšā dūšā.....	17
2.2.2. Substrātu konkurence izolētos sirds mitohondrijos.....	18
2.2.3. Garķēžu acil-karnitīnu ietekme uz glikozes metabolismu izolētas žurkas sirds modelī un <i>in vivo</i>	19
2.3. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz enerģijas metabolismu.....	21
2.3.1. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz išēmijas-reperfūzijas bojājumu.....	21
2.3.2. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz no L-karnitīna atkarīgiem enzīmiem un mitohondriju enerģijas metabolismu...	22

2.4. OCTN2 un BBOX inhibitoru ietekme uz L-karnitīna pieejamību.....	23
2.4.1. BBOX un OCTN2 inhibējošās aktivitātes pārbaude.....	23
2.4.2. BBOX un OCTN2 inhibitoru atlase turpmākajiem eksperimentiem.....	25
2.4.3. OCTN2 un BBOX inhibitoru ilgstošas lietošanas ietekme uz L-karnitīna koncentrāciju sirds audos	26
2.4.4. Ilgstošas OCTN2 un BBOX inhibitoru lietošanas pret-infarkta aktivitāte.....	28
2.5. Ilgstošas OCTN2 un BBOX inhibitora Metil-GBB lietošanas ietekme uz enerģijas metabolismu un išēmijas-reperfūzijas bojājumu	29
2.5.1. Metil-GBB lietošanas ietekme uz L-karnitīna pieejamību	29
2.5.2. Metil-GBB lietošanas ietekme uz acil-karnitīnu koncentrāciju sirdī.....	30
2.5.3. Metil-GBB lietošanas ietekme uz TS un glikozes oksidāciju sirdī.....	31
2.5.4. Metil-GBB lietošanas ietekme uz sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu	34
3. Diskusija.....	38
3.1. Sirds enerģijas metabolisma norišu saistība ar išēmijas-reperfūzijas bojājumu	38
3.2. Garķēžu acil-karnitīnu loma sirds enerģijas metabolisma regulācijā....	40
3.3. L-karnitīna pieejamības samazināšana kā zāļu mērķis kardioprotekcijai.....	42
3.3.1. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz sirds enerģijas metabolismu un išēmijas-reperfūzijas bojājumu.....	42
3.3.2. BBOX un OCTN2 inhibitoru ietekme uz L-karnitīna pieejamību un sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu	44
3.4. L-karnitīna pieejamības samazinājums kā veids acil-karnitīnu uzkrāšanās novēršanai un kardioprotekcijas sasniegšanai.....	45
4. Secinājumi.....	48
5. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes	49
Literatūras saraksts.....	53

SAĪSINĀJUMI

ADF – adenozīna difosfāts
BBOX – γ -butirotbetaīna dioksigenāze
BSA – vērša seruma albumīns
Dimetil-GBB – 4-[diētil(mētil)amonija]butanoāts
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle vide
EKG – elektrokardiogrāfija
Et-Me-meldonijs – 3-(1,1,2-trimētil-1-propilhidrazīnij-2-il)propanoāts
'Ēd.' – buferšķīdums, ko veido pēc ēšanas stāvoklim atbilstošas enerģijas substrātu koncentrācijas plazmā
GBB – γ -butirotbetaīns
GBB-fosfīnāts – 3-(trimētilamonija)propil)fosfīnāts
HEK293 – cilvēku embrionālo nieru šūnu kultūra
Hloro-GBB – 4-(hloromētil)dimētilamonija)butanoāts
IC₅₀ – inhibitora koncentrācija, kas samazina enzīma vai transportproteīna aktivitāti par 50%
KH buferšķīdums - Krebsa-Henselaīta buferšķīdums
K_m – Mihaelisa-Mentenas konstante
KoA – koenzīms A
KPT I – karnitīna palmitoiltransferāze I
KrAT – karnitīna acetiltransferāze
LEAK stāvoklis – mitohondriju skābekļa patēriņš kavētas adenīna nukleotīda translokāzes apstākļos
Mētil-GBB – 4-(etildimētilamonibutanoāts
OCTN2 – 2. tipa organisko katjonu/karnitīna transportproteīns
OXPHOS stāvoklis – ADF-stimulētais mitohondriju skābekļa patēriņš
PDH – piruvāta dehidrogenāze
'T.d.' – buferšķīdums, ko veido tukšas dūšas stāvoklim atbilstošas enerģijas substrātu koncentrācijas plazmā
TS – taukskābe
UPLC MS/MS – augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfija ar sekojošu tandēm-masspektrometriju

IEVADS

Sirds išēmiskā slimība ik gadu ir galvenais invaliditātes un nāves cēlonis miljoniem cilvēku (*Go, 2014; Moran, 2014; Nichols, 2013; Nowbar, 2014*). Traucēts šūnu enerģijas metabolisms ir galvenais iemesls sirds išēmiskās slimības patoloģiskām sekām. Taukskābes (TS) un glikoze ir galvenie enerģijas substrāti sirdī (*Stanley, 2005*). Fizioloģiskos apstākļos sirds spēj ātri pārslēgties starp pieejamiem enerģijas substrātiem. Glikoze un TS savstarpēji konkurē viens ar otru par iesaistīšanos oksidatīvā metabolismā mitohondrijos (*Randle, 1998*). Arvien vairāk pierādījumu liecina, ka sirds enerģijas metabolisma farmakoloģiskā regulēšana, kavējot TS oksidāciju un/vai stimulējot glikozes oksidāciju, var uzlabot sirds funkciju išēmijas vai mazspējas gadījumos (*Fillmore, 2014; Jaswal, 2011; Wang, 2007*). Tādējādi labāka izpratne par sirds enerģijas metabolisma regulācijas signālceļiem var sniegt jaunas stratēģijas sirds išēmiskās slimības ārstēšanā.

L-karnitīns kā aciltransferāžu kofaktors piedalās mitohondriālā enerģijas metabolisma regulācijā. Vispazīstamākā L-karnitīna funkcija ir veicināt gar ķēžu TS transportu mitohondrijos ar karnitīna palmitoiltransferāzes I (KPT I) palīdzību turpmākai β-oksidācijai. Vēl viens no L-karnitīna atkarīgais enzīms karnitīna acetiltransferāze (KrAT) regulē acetilKoA/brīvā KoA attiecību, kas ir būtiska piruvāta dehidrogenāzes aktivitātei. L-karnitīna koncentrācijas izmaiņas var ietekmēt arī acil-karnitīnu pieejamību. Tomēr acil-karnitīnu loma pašreiz saistīta tikai ar acilgrupas transportu, bet iespējama acil-karnitīnu ietekme uz sirds enerģijas metabolisma signālceļiem nav zināma.

Neskatoties uz to, ka iepriekšējie pētījumi norāda, ka L-karnitīna pieejamības samazinājums varētu būt izdevīgs sirds enerģijas metabolisma optimizācijai (*Kuka, 2012; Liepinsh, 2008, 2011, 2013a*), ar L-karnitīna koncentrācijas samazinājumu saistītie efekti sirds audos išēmijas-reperfūzijas bojājuma laikā nav pilnībā izpētīti. Turpmākie pētījumi nepieciešami, lai precizētu L-karnitīna un it īpaši tā metabolītu lomu sirds enerģijas metabolisma

regulācijā un noskaidrotu, vai L-karnitīna sistēmu var uzskatīt par zāļu mērķi sirds išēmiskās slimības ārstēšanai.

Darba mērķis

Atklāt jaunus zāļu mērķus L-karnitīna sistēmā enerģijas metabolisma regulācijai, lai sasniegtu kardioprotektīvu efektu eksperimentālo dzīvnieku išēmijas-reperfūzijas bojājuma modeļos.

Darba uzdevumi

1. Noteikt, kā sirds išēmijas-reperfūzijas bojājuma iznākumu ietekmē izmaiņas enerģijas metabolisma norisēs pēc ēšanas un tukšā dūšā.
2. Izpētīt garķēžu acil-karnitīnu ietekmi uz glikozes (piruvāta/laktāta) metabolismu sirds mitohondrijos fizioloģiskos apstākļos.
3. Pētīt L-karnitīna koncentrāciju samazinoša aģenta nātrija pivalāta ietekmi uz sirds funkcionālajiem parametriem un enerģijas metabolismu sirds mitohondrijos.
4. Salīdzināt L-karnitīna biosintēzes enzīmu γ -butirobetaīna dioksigenāzi (BBOX) un OCTN2 nodrošināto L-karnitīna transportu kā potenciālus mērķus L-karnitīna koncentrācijas samazināšanai un kardioprotektīva efekta sasniegšanai.
5. Noteikt, vai farmakoloģiska L-karnitīna koncentrācijas samazināšana ir efektīva stratēģija, lai samazinātu garķēžu acil-karnitīnu uzkrāšanos un pasargātu sirdi no akūta išēmijas-reperfūzijas bojājuma.

Darba hipotēzes

1. Garķēžu acil-karnitīnu uzkrāšanās izsauc traucējumus glikozes metabolismā un palielina išēmijas-reperfūzijas izraisīto sirds audu bojājumu.

2. L-karnitīna pieejamības samazināšana novērš garķēžu acil-karnitīnu uzkrāšanos, tādā veidā stimulējot glikozes oksidāciju un samazinot sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu.

Darba zinātniskā novitāte

Darbā pētīta L-karnitīna un tā metabolītu garķēžu acil-karnitīnu loma sirds enerģijas metabolisma regulācijā un sirds išēmijas-reperfūzijas bojājuma iznākumā:

1. Garķēžu acil-karnitīni nosaka enerģijas metabolisma norises sirdī. Turklāt garķēžu acil-karnitīnu uzkrāšanās izraisa glikozes metabolisma traucējumus un palielina sirds išēmijas reperfūzijas bojājumu.
2. Pirmo reizi salīdzināta BBOX un OCTN2 inhibitoru pretinfarkta aktivitāte, parādot, ka OCTN2 nodrošinātā karnitīna transporta kavēšana ir daudz efektīvāks veids, lai samazinātu L-karnitīna pieejamību un sasniegtu kardioprotektīvo efektu.
3. Atklāts jauns OCTN2 un BBOX inhibitors kardioprotektīvs aģents Metil-GBB. Tā darbības mehānisms pamatojas uz garķēžu acil-karnitīnu daudzuma samazināšanu sirds audos un mitohondrijos, samazinot L-karnitīna pieejamību.

1. MATERIĀLI UN METODEDES

1.1. Dzīvnieki un ārstēšana

Eksperimentiem izmantoja *Wistar* līnijas (Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija), *Goto-Kakizaki* un *Wistar-Kyoto* līniju žurku tēviņus (Taconic Farms, ASV) un *ICR* līnijas peļu tēviņus (Harlan, Nīderlande). Visas eksperimentālās procedūras veica saskaņā ar Eiropas Komisijas direktīvas 2010/63/EU vadlīnijām un saskaņoja ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi. Enerģijas metabolisma pētījumiem *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurkas tika sadalītas 2 grupās. Ēdušu dzīvnieku grupai barība bija pieejama bez ierobežojuma, bet tukšās dūšas grupas dzīvniekiem 18 stundas pirms eksperimenta barība tika noņemta. *Wistar* žurkas saņēma 40 mM nātrija pivalāta pH 7.0 (apm. 500 mg/kg) šķīdumu dzeramā ūdenī, lai pētītu L-karnitīna pieejamību samazinošu savienojumu ietekmi uz enerģijas metabolismu. Lai salīdzinātu selektīvu L-karnitīna biosintēzes vai transporta inhibitoru efektus, atlasītos savienojumus (Hloro-GBB, Dimetil-GBB, Et-Me-meldonijs, GBB-fosfināts) ievadīja *per os* devā 20 mg/kg. Lai pētītu līder-savienojuma Metil-GBB kardioprotektīvos efektus, Metil-GBB ievadīja *per os* devās 1, 5, 10, 20 mg/kg. Salīdzināšanai kā kontroles savienojums tika izmantots meldonijs devā 100 mg/kg *per os*.

1.2. Metodes

1.2.1. *In vitro* metodes

1.2.1.1. Bioķīmiskie parametri

Brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrāciju mērījumiem izmantoja komerciāli pieejamus reaģentu komplektus no Wako (Neuss, Vācija) un Instrumentation Laboratory (Lexington, Massachusetts, ASV). Glikozes un

insulīna koncentrāciju noteikšanai plazmā izmantoja reaģentu komplektus attiecīgi no Instrumentation Laboratory un Sensitive Rat Insulin RIA kit (Millipore, Billerica, ASV). Laktāta daudzuma noteikšanai izmantoja reaģentu komplektu no Roche Diagnostics (Mannheim, Vācija). TS profilu noteica, analizējot TS metil-esterus saskaņā ar gāzu hromatogrāfijas un tandēma masspektrometrijas iepriekš aprakstītu metodi (*Liepinsh*, 2013a). Acil-karnitīnu un acilKoA daudzumus sirds audu homogenātu un plazmu paraugos noteica vienlaicīgi vienā UPLC/MS/MS analizē. Paraugu sagatavošanu veica pēc iepriekš aprakstītas metodes (*Blachnio-Zabielska*, 2011).

1.2.1.2. Enerģijas substrātu oksidācija izolētos sirds mitohondrijos un audu homogenātos

Mitohondriju izolēšanai no sirds audiem izmantoja iepriekš aprakstītu metodi (*Kuka*, 2012). Mitohondriālo substrātu oksidācijas ātrumu noteica, izmantojot attiecīgus radio-iezīmētus substrātus, pēc iepriekš aprakstītas metodes (*Campbell*, 2004; *Yoshida*, 2007). Mitohondriālo un peroksisomālo palmitāta oksidācijas ātrumu mērīja sirds audu homogenātos, izmantojot [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitātu, pēc iepriekš aprakstītas metodes (*Degrace*, 2004), ar izņēmumu, ka mērījumiem tika izmantotas grupām atbilstošās L-karnitīna koncentrācijas.

1.2.1.3. Skābekļa patēriņa mērījumi izolētos mitohondrijos un permeabilizētās sirds muskuļu šķiedrās

Mitohondrijus no sirds audiem izolēja pēc iepriekš aprakstītas metodes (*Kuka*, 2012). Skābekļa patēriņa mērījumus veica ar Clark-tipa elektrodu palīdzību. Lai noteiktu no KPT I-atkarīgo TS oksidāciju, skābekļa patēriņa mērījumiem kā substrātu izmantoja palmitoilKoA un specifiskas L-karnitīna

koncentrācijas (noteiktas sirds audos pēc vielu ievadīšanas). Palmitoil-karnitīnu izmantoja kā substrātu, lai noteiktu no KPT I-neatkarīgo TS oksidāciju. Piruvātu+malātu izmantoja kā substrātus, lai noteiktu piruvāta metabolismu. KPT I un KrAT aktivitātes noteica izolētos sirds mitohondrijos pēc iepriekš aprakstītām metodēm (Kuka, 2012; Jaudzems, 2009).

Lai noteiktu mitohondriju funkciju pēc išēmijas reperfūzijas bojājuma, izolētu žurkas sirdi pakļāva 20 min išēmijai bez plūsmas un sekojošai 120 min reperfūzijai, pēc tam sirds muskuļu šķiedras sagatavoja pēc iepriekš aprakstītas metodes (Kuka, 2012). Skābekļa patēriņu sirds muskuļu šķiedrās mērīja 37 °C ar Clark-tipa elektrodu, kā substrātus izmantojot piruvātu+malātu (6 mM + 6 mM). ADF-stimulēto skābekļa patēriņu (OXPHOS stāvoklis) noteica, pievienojot 0.2 mM ADF. Lai noteiktu oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšanu, skābekļa patēriņu LEAK stāvoklī mērīja pēc 5 μM karboksitraktilozīda pievienošanas.

1.2.1.4. BBOX aktivitāte un OCTN2-nodrošinātais L-karnitīna transports

BBOX aktivitāti noteica pēc iepriekš aprakstītas metodes (Tars, 2010). Kā enzīma avotus izmantoja cilvēku rekombinanto BBOX vai žurkas aknu homogenātu (1:10 (masa/tilp.) PBS). Reakciju sāka, pievienojot GBB, un, lai nodrošinātu lineāru kinētikas norisi, reakcijas maisījumu inkubēja 37 °C 30 min (cilvēku rekombinants BBOX) vai 120 min (žurku aknu BBOX).

L-karnitīna transportu mērīja kā L-[N-metil-³H]-karnitīna hidrohlorīda uzņemšanu cilvēku embrionālu nieru šūnās (HEK293). Mērījumus veica 24-lauciņu platēs DMEM/F-12 vidē. Šūnas pre-inkubēja ar pārbaudāmajiem savienojumiem 15 min 37 °C. Uzņemšanu sāka ar vienlaicīgu neiezīmēta L-karnitīna (10 μM) un L-[N-metil-³H]-karnitīna (4 nM, 12 kBq/ml)

pievienošanu. Pēc 60 min inkubēšanas 37 °C, vidi noņēma, šūnas noskaloja un lizēja, pēc tam šūnu lizātos mērīja radioaktivitāti.

1.2.1.5. L-karnitīna un ievadīto savienojumu koncentrācijas sirds audos un plazmā

L-karnitīna, Hloro-GBB, Dimetil-GBB, Et-Me-meldonija, GBB-fosfināta un Metil-GBB koncentrācijas sirds audos un plazmā mērīja ar UPLC/MS/MS, izmantojot pozitīvas uzlādēšanas elektroizsmidzināšanas jonizāciju (*Dambrova, 2008*).

1.2.2. *Ex vivo* un *in vivo* metodes

1.2.2.1. Enerģijas substrātu oksidācija izolētas sirds modeli

Radioiezīmētas glikozes, laktāta un palmitāta oksidācijas ātrumus mērīja atsevišķās *Wistar* žurku sirdīs pēc iepriekš aprakstītas metodes (*Lopaschuk, 1997*) ar sekojošām izmaiņām. Īsumā, žurku sirdis retrogrādi perfuzēja ar atbilstošu Krebsa-Henselaita (KH) buferšķīdumu ‘Ēd.’ (‘augsts insulīns’), kas piesātināts ar skābekli un papildināts ar 10 mM glikozes, 0,3 mM nātrija palmitāta, saistīta ar 2% BSA, 2 mM laktāta, 0,2 mM piruvāta un 3 ng/ml insulīna, vai ar KH buferšķīdumu ‘T.d.’ (‘zems insulīns’), kas papildināts ar 5 mM glikozes, 1,2 mM nātrija palmitāta, saistīta ar 2% BSA, 1 mM laktāta, 0,1 mM piruvāta un 0,3 ng/ml insulīna. Glikozes un laktāta oksidācijas ātrumus noteica, mērot $^{14}\text{CO}_2$, kas rodas attiecīgi $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glikozes vai $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ laktāta metabolisma rezultātā. Palmitāta oksidācijas ātrumu noteica, mērot $^3\text{H}_2\text{O}$, kas rodas no $[\text{9,10-}^3\text{H}]$ palmitāta. Substrātu uzņemšanu sirdī aprēķināja kā summu no radioiezīmētā substrāta daudzuma, ko oksidēja perfūzijas laikā, un daudzuma, ko atrada audos pēc perfūzijas.

1.2.2.2. *Ex vivo* un *in vivo* žurku sirds infarkti

Izolētās žurku sirds infarktu eksperimentu veica saskaņā ar Langendorffa tehniku pēc iepriekš aprakstītas metodes (*Kuka*, 2012).

In vivo infarktu eksperimentu veica sekojoši: pēc anestezēšanas, dzīvnieku intubēja un ventilēja, atvēra krūškurvi un propilēna diegu ievietoja zem kreisās lejupejošās koronārās artērijas. Dzīvnieku adaptēja 10 min. Koronāro artēriju 30 min okludēja. Veiksmīgu oklūziju apstiprināja ar išēmijas izraisītām izmaiņām EKG. Pēc tam krūškurvi un ādu aizšuva. Pēc 24 st reperfūzijas, eksperimentālo dzīvnieku anestezēja, sirdi izņēma un krāsoja, kā aprakstīts iepriekš (*Liepinsh*, 2013b).

1.2.3. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datus izteica kā vidējās aritmētiskās vērtības \pm vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda (SEM). Grupu salīdzināšanai izmantoja Stjudenta t-testu, Manna-Vitnija U-testu, hī kvadrāta testu vai dispersijas analīzes metodi ar sekojošu Tukija testu. Spīrmana un Pīrsona korelāciju analīzi izmantoja, lai pārbaudītu saistību starp savienojumu spējām kavēt BBOX un OCTN2 un starp OCTN2 inhibitoru IC_{50} vērtībām un L-karnitīna daudzumu sirds audos. P vērtība mazāka par 0,05 tika uzskatīta par statistiski ticamu. Loģistikas regresijas analīzi izmantoja, lai noteiktu IC_{50} vērtības pārbaudāmiem savienojumiem. Statistiskiem aprēķiniem izmantoja Prism 5.03 programm-nodrošinājumu (GraphPad, San Diego, Kalifornija).

2. REZULTĀTI

2.1. Enerģijas metabolisma noriņu ietekme uz miokarda infarktu

2.1.1. Miokarda infarkts pēc ēšanas un tukšā dūšā

Infarkta izmēru noteica dzīvniekiem tukšā dūšā un pēc ēšanas izolētās žurku sirds išēmijas-reperfūzijas bojājuma modelī. Lai atainotu abus stāvokļus *ex vivo* izolētas sirds modelī, sirdis no tukšās dūšas un ēdušām žurkām perfuzēja ar 2 dažādiem buferšķīdumiem, kuros substrātu koncentrācijas atbilda daudzumiem, kas atrasti plazmā tukšā dūšā un pēc ēšanas (2.1. tabula). ‘Ēd’ buferšķīdumā bija augstākas glikozes, laktāta un insulīna koncentrācijas un zemāka palmitāta koncentrācija, salīdzinot ar ‘T.d.’ buferšķīdumu.

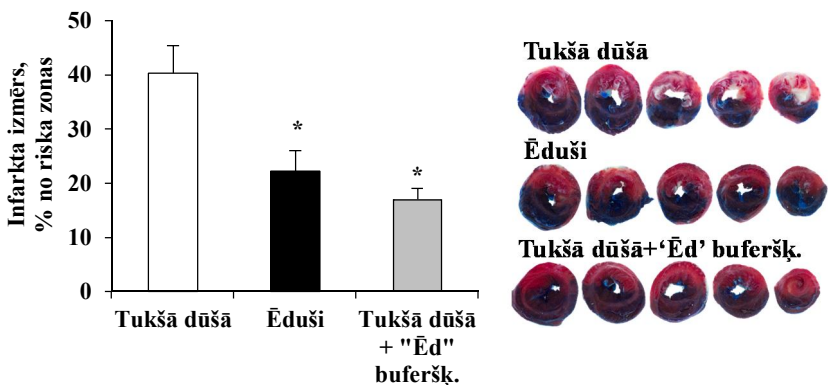
2.1. tabula

Bioķīmiskie parametri ēdušo un tukšās dūšas dzīvnieku plazmā

	Tukšā dūšā	Ēduši
Glikoze, mM	5,0 ± 0,4	8,5 ± 0,2*
Taukskābes, mM	0,85 ± 0,09	0,40 ± 0,03*
Laktāts, mM	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1*
Insulīns, ng/ml	0,22 ± 0,05	2,96 ± 0,48*

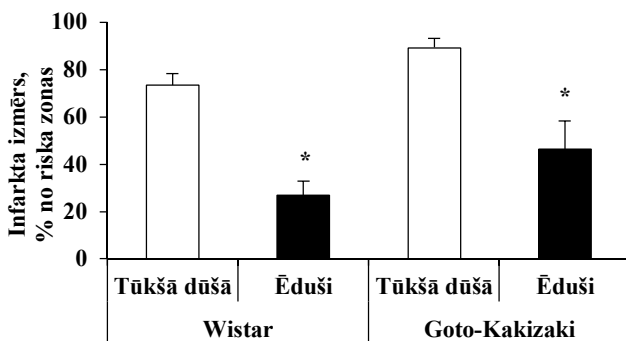
Rezultāti ir vidējais ± SEM no vismaz 8 dzīvniekiem. *Statistiski ticami atšķiras no tukšās dūšas grupas (Stjudenta t-tests, P < 0,05).

Ēdušām žurkām sirds infarkta izmērs bija gandrīz 2 reizes (46%) mazāks nekā tukšās dūšas dzīvniekiem (2.1. attēls). Līdzīgu efektu novēroja, perfuzējot tukšās dūšas grupas dzīvnieku sirdis ar ‘Ēd’ buferšķīdumu, kurā ir augstākas glikozes, insulīna un laktāta koncentrācijas (Tukšās dūšas + ‘Ēd’ buferšķīduma grupa).



2.1. attēls. **Miokarda infarkta izmēru atšķirības tukšās dūšas un ēdušu dzīvnieku sirdīs**

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 8 žurkām. * Statistiski ticami atšķiras no tukšās dūšas grupas (Tukija tests, $P < 0,05$)



2.2. attēls. **Miokarda infarkta izmēru atšķirības tukšās dūšas un ēdušu dzīvnieku sirdīs no Wistar un diabētisku Goto-Kakizaki žurkām**

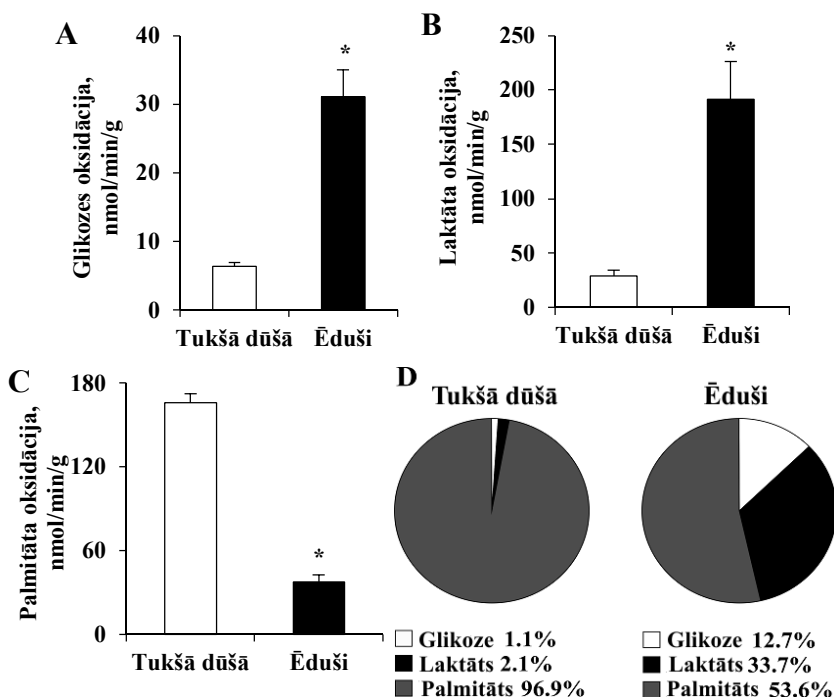
Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5 žurkām. * Statistiski ticami atšķiras no attiecīgas tukšās dūšas grupas (Tukija tests, $P < 0,05$).

Infarkta izmērs tika pētīts arī 2.tipa diabēta modelī, t.i., *Goto-Kakizaki* žurkām tukšā dūšā un pēc ēšanas. Līdzīgi kā *Wistar* žurkām, arī *Goto-Kakizaki* žurkām sirds infarkta izmēri ēdušiem dzīvniekiem bija gandrīz 2 reizes mazāki nekā tukšās dūšas dzīvniekiem. Insulīna rezistences rezultātā infarkta izmērs

sirdīs no ēdušām un tukšās dūšas *Goto-Kakizaki* žurkām bija par 20–50% lielāks nekā *Wistar* žurku sirdīs (2.2. attēls).

2.1.2. Atšķirības enerģijas metabolisma norisēs tukšā dūšā un pēc ēšanas

Lai noteiktu kardioprotektīvā efekta pamatā esošās izmaiņas substrātu izmantošanā pēc ēšanas, tika mērīti glikozes, laktāta un TS oksidācijas ātrumi sirdīs, kas izolētas no ēdušiem un tukšās dūšas dzīvniekiem.



2.3. attēls. Enerģijas substrātu oksidācijas ātrumi (glikozes (A), laktāta (B) un palmitāta (C)) sirdīs, kas izolētas no tukšās dūšas un ēdušām *Wistar* žurkām. Aprēķināts substrātu ieguldījums enerģijas ieguvē (D) tukšās dūšas un ēdušu *Wistar* žurku sirdīs

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no vismaz 8 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no tukšās dūšas grupas (Stjudenta t-tests, $P < 0,05$).

Tukšā dūšā glikozes un laktāta oksidācija ir ļoti ierobežota (2.3. attēls A un B). Turpretim, salīdzinot ar tukšās dūšas dzīvniekiem, ēdušām žurkām glikozes un laktāta oksidācija ātrumi bija attiecīgi 5 un 4 reizes lielāki (2.3. attēls A un B), lai gan cirkulējošās glikozes un laktāta koncentrācijas bija tikai 2 reizes augstākas (2.1. tabula). Tādējādi glikozes, laktāta un piruvāta oksidācijas ātrumu palielināšanās ir tieši atkarīga no insulīna signālceļiem un netieši no cirkulējošām glikozes un laktāta koncentrācijām (2.1. tabula).

Pretēji glikozes oksidācijai, TS oksidācija ir atkarīga no cirkulējošā TS daudzuma (2.1. tabula). Ēdušiem dzīvniekiem novēroja 3 reizes mazāku iezīmētā palmitāta oksidācijas ātrumu, salīdzinot ar žurkām tukšā dūšā (2.3. attēls C). Tukšā dūšā TS oksidācija ir intensīvāka par glikozes un laktāta oksidāciju un ir galvenais enerģijas avots (2.3. attēls D). Paaugstināta cirkulējošā insulīna koncentrācija un sekojoša glikozes metabolisma stimulācija, kā arī samazināta TS slodze nosaka aizsardzību no išēmijas-reperfūzijas bojājuma pēc ēšanas.

2.2. Garķēžu acil-karnitīnu ietekme uz enerģijas metabolisma regulāciju

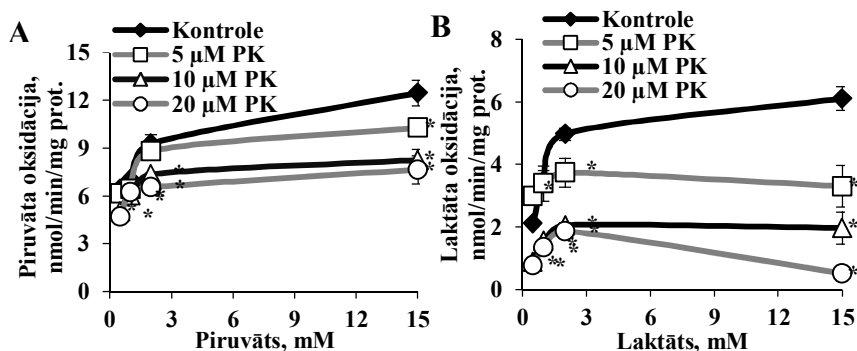
2.2.1. Mitochondriju enerģijas substrātu koncentrāciju izmaiņas plazmā un sirds audos tukšā dūšā

Neskatoties uz atšķirībām bioķīmiskajos parametros ēdušu un tukšās dūšas dzīvnieku plazmā (2.1. tabula), laktāta un garķēžu TS koncentrācijas sirds audos bija līdzīgas ēdušām un tukšās dūšas žurkām, attiecīgi $15,5 \pm 0,7$ pret $14 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/g}$ un 450 ± 30 pret 520 ± 28 nmol/g . Tukšā dūšā aktivēto garķēžu TS koncentrācijas acil-karnitīnu un acilKoA formā (attiecīgi 73 ± 8 un $2,4 \pm 0,1$ nmol/g) bija ticami 4,9 un 3,6 reizes augstākas, salīdzinot ar ēdušiem dzīvniekiem. Kopējais piesātināto garķēžu acil-karnitīnu daudzums ēdušiem un

tukšās dūšas dzīvniekiem bija attiecīgi 23 un 31 reizes lielāks nekā kopējais piesātināto garķēžu acilKoA daudzums.

2.2.2. Substrātu konkurence izolētos sirds mitohondrijos

Piruvāta, laktāta un palmitāta oksidācijas mērījumi izolētos mitohondrijos rāda, ka oksidācijas ātrumi ir ļoti atkarīgi no šo substrātu koncentrācijām (2.4. un 2.5. attēli). Piruvāta oksidācijas ātrums bija 2 reizes lielāks nekā laktāta oksidācijas ātrums, ja tika lietotas vienādas substrātu koncentrācijas. Pārbaudot, vai laktāta un piruvāta metabolisms ir atkarīgs no palmitoil-karnitīna daudzuma, noskaidrojām, ka palmitoil-karnitīns efektīvi, no devas atkarīgi kavē piruvāta un laktāta oksidāciju mitohondrijos (2.4. attēls).

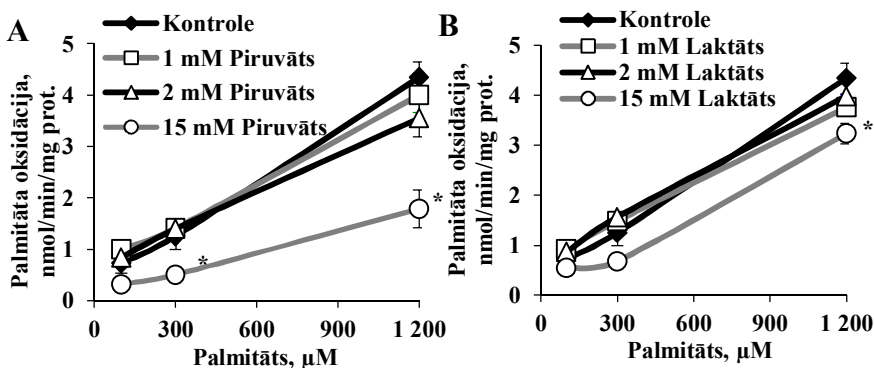


2.4. attēls. **Palmitoil-karnitīna (PK) ietekme uz piruvāta (A) un laktāta (B) oksidāciju izolētos sirds mitohondrijos**

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles (Stjūdenta t-tests, $P < 0,05$).

Palmitoil-karnitīns izteiktāk kavēja laktāta metabolismu (2.4. attēls). Tā, piemēram, 20 μ M palmitoil-karnitīns samazināja piruvāta oksidācijas ātrumu līdzīgi kā 5 μ M palmitoil-karnitīns samazināja laktāta oksidācijas ātrumu. 10 vai 20 μ M palmitoil-karnitīna klātbūtnē laktāta oksidācijas ātrums bija būtiski samazināts vairāk nekā 3 reizes (2.4. attēls B). Turklāt piruvāts atšķirībā no

laktāta statistiski ticami samazināja palmitāta oksidācijas ātrumu mitohondrijos (2.5. attēls). Šie rezultāti rāda, ka piruvāts un TS var efektīvi konkurēt savā starpā par iesaistīšanos enerģijas metabolisma signālceļos mitohondriju līmenī; tomēr tikai acil-karnitīni fizioloģiskā koncentrācijā var ietekmēt piruvāta un laktāta oksidāciju mitohondrijos.



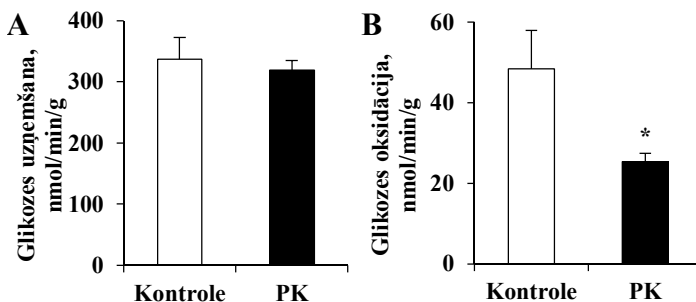
2.5. attēls. Piruvāta (A) un laktāta (B) ietekme uz TS oksidāciju izolētos sirds mitohondrijos

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles (Stjūdena t-tests, $P < 0,05$).

2.2.3. Garķēžu acil-karnitīnu ietekme uz glikozes metabolismu izolētas žurkas sirds modeli un *in vivo*

Lai noteiktu garķēžu acil-karnitīnu ietekmi uz glikozes izmantošanu sirdī, noteicām glikozes uzņemšanas un oksidācijas ātrumu izolētās žurku sirdīs, kas tika perfuzētas ar buferšķīdumu¹ ar vai bez 20 μM palmitoil-karnitīna. Garķēžu acil-karnitīnu daudzuma palielināšanās, ko izraisīja perfūzija ar palmitoil-karnitīnu, neietekmēja glikozes uzņemšanas ātrumu izolētā sirdī (2.6. attēls A). Tomēr glikozes oksidācijas ātrums ticami samazinājās par 47% sirdīs, ko perfuzēja ar palmitoil-karnitīnu (2.6. attēls B).

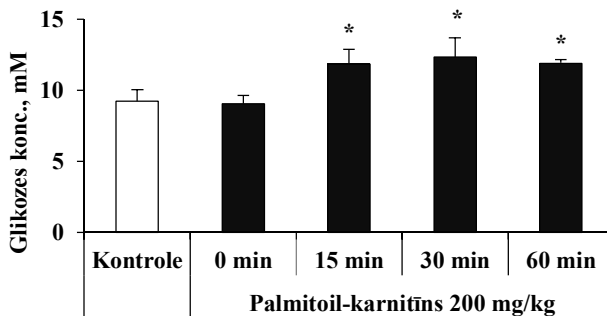
¹ KH buferšķīdums papildināts ar 10 mM glikozi, 0,3 mM nātrija palmitātu saistītu ar 1% BSA, 2 mM laktātu, 0,2 mM piruvātu un 3 ng/ml insulīnu.



2.6. attēls. **Palmitoil-karnitīna (PC) ietekme uz glikozes uzņemšanu (A) un oksidāciju (B) izolētas žurku sirds modelī**

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 8 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles (Stjudenta t-tests, $P < 0,05$).

In vivo vienreizēja palmitoil-karnitīna ievadīšana ticami paaugstināja asins glikozes koncentrāciju par 31–35% visos pārbaudītos laika punktos, salīdzinot ar kontroles grupu (2.7. attēls). Kopumā iegūtie rezultāti parāda, ka paaugstināta garķēžu acil-karnitīnu koncentrācija pasliktina glikozes izmantošanu.



2.7. attēls. **Palmitoil-karnitīna akūtas ievadīšanas ietekme uz glikozes izmantošanu *in vivo***

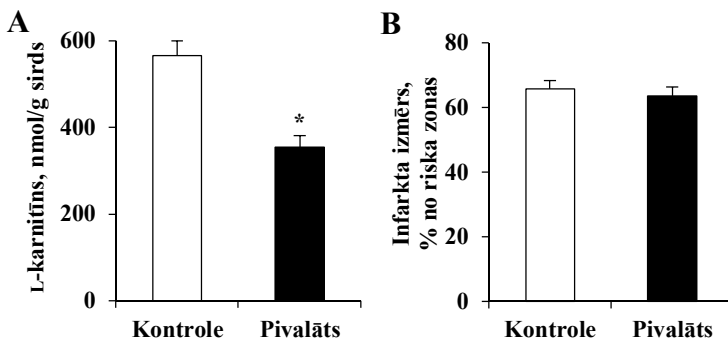
Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5 pelēm. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles (Stjudenta t-tests, $P < 0,05$).

2.3. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz enerģijas metabolismu

Lai pētītu L-karnitīna koncentrācijas samazināšanas saistību ar kardio-protekciju, žurkām ievadīja nātrija pivalātu (14 dienas 40 mM dzeramā ūdenī (500 mg/kg/dienā)); pēc tam tika pētīta nātrija pivalāta ietekme uz sirds funkcionalitāti un mitohondriju enerģijas metabolismu.

2.3.1. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz išēmijas-reperfūzijas bojājumu

Lai gan nātrija pivalāta lietošana ticami samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirds audos par 37%, infarkta izmērs bija $64 \pm 2.7\%$ un neatšķīrās no kontroles grupas (2.8. attēls). Turklāt, nātrija pivalāta lietošana neietekmēja sirds funkcionālos parametrus (dati netiek parādīti).

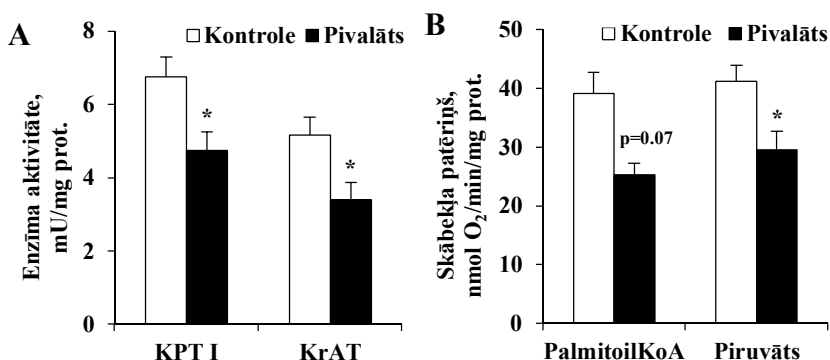


2.8. attēls. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz L-karnitīna koncentrāciju sirds audos (A) un infarkta izmēru (B)

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 10 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Štjūdenta t-tests, $P < 0,05$).

2.3.2. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz no L-karnitīna atkarīgiem enzīmiem un mitohondriju enerģijas metabolismu

Lai pētītu iespējamus mehānismus, kas nosaka kardioprotekcijas trūkumu pēc nātrija pivalāta lietošanas, no L-karnitīna atkarīgo enzīmu aktivitāte tika mērīta izolētos sirds mitohondrijos. KPT I aktivitāte pivalāta grupā bija būtiski samazināta par 30%, salīdzinot ar kontroles grupu (2.9. attēls A). Līdzīgi KrAT aktivitāte pivalāta grupā bija ticami samazināta par 34%, salīdzinot ar kontroles grupu (2.9. attēls A).



2.9. attēls. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz no L-karnitīna atkarīgo enzīmu aktivitāti (A) un enerģijas metabolismu (B) izolētos sirds mitohondrijos

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 3-6 žurkām. * Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t-tests vai Manna-Vitnija U-testa, $P < 0,05$).

Pēc 14 dienu nātrija pivalāta lietošanas no KPT I atkarīgais mitohondriju skābekļa patēriņš ar palmitoilKoA bija samazināts par 35% ($p = 0,07$) (2.9. attēls B). Skābekļa patēriņš ar piruvātu/malātu pēc nātrija pivalāta lietošanas bija ticami samazināts par 28% (2.9. attēls B). Kopumā iegūtie rezultāti rāda, ka nātrija pivalāta lietošana kavē gan TS, gan piruvāta metabolismu, tādējādi ir aizkavēta metabolisma pārslēgšanās un kardioprotektīvais efekts nav novērojams.

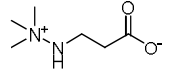
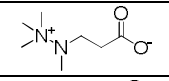
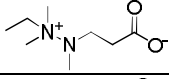
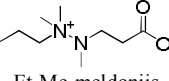
2.4. OCTN2 un BBOX inhibitoru ietekme uz L-karnitīna pieejamību

2.4.1. BBOX un OCTN2 inhibējošās aktivitātes pārbaude

Lai noteiktu efektīvāko mērķi L-karnitīna pieejamības samazināšanai, tika sintezēti 50 savienojumi (meldonija un GBB analogi) (*Tars*, 2014) un pārbaudītas to spējas kavēt L-karnitīna biosintēzi (BBOX enzīms) un transportu (OCTN2 nodrošinātais). Daļai meldonija analoģu to BBOX aktivitātes un OCTN2 nodrošinātā L-karnitīna transporta kavēšanas spējas ir attēlotas 2.2. tabulā. Daļai GBB analoģu to BBOX aktivitātes un OCTN2 nodrošinātā L-karnitīna transporta kavēšanas spējas ir attēlotas 2.3. tabulā.

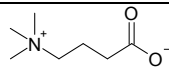
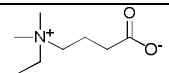
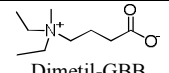
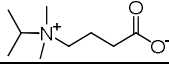
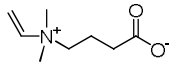
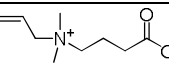
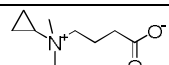
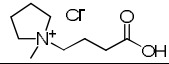
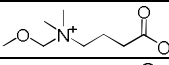
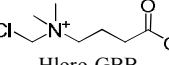
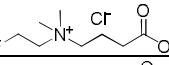
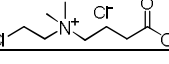
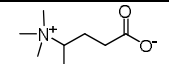
2.2. tabula

Meldonija analoģu BBOX aktivitātes un OCTN2 nodrošinātā L-karnitīna transporta kavēšanas spējas

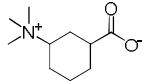
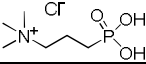
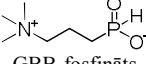
Nr.	Struktūra	Žurkas aknu BBOX IC ₅₀ , μM	Cilvēku BBOX IC ₅₀ , μM	OCTN2 IC ₅₀ , μM
	 Meldonijs	26 ± 2	62 (<i>Tars</i> , 2010)	62 ± 5
Slāpekļa modifikācija 4. pozīcijā				
10		0,17 ± 0,12	0,09 ± 0,05	54 ± 9
11		10,0 ± 2,0	7,2 ± 2,7	12,4 ± 2,5
12	 Et-Me-meldonijs	6,7 ± 4,4	3,1 ± 1,8	97 ± 5

IC₅₀ vērtības ir vidējais ± SD no 3 neatkarīgiem eksperimentiem.

**GBB analogu BBOX aktivitātes un OCTN2 nodrošinātā L-karnitīna
transporta kavēšanas spējas**

Nr.	Struktūra	Žurkas aknu BBOX IC ₅₀ , μM	Cilvēku BBOX IC ₅₀ , μM	OCTN2 IC ₅₀ , μM
	 GBB	-	-	3,9 ± 0,1
Trimetilamonija grupas modifikācija				
16	 Metil-GBB	2,8 ± 0,6	3,3 ± 1,8	3 ± 0,3
19	 Dimetil-GBB	> 1000	100 ± 36	14,6 ± 3,0
20	 N,N-dimethyl-N-isobutyl-GBB	34 ± 6	5,7 ± 1,6	4,8 ± 1,4
21	 N,N-dimethyl-N-allyl-GBB	49 ± 8	127 ± 32	1,9 ± 0,5
22	 N,N-dimethyl-N-(prop-1-en-2-yl)-GBB	30 ± 12	2,7 ± 0,8	12,7 ± 1,1
24	 N,N-dimethyl-N-(cyclopropylmethyl)-GBB	3,1 ± 0,6	2,1 ± 0,7	2,4 ± 0,5
30	 N,N-dimethyl-N-(cyclopentylmethyl)-GBB	1,40 ± 0,03	0,49 ± 0,24	4,4 ± 1,0
31	 N,N-dimethyl-N-(2-methoxyethyl)-GBB	168 ± 18	> 1000	36 ± 6
33	 Hloro-GBB	95 ± 3	268 ± 54	4,2 ± 2,5
36	 N,N-dimethyl-N-(2-chloroethyl)-4-(2-fluoroethyl)amino-4-oxobutanoate	0,78 ± 0,36	0,61 ± 0,22	7 ± 1,8
37	 N,N-dimethyl-N-(2-chloroethyl)-4-(2-fluoroethyl)amino-4-oxobutanoate	1,0 ± 0,2	0,26 ± 0,13	33 ± 6
Pamatstruktūras modifikācija				
41	 N,N-dimethyl-N-(2-methylpropyl)-GBB	452 ± 13	343 ± 117	26 ± 3

2.3. tabula (nobeigums)

Nr.	Struktūra	Žurkas aknu BBOX IC ₅₀ , μM	Cilvēku BBOX IC ₅₀ , μM	OCTN2 IC ₅₀ , μM
43		> 1000	> 1000	7,7 ± 3,0
Karbonskābes modifikācija				
46		10,2 ± 5,8	0,10 ± 0,03	> 100
47	 GBB-fosfināts	0,8 ± 0,1	0,52 ± 0,35	850 ± 122

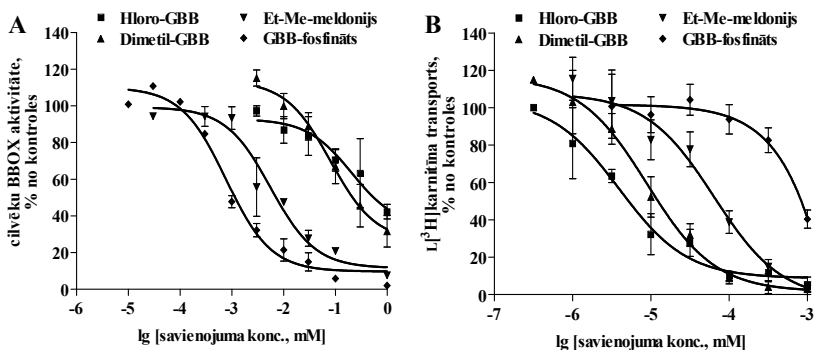
IC₅₀ vērtības ir vidējais ± SD no 3 neatkarīgiem eksperimentiem.

23 savienojumi demonstrēja labāku spēju kavēt cilvēku BBOX, salīdzinot ar meldoniju. Visaktīvākie savienojumi (Nr. **10** un **46**) bija vairāk nekā 600 reizes labāki BBOX inhibitori nekā meldonijs. 35 savienojumi bija līdzīgi vai labāki OCTN2 inhibitori nekā meldonijs. Visaktīvākajiem savienojumiem, kas kavēja OCTN2 (Nr. **21** un **24**), IC₅₀ vērtības bija apmēram 30 reizes zemākas nekā meldonija IC₅₀ vērtība. Pastāv cieša korelācija starp savienojumu spējām kavēt žurkas aknu un rekombinanto cilvēku enzīmu ($r = 0,876$, $p < 0,0001$), kas norāda, ka sintezētajiem savienojumiem ir līdzīga efektivitāte abās sugās. Sakarība starp savienojumu spējām kavēt BBOX un OCTN2 netika novērota (žurkas aknu BBOX $r = 0,172$, $p = 0,23$; cilvēku BBOX $r = 0,033$, $p = 0,82$).

2.4.2. BBOX un OCTN2 inhibitoru atlase turpmākajiem eksperimentiem

Lai salīdzinātu L-karnitīna biosintēzi un transportu kā mērķus L-karnitīna pieejamības samazināšanai *in vivo*, turpmākajiem eksperimentiem tika izvēlēti 4 savienojumi ar būtiski atšķirīgām BBOX un OCTN2 inhibējošām IC₅₀ vērtībām uz (2.10. attēls). Hloro-GBB un Dimetil-GBB bija salīdzinoši spēcīgi OCTN2 inhibitori un vāji BBOX inhibitori (rekombinantais cilvēku un

žurkas aknu enzīms) ar OCTN2 IC₅₀ vērtībām, attiecīgi, 4,2 μM un 14,6 μM. Turpretim Et-Me-meldonijs un GBB-fosfīnāts ir salīdzinoši spēcīgi BBOX inhibitori un vāji OCTN2 inhibitori ar BBOX (žurkas aknu enzīms) IC₅₀ vērtībām, attiecīgi, 6,7 μM un 0,8 μM un OCTN2 IC₅₀ vērtībām, attiecīgi, 97 μM un 850 μM.

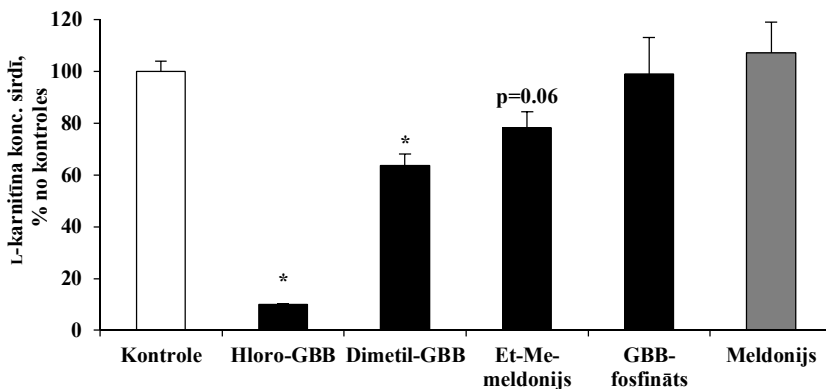


2.10. attēls. Izvēlēto savienojumu ietekme uz BBOX aktivitāti (A) un OCTN2 nodrošināto L-karnitīna transportu HEK293 šūnās (B)
Rezultāti ir vidējais ± SD no vismaz 3 neatkarīgiem eksperimentiem.

2.4.3. OCTN2 un BBOX inhibitoru ilgstošas lietošanas ietekme uz L-karnitīna koncentrāciju sirds audos

Vidējā L-karnitīna koncentrācija žurku sirds audos bija 715 ± 29 nmol/g (2.11. attēls). Ilgstoša (14 dienu) OCTN2 kavēšana efektīvāk samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirdī nekā BBOX kavēšana. Tādējādi visizteiktāko L-karnitīna koncentrācijas samazinājumu panāca ar visspēcīgāko OCTN2 inhibitoru no pārbaudāmajiem savienojumiem Hloro-GBB, kas samazināja L-karnitīna koncentrāciju par 90% (2.11. attēls). Dimetil-GBB, kas ir 3 reizes vājāks OCTN2 inhibitors, salīdzinot ar Hloro-GBB, samazināja L-karnitīna koncentrāciju par 35%. Savukārt ļoti vāja OCTN2 inhibitora Et-Me-meldonija lietošana samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirds audos tikai par 20%.

GBB-fosfināts nekavē OCTN2 un tādēļ neizmainīja L-karnitīna koncentrāciju sirds audos, lai gan bija visspēcīgākais no šajā pētījumā izmantotajiem BBOX inhibitoriem (2.10. attēls).

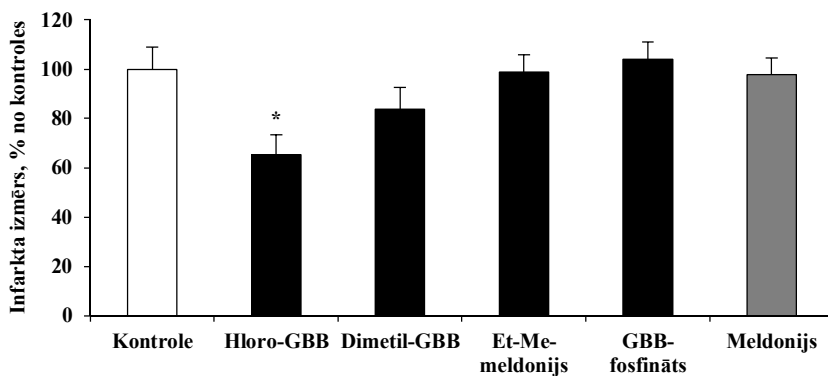


2.11. attēls. **Izvēlēto savienojumu un meldonija (visi devā 20 mg/kg) ietekme uz L-karnitīna koncentrāciju sirdī pēc 14 dienu lietošanas**
 Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 8-10 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $P < 0,05$).

Kopā ar 4 izvēlētajiem savienojumiem (Hloro-GBB, Dimetil-GBB, Et-Me-meldonijs, GBB-fosfināts) tika pārbaudīta vēl 12 savienojumu (**24, 16, 30, 20, 36, 43, 11, 22, 41, 37, 10**, meldonijs minēti 2.2. un 2.3. tabulās) ilgstošas lietošanas ietekme uz L-karnitīna koncentrāciju sirds audos. References savienojums meldonijs, kas ir salīdzinoši vājš OCTN2 inhibitors, devā 20 mg/kg neietekmēja L-karnitīna koncentrāciju sirds audos (2.11. attēls). Tika novērota ticama cieša korelācija ($r = 0,854$; $p < 0,0001$) starp pārbaudīto savienojumu OCTN2 IC_{50} vērtībām un L-karnitīna koncentrācijas samazinājumu sirds audos. Salīdzinājumā ar iepriekš minēto, pārbaudāmo savienojumu BBOX IC_{50} vērtības nekorelēja ar L-karnitīna samazinājumu sirds audos ($r = 0,0603$).

2.4.4. Ilgstošas OCTN2 un BBOX inhibitoru lietošanas pret-infarkta aktivitāte

Pēc 14 dienu Hloro-GBB lietošanas infarkta izmērs žurku sirdīs bija ticami samazināts par 35% (2.12. attēls). Otrs OCTN2 inhibitors Dimetil-GBB samazināja infarkta izmēru tikai par 17%; to varētu skaidrot ar nepietiekamu L-karnitīna koncentrācijas samazinājumu. BBOX inhibitori neietekmēja L-karnitīna koncentrāciju un tāpēc pārbaudāmajā devā nesamazināja infarkta izmēru žurku sirdīs (2.12. attēls). Arī references savienojums meldonijs devā 20 mg/kg nesamazināja infarkta izmēru pat pēc ilgstošas lietošanas (2.12. attēls).



2.12. attēls. Izvēlēto savienojumu un meldonija ietekme uz infarkta izmēru pēc 14 dienu lietošanas devā 20 mg/kg.

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 8-10 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $P < 0,05$).

2.5. Ilgstošas OCTN2 un BBOX inhibitora Metil-GBB

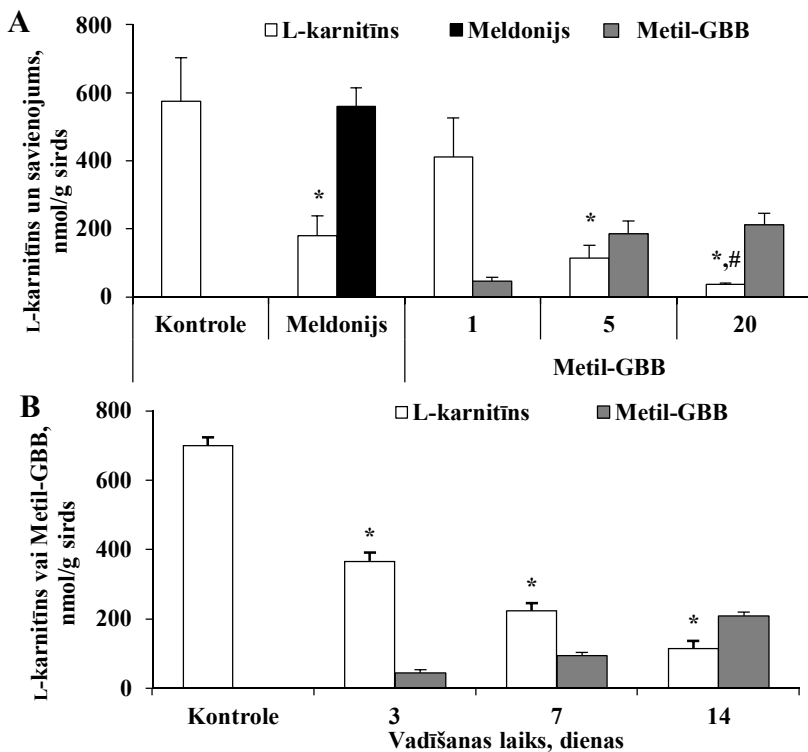
lietošanas ietekme uz enerģijas metabolismu un

išēmijas-reperfūzijas bojājumu

2.5.1. Metil-GBB lietošanas ietekme uz L-karnitīna pieejamību

Metil-GBB ietekmi uz L-karnitīna sistēmu var izskaidrot ar tā spēju vienlaicīgi kavēt BBOX un OCTN2 (2.3. tabula). Salīdzinot ar meldoniju, Metil-GBB ir 8 reizes spēcīgāks L-karnitīna biosintēzes enzīma BBOX inhibitors (IC_{50} 3 μ M pret 26 μ M) un 20 reizes spēcīgāks OCTN2 nodrošināta L-karnitīna transporta inhibitors (IC_{50} 3 μ M pret 62 μ M). Metil-GBB ne tikai kavē L-karnitīna transportu caur OCTN2, bet arī pats tiek transportēts ar OCTN2 palīdzību, tādēļ augsta Metil-GBB afinitāte pret OCTN2 nodrošina tā vieglu transportu audos. Pēc 14 dienu lietošanas devās 1, 5 un 20 mg/kg Metil-GBB koncentrācija sirdī bija attiecīgi 47, 185 un 221 nmol/g sirds (2.13. attēls A). Metil-GBB koncentrācija sirdī palielinājās no laika atkarīgā veidā (2.13. attēls B), sasniedzot maksimumu pēc 14 dienām. Kā redzams 2.13. attēlā A, 2 nedēļu ilga meldonija lietošana devā 100 mg/kg būtiski samazināja sirds L-karnitīna koncentrāciju par 75%. Salīdzinot ar iepriekš minēto, Metil-GBB lietošana devās 1, 5 un 20 mg/kg samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirdī attiecīgi par 42%, 84% un 95%.

Lai pētītu no lietošanas laika atkarīgu Metil-GBB ietekmi uz L-karnitīna koncentrācijas izmaiņām, tā sirds audos tika noteikta pēc 3, 7, un 14 dienu Metil-GBB lietošanas. Kā redzams 2.13. attēlā B, Metil-GBB samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirdī no laika atkarīgā veidā.

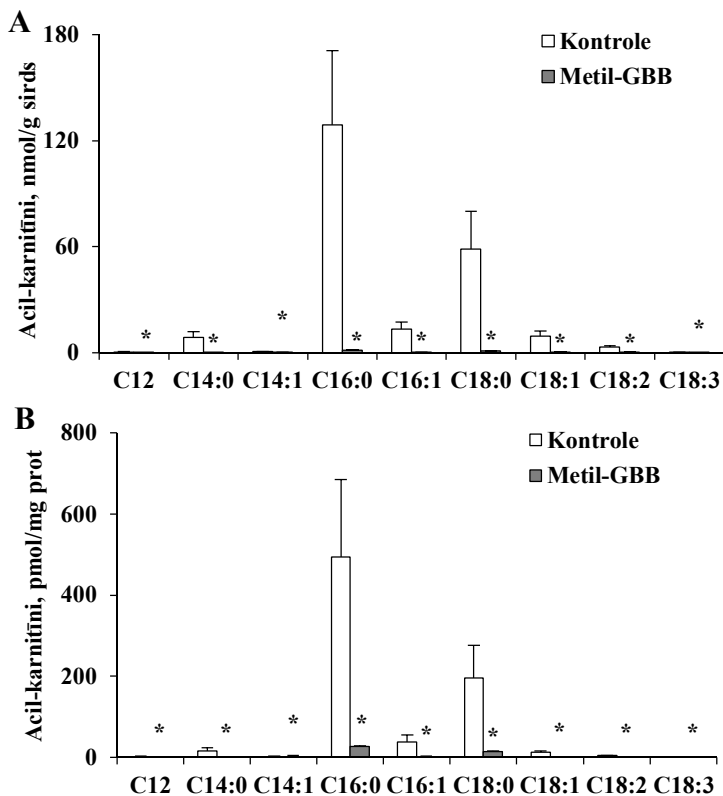


2.13. attēls. L-karnitīna un savienojumu koncentrācijas sirds audos pēc meldonija (100 mg/kg) vai Metil-GBB (1, 5 un 20 mg/kg) 14 dienu lietošanas (A) un pēc 3, 7, 14 dienu Metil-GBB lietošanas devā 5 mg/kg (B) Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $P < 0,05$), # Statistiski ticami atšķiras no meldonija grupas (Tukija tests, $P < 0,05$).

2.5.2. Metil-GBB lietošanas ietekme uz acil-karnitīnu koncentrāciju sirdī

Pēc Metil-GBB lietošanas acil-karnitīnu koncentrācija būtiski samazinājās gan sirdī, gan mitohondrijos (2.14. attēls A un B). Metil-GBB lietošana izraisīja būtisku līdz pat 50 reizu lielu garķēžu acil-karnitīnu koncentrācijas samazinājumu, tādējādi saistību starp L-karnitīna koncentrācijas

samazinājumu un pasargātu mitohondriju funkciju reperfūzijas laikā varētu izskaidrot ar samazinātu garķēžu acil-karnitīnu koncentrāciju.



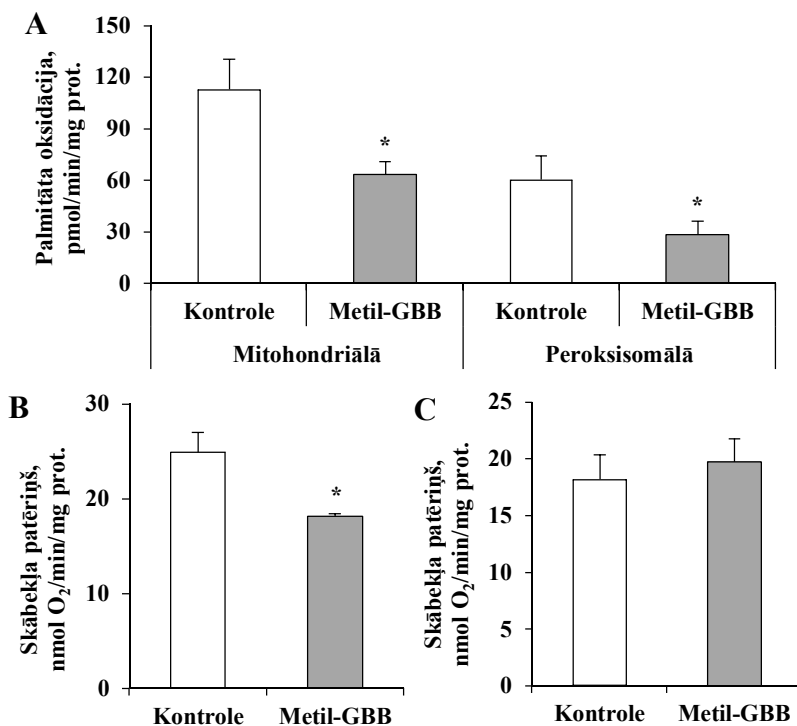
2.14. attēls. **Ilgstošas Metil-GBB (10 mg/kg) lietošanas ietekme uz sirds (A) un mitohondriju (B) acil-karnitīnu koncentrāciju**

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5-8 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdentā t-tests, $P < 0,05$).

2.5.3. Metil-GBB lietošanas ietekme uz TS un glikozes oksidāciju sirdī

Vispirms Metil-GBB ietekme uz TS metabolismu tika pētīta mitohondrijos un peroksisomās. Metil-GBB lietošana ticami samazināja gan mitohondriālās, gan peroksisomālās palmitāta oksidācijas ātrumu attiecīgi par

44% un 53% (2.15. attēls A). Pēc 14 dienu Metil-GBB lietošanas no L-karnitīna atkarīgais mitohondriju skābekļa patēriņš ar palmitoilKoA kā substrātu ticami samazinājās par 27% (2.15. attēls B), bet no L-karnitīna neatkarīgais mitohondriju skābekļa patēriņš ar palmitoil-karnitīnu kā substrātu netika ietekmēts (2.15. attēls C).

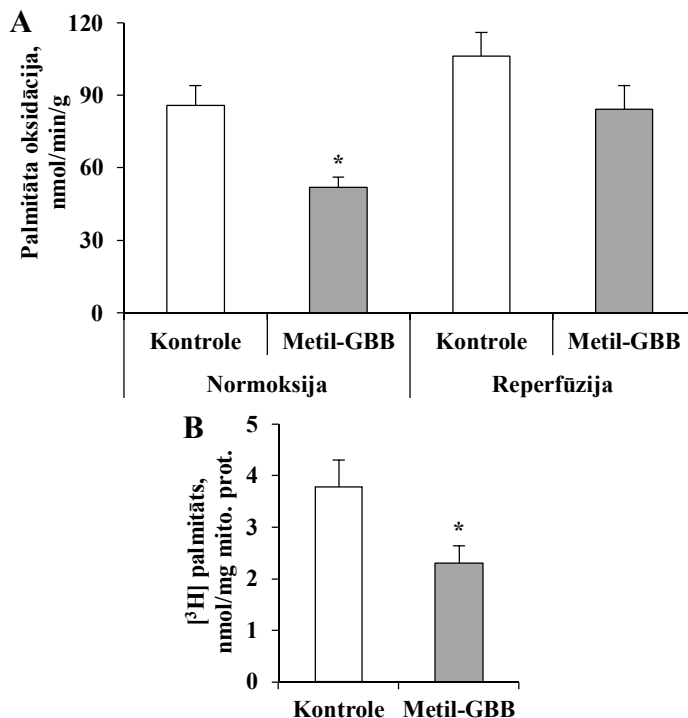


2.15. attēls. Ilgstošas Metil-GBB (10 mg/kg) lietošanas ietekme uz mitohondriālās un peroksisomālās [¹⁴C]palmitāta oksidācijas ātrumiem (A) un uz mitohondriālo no L-karnitīna atkarīgo skābekļa patēriņu ar 10 μM palmitoilKoA (B) un no L-karnitīna neatkarīgo skābekļa patēriņu ar 10 μM palmitoil-karnitīnu (C)

Rezultāti ir vidējais ± SEM no 5-6 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdena t-tests, P < 0,05).

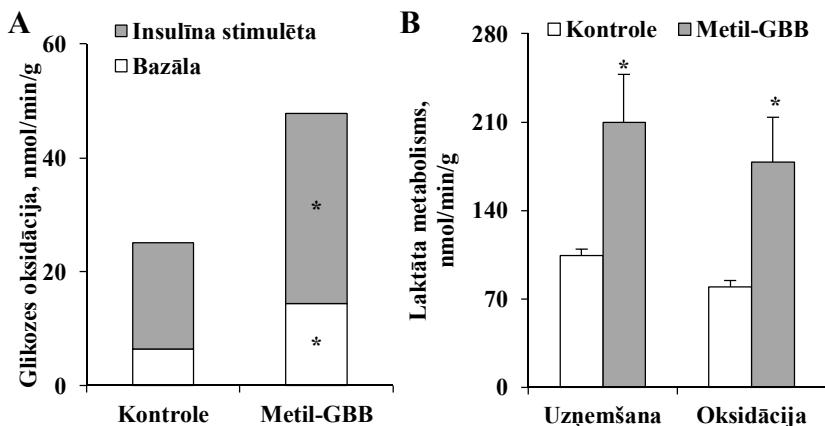
Tālāk Metil-GBB ietekme uz TS metabolismu tika noteikta izolētās sirds modelī. Pretstatā iepriekš novērotajai meldonija ietekmei (Liepinsh, 2013a),

Metil-GBB iezīmētā palmitāta oksidāciju izolētā sirdī ticami samazināja par 40% (2.16. attēls A). TS oksidācijas palielinājumu novēroja pēc reperfūzijas Metil-GBB grupā (2.16. attēls A), turklāt Metil-GBB lietošana samazināja iezīmētā palmitāta koncentrāciju mitohondrijos, tādējādi samazinot arī TS uzkrāšanas risku (2.16. attēls B).



2.16. attēls. Ilgstošas Metil-GBB (10 mg/kg) lietošanas ietekme uz [³H]palmitāta oksidāciju izolētā sirdī (A) un mitohondriālo [³H]palmitāta koncentrāciju (B)

Rezultāti ir vidējais ± SEM no 5-6 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdentā t-tests, P < 0,05).



2.17. attēls. Ilgstošas Metil-GBB (10 mg/kg) lietošanas ietekme uz bazālo un insulīna stimulēto [^{14}C]glikozes oksidāciju (A), [^{14}C]laktāta uzņemšanu un oksidāciju (B) izolētās žurku sirds modelī

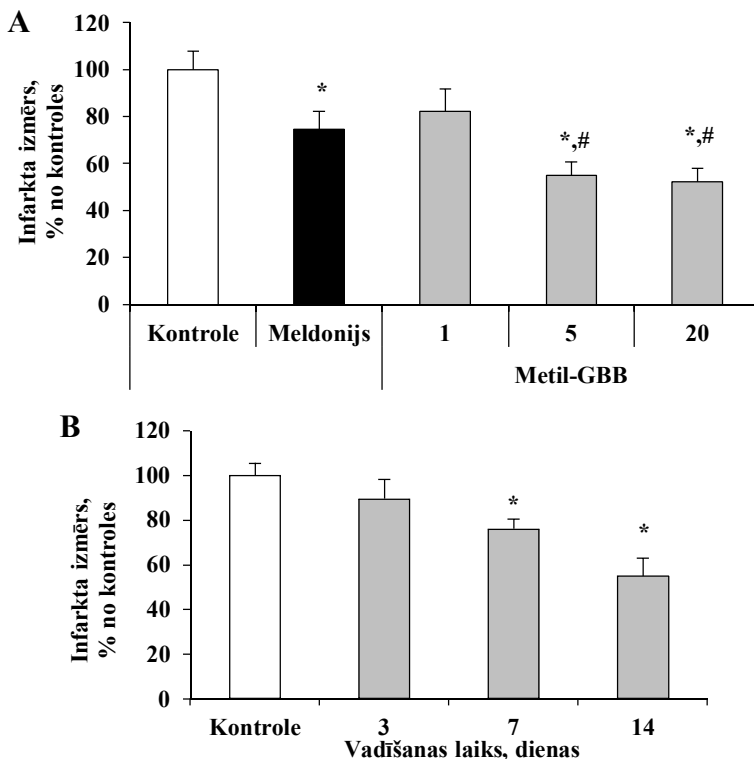
Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5-6 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdena t-tests, $P < 0,05$).

Metil-GBB lietošana samazināja TS oksidāciju un sekojoši stimulēja glikozes oksidāciju (2.17. attēls A). Pēc Metil-GBB lietošanas novēroja būtiski, 2 reizes, palielinātu glikozes oksidāciju izolētās žurku sirdīs, kas perfuzētas gan ar zemu, gan ar augstu insulīna koncentrāciju saturošu buferšķīdumu. Līdzīgi iepriekš minētajam, Metil-GBB lietošana palielināja laktāta uzņemšanas un oksidācijas ātrumus izolētās sirdīs (2.17. attēls B). Domājams, ka Metil-GBB lietošana izraisa daļēju enerģijas ieguves pārslēgšanos no TS uz glikozes oksidāciju.

2.5.4. Metil-GBB lietošanas ietekme uz sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu

Meldonija un Metil-GBB pretinfarkta efektus pētīja gan izolētās žurku sirds *in vitro* išēmijas-reperfūzijas modelī, gan *in vivo*. Kā redzams 2.18. attēlā A, meldonija lietošana devā 100 mg/kg samazināja infarkta izmēru

par 25%, salīdzinot ar infarkta izmēru kontroles grupā. Turpretī Metil-GBB devās 5 un 20 mg/kg samazināja infarkta izmēru par 45–48%. Jāsecina, ka Metil-GBB 20 reizes zemākā devā ir gandrīz 2 reizes efektīvāks nekā meldonijs.

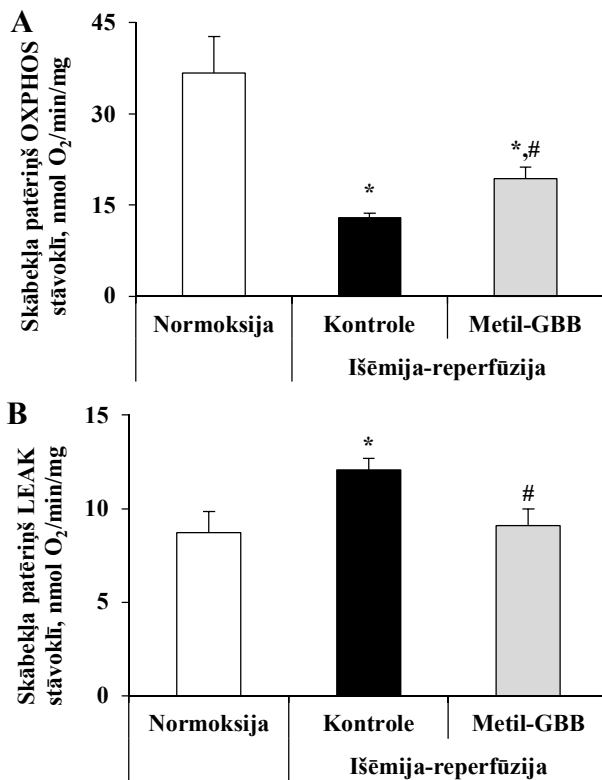


2.18. attēls. Meldonija (100 mg/kg) un Metil-GBB (1, 5 un 20 mg/kg) ietekme uz infarkta izmēru pēc 14 dienu lietošanas (A). Metil-GBB (5 mg/kg) ietekme uz infarkta izmēru pēc 3, 7, 14 dienu lietošanas (B)

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 8-10 žurkām. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija tests, $P < 0,05$), # Statistiski ticami atšķiras no meldonija grupas (Tukija tests, $P < 0,05$).

Iepriekšējā pētījumā atrasts, ka meldonija kardioprotektīvais efekts parādās tikai pēc 14 dienu lietošanas (Liepinsh, 2006); tādēļ tika pārbaudīts ievadīšanas laika atkarīgais Metil-GBB efekts. Pēc 7 dienu lietošanas

Metil-GBB ticami samazināja infarkta izmēru par 24% (2.18. attēls B). Kopumā, līdzīgi meldonijam, ir nepieciešama ilgstoša Metil-GBB lietošana, lai sasniegtu maksimālu kardioprotekciju.



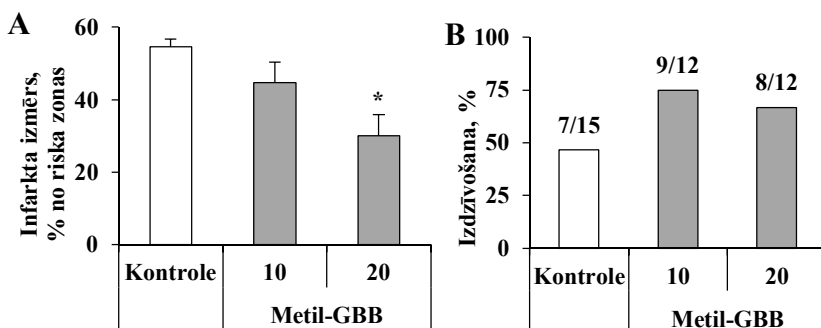
2.19. attēls. Metil-GBB (20 mg/kg) lietošanas ietekme uz ADF-stimulēto mitohondriju skābekļa patēriņu (OXPHOS stāvoklis) (A) un oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšanu (LEAK stāvoklis) (B) sirds muskuļu šķiedrās, kas izolētas pēc išēmijas-reperfūzijas

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no 5 žurkām. * Statistiski ticami atšķiras no normoksijas (Tukija test, $P < 0,05$), # Statistiski ticami atšķiras no išēmiskās kontroles grupas (Tukija tests, $P < 0,05$).

Pēc išēmijas-reperfūzijas skābekļa patēriņš OXPHOS stāvoklī bija 2,8 reizes samazināts, bet LEAK stāvoklī palielināts par 40% (2.19. attēls). Metil-GBB lietošana būtiski pasargāja no išēmijas-reperfūzijas izraisītajiem

mitochondriju funkciju traucējumiem. Mitochondriju skābekļa patēriņš OXPHOS stāvoklī bija palielināts par 50%, salīdzinot ar išēmisko kontroli (2.19. attēls A). Saskaņā ar skābekļa patēriņa mērījumiem LEAK stāvoklī Metil-GBB pilnīgi pasargāja no išēmijas-reperfūzijas izraisītas oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšanas (2.19. attēls B).

In vivo miokarda infarkta modelī noteica Metil-GBB (devās 10 un 20 mg/kg) 14 dienu ilgas lietošanas efektus. Metil-GBB ievadīšana no devas atkarīgi samazināja infarkta izmēru par 18% līdz 45% *Wistar* žurkās, kas bija pakļautas sirds kreisās lejupejošās koronārās artērijas oklūzijai un reperfūzijai *in vivo* (2.20. attēls A). Turklāt Metil-GBB lietošana par 20–30% uzlaboja žurku izdzīvošanu 24 stundu periodā pēc manipulācijas (2.20. attēls B).



2.20. attēls. Metil-GBB (10 un 20 mg/kg) lietošanas ietekme uz infarkta izmēru (A) un žurku 24 stundu izdzīvošanu (B)

Rezultāti ir vidējais \pm SEM no vismaz 7 žurkām. * Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukija test, $P < 0,05$).

Rezultāti liecina, ka Metil-GBB lietošanai ir kardioprotektīva darbība išēmijas-reperfūzijas bojājumu eksperimentālajos modeļos *ex vivo* un *in vivo*.

3. DISKUSIJA

Promocijas darbs apraksta sirds enerģijas metabolisma norišu saistību ar sirds išēmijas-reperfūzijas bojājuma iznākumu, garķēžu acil-karnitīnu lomu enerģijas metabolisma regulācijā un L-karnitīna pieejamības samazināšanu kā stratēģiju acil-karnitīnu pieejamības regulācijai. Pirmkārt, sirds enerģijas metabolisma norišu saistība ar sirds išēmijas-reperfūzijas bojājuma iznākumu noteikta ēdušiem un tukšas dūšas dzīvniekiem. Otrkārt, sirdī pētīta garķēžu acil-karnitīnu loma enerģijas metabolisma norišu regulācijā. Treškārt, salīdzināti dažādi potenciāli zāļu mērķi, lai noskaidrotu visefektīvāko stratēģiju L-karnitīna un acil-karnitīnu pieejamības samazināšanai. Ceturtkārt, pētīta līdersavienojuma ietekme uz sirds enerģijas metabolismu un sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu.

3.1. Sirds enerģijas metabolisma norišu saistība ar išēmijas-reperfūzijas bojājumu

Darba rezultāti liecina, ka veselās kontroles un diabētiskās dzīvnieku sirdīs pēc ēšanas infarkta izmērs ir būtiski mazāks, salīdzinot ar infarktu tukšā dūšā. Insulīna atkarīgo signālceļu aktivācijas rezultātā pastiprinās glikozes metabolismā iesaistīto gēnu ekspresija un samazinās aktivēto TS kavējošā ietekme uz glikozes metabolismu, tāpēc pēc ēšanas sirds audi oksidē vairāk glikozes un mazāk palmitāta, salīdzinot ar stāvokli tukšā dūšā. Palielināta TS slodze tukšā dūšā izraisa mitohondriālās oksidatīvās fosforilēšanas atjūgšanu un enerģijas zudumu. Mūsu rezultāti rāda, ka *pēc ēšanas sirds atgūšanās pēc išēmijas-reperfūzijas bojājuma ir uzlabota* palielinātas glikozes un laktāta oksidācijas un samazinātas TS slodzes dēļ.

Ir publicēti acīmredzami pierādījumi, ka palielināta glikozes oksidācija pasargā no miokarda infarkta izraisītā šūnu bojājuma (Hafstad, 2007; Liu, 1996; Ussher, 2012). Tukšā dūšā glikozes, laktāta un piruvāta oksidācijas

rezultātā rodas mazāk nekā 5% no kopējā ATF, kas noved pie būtiska sirds audu bojājuma miokarda infarkta gadījumā. Pēc ēšanas būtiski palielinās glikozes oksidācija, kas nodrošina labāku izdzīvošanu išēmiskos apstākļos un uzlabo atgūšanos reperfūzijā. Glikozes, laktāta un piruvāta oksidācijas pieaugums ir vairāk atkarīgs no insulīna-atkarīgiem signālceļiem nekā no cirkulējošām glikozes un laktāta koncentrācijām. No insulīna atkarīgie signālceļi ietekmē glikozes transportu un metabolismu, izmainot iesaisīto gēnu ekspresiju un enzīmu aktivitātes. Līdzīgi TS oksidācija ir daļēji samazināta sirdīs, kas izolētas no ēdušām žurkām. Insulīna aktivētie signālceļi kavē TS metabolismu, būtiski samazinot aktivēto garķēžu TS koncentrāciju sirdī un mitohondrijos. Šo procesu rezultātā pēc ēšanas ir samazināts TS izraisītā mitohondriju bojājuma risks miokarda infarkta gadījumā.

Līdzīgi kā iepriekšējos pētījumos (*Mjos, 1971; Simonsen, 1978*) novērojām, ka augsta TS plūsma tukšā dūšā samazina sirds darba efektivitāti. Palielinātā TS oksidācija tukšā dūšā noved pie lielākas vajadzības pēc skābekļa, kas palielina sirds bojājuma risku hipoksiskos apstākļos. Kopumā, iegūtie rezultāti sniedz papildus pierādījumus, ka TS ir mazāk efektīvs enerģijas substrāts un ka palielināta TS slodze paaugstina neatgriezeniska sirds bojājuma risku un letālu kardiovaskulāru notikumu varbūtību.

Lai gan pirmsoperāciju badošanās pieaugušajiem ir obligāta, lai samazinātu operāciju komplikācijas, badošanās var arī izraisīt ar hipoglikēmiju saistītus efektus (*Awad, 2012; Ljungqvist, 2009; van Hoorn, 2005*). Pieaugošs datu daudzums par glikozes un TS metabolismu mijiedarbību akūta miokarda infarkta laikā norāda uz sirds-specifisku glikozes metabolismu stimulējošu savienojumu nepieciešamību (*Diks, 2005; Lutikhhold, 2013; van den Brom, 2013; van Hoorn, 2005*). GIK infūziju ilgi ieteica miokarda protekcijai (*Sievers, 1966*), tomēr klīnisko pētījumu rezultāti bija pretrunīgi (*Grossman, 2013; Zhao, 2010*). Mūsu pētījuma iegūtie rezultāti vedina domāt, ka cilvēkiem postprandiālā stāvoklī glikozes un insulīna koncentrācijas jau ir salīdzinoši

augstas, un ir ierobežotas iespējas papildus palielināt glikozes oksidāciju ar insulīna un glikozes infūziju. Tāpēc aizsargefektu var sagaidīt tikai tādā gadījumā, ja GIK ir ievadīts tukšā dūšā. Turklāt klīniskā iznākuma uzlabojumu var panākt, ja GIK ievada pirmajās stundās pēc akūta koronārā sindroma simptomu parādīšanas (*Grossman, 2013*). Līdz ar to, ja kardiovaskulāru notikumu simptomi parādās tukšā dūšā, ar ogļhidrātiem bagātas pārtikas vai dzērienu uzņemšana var būt dzīvību glābjoša.

Aptaukošanās izraisīta insulīna rezistence ir nopietns kardiovaskulāro saslimšanu riska faktors (*Bhat, 2013; Lavie, 2009*), tāpēc ilgstošas zemu kaloriju satura diētas ir labvēlīgas diabēta un kardiovaskulāro komplikāciju aizkavēšanai. Tomēr akūta vai ekstrēma badošanās var ievērojami samazināt plazmas glikozes koncentrāciju, kas var izraisīt kardiovaskulāros notikumus, turklāt palielināta TS pieejamība tukšā dūšā palielina kardiovaskulāro notikumu smagumu. Zema ogļhidrātu satura diētu gadījumā zemu plazmas glikozes līmeni novēro arī postprandiālā stāvoklī. Mūsu rezultāti parāda, ka ir svarīgi ieteikt augsta riska pacientiem izvairīties no diētām ar zemu ogļhidrātu saturu un ilgstošiem badošanās periodiem.

Noslēgumā jāsecina, ka mūsu rezultāti norāda, ka glikozes un laktāta oksidācija ir svarīga išēmiskas sirds izdzīvošanai, un pat vienas nakts badošanās izraisīta hipoglikēmija un palielināta TS slodze var veicināt tādas kardiovaskulārus notikumus kā stenokardija un aritmijas.

3.2. Garķēžu acil-karnitīnu loma sirds enerģijas metabolisma regulācijā

Mēs pārbaudījām, vai aktivētu TS pieejamība nosaka enerģijas metabolisma norises sirds mitohondrijos. Iegūtie rezultāti liecina, ka TS un glikozes metabolisma starpprodukti konkurē par iesaistīšanos enerģijas metabolisma procesos ne tikai sirdī (Randla cikls), bet arī sirds mitohondrijos.

Sirds mitohondrijos enerģijas metabolisms galvenokārt ir atkarīgs no substrātu, it sevišķi acil-karnitīnu, pieejamības, turklāt, paaugstināta acil-karnitīnu koncentrācija samazina glikozes oksidāciju sirdī. Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka acil-karnitīnu veidošanās ātrums nosaka enerģijas metabolisma norises sirds mitohondrijos un tādējādi arī sirdī. Jāatzīmē, ka palielināta garķēžu acil-karnitīnu koncentrācija var sekmēt insulīna rezistences attīstību.

Enerģijas metabolisma norises sirdī galvenokārt nosaka enerģijas substrātu pieejamība plazmā un no insulīna atkarīgie signālceļi (*Lopaschuk, 2010; Randle, 1998*). Tomēr saskaņā ar mūsu pētījumu iegūtajiem rezultātiem, raksturīgāko iekššūnu enerģijas substrātu, laktāta un garķēžu TS, koncentrācijas sirds audos ir vienādas tukšā dūšā un pēc ēšanas. Turpretim aktivēto garķēžu TS koncentrācija ir būtiski paaugstināta plazmā un sirds audos tukšā dūšā, salīdzinot ar ēdušiem dzīvniekiem. Papildus tam fizioloģiskā garķēžu acilKoA koncentrācija sirdī ir pārāk zema, lai ietekmētu glikozes metabolismu, savukārt garķēžu acil-karnitīnu koncentrācija ir 29 reizes augstāka nekā garķēžu acilKoA koncentrācija un ir pietiekama lai noteiktu enerģijas metabolisma norises sirds audos.

Substrātu konkurences eksperimenti parādīja, ka ne laktāts, ne piruvāts fizioloģiskās koncentrācijās nevar ietekmēt garķēžu TS oksidāciju. Saskaņā ar agrāko pētījumu (*Yoshida, 2007*), mēs parādījām, ka laktāts fizioloģiskās koncentrācijās nespēj kavēt TS oksidāciju izolētos sirds mitohondrijos. Piruvāts spēja ticami kavēt TS oksidāciju tikai koncentrācijā, kas būtiski pārsniedz fizioloģisko (15 mM). Tādēļ fizioloģiskā piruvāta koncentrācija, kas ir atrodama sirds šūnās (*Brooks, 1999; Zhao, 2008*), ir pārāk zema, lai ietekmētu TS metabolismu. Tikmēr fizioloģiskā garķēžu acil-karnitīnu koncentrācija, kas atrodama sirds audos, ir pietiekama, lai efektīvi samazinātu piruvāta un laktāta oksidāciju sirds mitohondrijos un sekojoši glikozes izmantošanu sirdī. Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka ***garķēžu acil-karnitīnu koncentrācija nosaka piruvāta un laktāta metabolisma ātrumus mitohondrijos, bet ne otrādi.***

Insulīna rezistences attīstība saistīta ar nepilnīgu TS oksidāciju un sekojošu TS metabolītu uzkrāšanos (Bell, 2010; Koves, 2005, 2008; Muoio, 2012). Turklāt pierādīts, ka TS izraisītos glikozes metabolisma traucējumus L6 muskuļšūnās novēro tikai L-karnitīna klātbūtnē (Koves, 2008). Šie dati norāda, ka acil-karnitīni var veicināt insulīna rezistences attīstību, taču līdz šim tam nav tiešu pierādījumu. Šajā pētījumā atklājām, ka palmitoil-karnitīns efektīvi samazina glikozes (piruvāta-laktāta) izmantošanu mitohondrijos, izolētā žurkas sirdī un *in vivo*. Iegūtie rezultāti saista insulīna rezistences attīstību ar palielinātu garķēžu acil-karnitīnu pieejamību. Iepriekš parādīts, ka aktivētās garķēžu TS izraisa mitohondriju funkciju traucējumus (Koves, 2008; Tominaga, 2008), un garķēžu acil-karnitīnu koncentrācijas samazinājums mitohondrijos var būt labvēlīgs, lai pasargātu no išēmijas-reperfūzijas bojājuma (Liepinsh, 2013a). Iegūtie dati norāda, ka garķēžu acil-karnitīnu pieejamības regulēšana var kalpot arī kā jauna stratēģija insulīna rezistences ārstēšanai.

Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka garķēžu acil-karnitīnu koncentrācija nosaka mijiedarbību starp glikozes (piruvāta-laktāta) un garķēžu TS metabolismu sirds mitohondrijos un sirdī. Turklāt garķēžu acil-karnitīnu uzkrāšanās mitohondrijos izraisa traucējumus glikozes metabolismā.

3.3. L-karnitīna pieejamības samazināšana kā zāļu mērķis kardioprotekcijai

3.3.1. Nātrija pivalāta lietošanas ietekme uz sirds enerģijas metabolismu un išēmijas-reperfūzijas bojājumu

Mūsu pētījumā pārbaudījām īslaicīgas, bet augstas nātrija pivalāta devas lietošanas ietekmi uz sirds enerģijas metabolismu. Iegūtie rezultāti rāda, ka papildus no KPT I-atkarīgai TS oksidācijas samazināšanai nātrija pivalāta lietošana izraisa traucējumus piruvāta metabolismā sirds mitohondrijos. Tā rezultātā kopējais enerģijas metabolisms sirdī var būt traucēts.

Pārslēgšanās no garķēžu TS metabolisma uz glikozes izmantošanu ir kardioprotektīva. Tādējādi TS metabolisma kavēšana ar malonilKoA (*Ussher*, 2009) un L-karnitīna biosintēzes un transporta inhibitora melndonija (*Kuka*, 2012; *Liepinsh*, 2006) lietošana pasargā sirdi no išēmijas-reperfūzijas bojājuma. Nātrija pivalāts neizraisa pietiekamu L-karnitīna koncentrācijas samazinājumu, lai kavētu KPT I aktivitāti no L-karnitīna atkarīgā veidā, jo sirds KPT I L-karnitīna K_m vērtība ir būtiski zemāka (*McGarry*, 1983) kā L-karnitīna koncentrācija, kas atrasta sirdī pēc pivalāta lietošanas. Tādējādi pretēji meldonijam, pivalāts samazina no KPT I atkarīgo TS metabolismu neatkarīgi no samazinātās L-karnitīna koncentrācijas. Turklāt, neskatoties uz brīvā L-karnitīna koncentrācijas un KPT I aktivitātes samazinājumu sirds audos, izmaiņas garķēžu acil-karnitīnu koncentrācijā pēc nātrija pivalāta lietošanas nav novērotas (*Broderick*, 1995).

Iepriekš parādīts, ka pivalāta lietošana izsmel mitochondriālo brīvā KoA saturu hepatocītos pivaloilKoA veidošanās dēļ (*Ruff*, 1991). Turklāt dažādos audos, ieskaitot sirdi, pēc pivalāta lietošanas novērots acetil-karnitīna koncentrācijas samazinājums (*Broderick*, 1995; *Kato*, 2012; *Nakajima*, 1999). Mūsu rezultāti sirds mitohondrijos ir saskaņā ar iepriekš minētajiem novērojumiem, jo KrAT aktivitāte bija būtiski samazināta. KrAT regulē acetilKoA/brīva KoA attiecību (*Zammit*, 2009), un parādīts, ka tādējādi tiek regulēta substrātu piegāde sirdī atbilstoši metaboliskām vajadzībām (*Schroeder*, 2012). Ir zināms, ka acetilKoA uzkrāšanās un brīvā KoA daudzuma samazinājums samazina PDH kompleksa aktivitāti (*Stanley*, 2005); ar to var izskaidrot mitohondriju skābekļa patēriņa novēroto samazinājumu ar piruvātu/malātu kā substrātiem. Tādējādi pretēji meldonija gadījumā novērotajam efektam pivalāts kavē gan TS, gan piruvāta metabolismu un izsmel KoA rezerves, un tāpēc tas neizraisa metabolisma pārslēgšanos, kā rezultātā nenovēro kardioprotektīvo efektu.

Kopumā iegūtie rezultāti rāda, ka pivalāts izraisa izmaiņas L-karnitīna homeostāzē, bet neietekmē sirds funkcionalitāti, lai gan pivalāts vai tā metabolīti tieši traucē mitohondriju enerģijas metabolismu. Tāpēc pivalāts nav piemērots farmakoloģisks līdzeklis, lai samazinātu L-karnitīna un acil-karnitīnu pieejamību.

3.3.2. BBOX un OCTN2 inhibitoru ietekme uz L-karnitīna pieejamību un sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu

Tā kā BBOX un OCTN2 pārstāv divas pieejas L-karnitīna pieejamības samazināšanai, tad tika pārbaudīta 50 savienojumu ietekme uz L-karnitīna biosintēzi (BBOX aktivitāte) un transportu šūnās (OCTN2 nodrošināts L-karnitīna transports), lai izvēlētos savienojumus kardioprotektīvās aktivitātes novērtēšanai. Mēs atradām virkni savienojumu ar kavēšanas aktivitāti zemā μM diapazonā, un daži no pārbaudītajiem savienojumiem bija salīdzinoši selektīvi vai nu BBOX, vai OCTN2 inhibitori. Tāpēc šos savienojumus varēja izmantot, pirmkārt, lai salīdzinātu BBOX un OCTN2 kā molekulārus zāļu mērķus L-karnitīna koncentrācijas samazināšanai, otrkārt, lai pasargātu sirdi no išēmijas-reperfūzijas izraisīta miokarda infarkta.

Tikai maza daļa no kopējā organisma L-karnitīna daudzuma cirkulē asinīs, jo OCTN2 nodrošinātā L-karnitīna reabsorbcijas kapacitāte ir ierobežota un sasniedz tikai $50 \mu\text{M}$ (Pochini, 2013). Turklāt OCTN2 ir plaši ekspresēts un nodrošina augstu L-karnitīna koncentrāciju audos. Tādējādi lai izraisītu būtiskas izmaiņas L-karnitīna koncentrācijā sirdī un citos audos, ir nepieciešams ilgstoši vienlaicīgi kavēt OCTN2 nodrošinātu L-karnitīna transportu un reabsorbciju nierēs. Pēc 14 dienu OCTN2 inhibitoru lietošanas bija būtiski samazināta L-karnitīna koncentrācija sirds audos, un OCTN2 kavēšana (IC_{50} vērtības) cieši korelēja ar L-karnitīna koncentrācijas samazinājumu sirdī. Turpretī pēc ilgstošas selektīvu BBOX inhibitoru lietošanas vienādās devās L-karnitīna koncentrācija sirds audos bija samazināta

tikai par 20%. Kopumā jāsecina, ka, **salīdzinot ar BBOX inhibitoriem, selektīvie OCTN2 inhibitori ir efektīvāki, lai samazinātu L-karnitīna koncentrāciju sirds audos.**

L-karnitīna koncentrācijas samazinājums sirdī pasargā sirds mitohondrijus no garķēžu acil-karnitīnu pārslodzes (Liepinsh, 2013a). Meldonija gadījumā, lai panāktu kardioprotektīvu efektu sirdī, ir nepieciešama 14 dienu ilga lietošana (Liepinsh, 2006). Iepriekš parādīts, ka ir nepieciešams samazināt L-karnitīna daudzumu sirdī vismaz par 60%, lai samazinātu no L-karnitīna atkarīgo TS metabolismu un līdztekus stimulētu glikozes metabolismu (Kuka, 2012; Liepinsh, 2008, 2009, 2013a). Mūsu pētījumā tikai visspēcīgākā OCTN2 inhibitora Hloro-GBB lietošana būtiski samazināja miokarda infarkta izmēru žurku sirdī. Salīdzinājumam mazāk spēcīgais inhibitors Dimetil-GBB līdzīgā devā būtiski nesamazināja infarkta izmēru. Tas var būt izskaidrojams ar nepietiekamu L-karnitīna koncentrācijas samazinājumu sirdī. Visspēcīgāko BBOX inhibitoru lietošana neizmainīja L-karnitīna koncentrāciju sirds audos un tāpēc arī nepasargāja no miokarda infarkta. Kopumā, **salīdzinot ar selektīvu BBOX kavēšanu, selektīva OCTN2 inhibēšana ir daudz efektīvāks veids, lai samazinātu L-karnitīna daudzumu un samazinātu infarkta izmēru sirdī.**

3.4. L-karnitīna pieejamības samazinājums kā veids acil-karnitīnu uzkrāšanās novēršanai un kardioprotekcijas sasniegšanai

Mūsu pētījumā parādīts, ka Metil-GBB, kas ir jauns BBOX un OCTN2 inhibitors, pasargā miokardu no išēmijas un reperfūzijas izraisītiem bojājumiem izolētas žurku sirds modelī un *in vivo*. Metil-GBB, samazinot L-karnitīna pieejamību, efektīvi samazina acil-karnitīnu koncentrāciju sirdī un mitohondrijos, kavē TS oksidāciju un vienlaicīgi stimulē glikozes oksidāciju sirds audos. Neskatoties uz būtiskām sirds metabolisma izmaiņām, sirds

funkciju traucējumu pazīmes nenovēroja. Dažādas pieejas ir izmantotas, lai daļēji kavētu TS oksidāciju un pārslēgtu enerģijas metabolismu no TS un glikozes oksidāciju (Dyck, 2004; Kantor, 2000; Lopaschuk, 1989). KPT I uzskata par enzīmu, kas nosaka TS transporta ātrumu mitohondrijos, un KPT I ir bieži izmantots mērķis, lai kavētu TS metabolismu (Bentebibel, 2006; Lopaschuk, 1989; Unger, 2005). Papildus tiešai KPT I kavēšanai vai malonilKoA koncentrācijas palielinājumam L-karnitīna koncentrācijas samazināšana sirds audos ir viens no efektīvākajiem veidiem, lai samazinātu KPT I aktivitāti. Ilgu laiku vienīgais netoksiskais savienojums, kas efektīvi samazināja L-karnitīnu koncentrāciju un līdz ar to pasargāja no kardiovaskulārām saslimšanām, bija meldonijs (Dambrova, 2002; Schürch, 2010). Salīdzinājumam jaunsintezētais Metil-GBB ir attiecīgi 10 un 20 reizes spēcīgāks BBOX un OCTN2 inhibitors, un tas ir arī efektīvāks līdzeklis L-karnitīna koncentrācijas samazināšanai audos. Tādējādi Metil-GBB devā, kas ir 20 reizes zemāka par meldonija devu, līdzīgā mērā samazina L-karnitīna koncentrāciju sirds audos.

Kā iepriekš parādīts, meldonija kardioprotektīvais efekts ir atkarīgs no L-karnitīna koncentrācijas samazinājuma sirds audos (Kuka, 2012). Mūsu pētījumā L-karnitīna koncentrācijas samazinājums atkarībā no laika korelēja ar Metil-GBB izraisīto kardioprotektīvo efektu; tomēr novērojām dažas būtiskas atšķirības Metil-GBB un meldonija darbībā. Pēc tikai 7 dienu lietošanas Metil-GBB sasniedza meldonija maksimālo infarkta izmēru samazinošo efektu, bet pēc 14 dienu Metil-GBB lietošanas, infarkta zonas izmērs bija 2 reizes mazāks, salīdzinot ar meldonija grupas sirdīm. Metil-GBB ietekme uz infarkta izmēru samazināšanu apstiprinājās arī *in vivo* miokarda infarkta modelī. Līdzīgi novērotajiem efektiem izolētas sirds modelī, Metil-GBB infarkta izmēru samazinošais efekts *in vivo* bija gandrīz 2 reizes labāks nekā meldonija efekts (Sesti, 2006). Papildus tam Metil-GBB lietošana uzlaboja žurku izdzīvošanu

periodā 24 stundas pēc miokarda infarkta *in vivo*. Kopumā **Metil-GBB ir par meldoniju ievērojami spēcīgāks kardioprotektīvs savienojums.**

Metil-GBB lietošana samazināja L-karnitīna pieejamību un acil-karnitīnu veidošanos un tādā veidā samazināja arī palmitāta oksidāciju izolētos mitohondrijos, peroksisomās un izolētā sirdī. Šīs farmakoloģiskās pieejas galvenā priekšrocība ir tieša garķēžu acil-karnitīnu izraisīto mitohondriju bojājumu samazināšana išēmiskā sirdī. Reperfūzijas laikā pēc Metil-GBB lietošanas TS metabolisms sirdī nebija samazināts. Kamēr aizsardzība no garķēžu acil-karnitīnu uzkrāšanās izraisītā bojājuma ir svarīga išēmijas laikā, kad skābekļa piegāde ir ierobežota, tikmēr TS metabolisma stimulēšana reperfūzijas laikā palīdz atjaunot enerģijas ražošanu sirdī.

Stimulēta glikozes oksidācija išēmijas laikā ir labvēlīga, jo tas samazina protonu veidošanos un ATF ražošanai nepieciešamo skābekļa daudzumu (Ussher, 2012). Mūsu pētījumā novērojām, ka **pēc Metil-GBB lietošanas samazinātais garķēžu acil-karnitīnu daudzums un kavētā TS oksidācija izraisa glikozes metabolisma stimulāciju sirdī.** Iegūtie rezultāti liecina, ka samazināts infarkta izmērs vismaz daļēji saistīts ar būtiski stimulētu glikozes un laktāta oksidāciju.

Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka Metil-GBB lietošana ir kardioprotektīva un uzlabo dzīvnieku izdzīvošanu, kavējot TS oksidāciju un stimulējot glikozes metabolismu.

4. SECINĀJUMI

1. Sirds išēmijas-reperfūzijas bojājums ir mazāks pēc ēšanas, jo šajā stāvoklī ir stimulēta glikozes un laktāta oksidācija un samazināta TS slodze.
2. Garķēžu acil-karnitīnu koncentrācija nosaka mijiedarbību starp glikozes (piruvāta/laktāta) un TS metabolismu sirds mitohondrijos, turklāt garķēžu acil-karnitīnu uzkrāšanās pasliktina glikozes metabolismu.
3. Nātrija pivalāts izraisa izmaiņas L-karnitīna homeostāzē, bet neietekmē sirds funkcionalitāti, lai gan pivalāts vai tā metabolīti tieši bojā mitohondriju enerģijas metabolismu. Tāpēc pivalāts nav piemērots farmakoloģisks līdzeklis, lai samazinātu L-karnitīna un acil-karnitīnu pieejamību.
4. Salīdzinot ar selektīvu BBOX kavēšanu, selektīva OCTN2 kavēšana ir daudz efektīvāks veids, lai samazinātu L-karnitīna daudzumu un sasniegtu kardioprotektīvo efektu.
5. Metil-GBB, kas ir jauns BBOX un OCTN2 inhibitors, samazinot L-karnitīna pieejamību, efektīvi samazina acil-karnitīnu koncentrācijas sirdī un mitohondrijos, kavē taukskābju oksidāciju un vienlaicīgi stimulē glikozes oksidāciju sirds audos. Metil-GBB ir kardioprotektīvs savienojums, kas uzlabo izdzīvošanu pēc miokarda infarkta.

5. DARBA APROBĀCIJA – PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

Promocijas darbs ietver sekojošas publikācijas recenzējamos starptautiskos izdevumos:

1. Kuka J, Makrecka M, Grinberga S, Pugovics O, Liepinsh E, Dambrova M. A short-term high-dose administration of sodium pivalate impairs pyruvate metabolism without affecting cardiac function. *Cardiovascular Toxicology*, **2012**, 12(4):298–303.
2. Liepinsh E, Makrecka M, Kuka J, Makarova E, Vilskersts R, Cirule H, Sevostjanovs E, Grinberga S, Pugovics O, Dambrova M. The heart is better protected against myocardial infarction in the fed state compared to the fasted state. *Metabolism*, **2014**, 63(1):127–136.
3. Makrecka M, Kuka J, Volska K, Antone U, Sevostjanovs E, Cirule H, Grinberga S, Pugovics O, Dambrova M, Liepinsh E. Long-chain acylcarnitine content determines the pattern of energy metabolism in cardiac mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2014**, 395 (1–2):1–10.
4. Tars K, Leitans J, Kazaks A, Zelencova D, Liepinsh E, Kuka J, Makrecka M, Lola D, Andrianovs V, Gustina D, Grinberga S, Liepinsh E, Kalvinsh I, Dambrova M, Loza E, Pugovics O. Targeting Carnitine Biosynthesis: Discovery of New Inhibitors against γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, 57(6):2213–2236.
5. Liepinsh E, Makrecka M, Kuka J, Cirule H, Makarova E, Sevostjanovs E, Grinberga S, Vilskersts R, Lola D, Loza E, Stonans I, Pugovics O, Dambrova M. Selective inhibition of OCTN2 is more effective than inhibition of Gamma-butyrobetaine dioxygenase to decrease the availability of L-carnitine and to reduce myocardial infarct size. *Pharmacological Research*, **2014**, 85:33–38.
6. Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, Kuka J, Vilskersts R, Makarova E, Cirule H, Loza E, Lola D, Grinberga S, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M. Inhibition of L-carnitine biosynthesis and transport by methyl- γ -butyrobetaine decreases fatty acid oxidation and protects against myocardial infarction. *British Journal of Pharmacology*, **2015**, 172(5):1319–1332.

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās starptautiskās konferencēs:

1. Dambrova M, Makrecka M, Kuka J, Vilskersts R, Liepinsh E. Discovery of a novel regulator of cardiac energy metabolism, cardioprotective drug methyl-GBB. *The 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)*, Cape Town, South Africa, July 13–18, **2014**. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115 (Suppl. 1), p.19.
2. Liepinsh E, Makrecka M, Kuka J, Antone U, Dambrova M. The heart is better protected against myocardial infarction in the fed state compared to the fasted state: role of insulin, glucose and fatty acids. *The 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)*, Cape Town, South Africa, July 13–18, **2014**. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115 (Suppl. 1), p.49.
3. Makrecka-Kūka M. Acyl-carnitines as a druggable target in mitochondria. *Balticum Organicum Syntheticum (BOS-2014) pre-conference round table "New Therapeutic Targets: Chemistry and Biology"*, Malpils, Latvia, July 3–4, **2014**.
4. Makrecka M, Kuka J, Volska K, Dambrova M, Liepinsh E. The accumulation of long-chain acyl-carnitines determines the severity of cardiac ischemia-reperfusion injury. *SHVM 2014 Twelfth annual scientific sessions - Strategies for recovering metabolic homeostasis and ventricular function in the diseased heart*, Tromso, Norway, June 24–27, **2014**, Book of Abstracts, p. 43.
5. Kuka J, Makrecka M, Dambrova M, Liepinsh E. Contents of long-chain acyl-carnitines determine the pattern of energy metabolism in the heart. *SHVM 2014 Twelfth annual scientific sessions - Strategies for recovering metabolic homeostasis and ventricular function in the diseased heart*, Tromso, Norway, June 24–27, **2014**, Book of Abstracts, p. 37.
6. Liepinsh E, Makrecka M, Kuka J, Dambrova M. The heart is better protected against myocardial infarction in the fed state. *The 29th Congress of the Federation of the International Danube Symposia on Diabetes mellitus*, Jurmala, Latvia, June 24–28, **2014**. Book of Abstracts, p. 37.
7. Makrecka M, Volska K, Kuka J, Liepinsh E, Dambrova M. The accumulation of long-chain acyl-carnitines is a major cause of mitochondrial damage during ischaemia. *MiP 2013, 9th MiPconference - Comparative Mitochondrial Physiology*, Obergurgl, Austria, September 23–27, **2013**, Book of Abstracts, p.72.
8. Makrecka M, Kuka J, Sevostjanovs E, Liepinsh E, Dambrova M. Activated insulin signalling and reduction in fatty acid load determine the

- protection against myocardial infarction in the fed state. *ESC Basic Science Summer School*, Sophia Antipolis, France, June 16–20, **2013**, Abstract Nr. P33.
9. Kuka J, Makrecka M, Liepinsh E, Dambrova M. The severity of ischemia reperfusion damage is determined by the changes in metabolism pattern of energy substrates in mitochondria. *British Atherosclerosis Society and the British Cardiovascular Society Spring Meeting 2013*, Londona, UK, June 3–4, **2013**, Abstract Nr.258.
 10. Dambrova M, Kuka J, Makrecka M, Liepinsh E. The tissue damage in cardiac ischemia-reperfusion injury is reduced under the fed state cellular energy metabolism. *48th EASD Congress*, Berlin, Germany, October 1–5, **2012**, Abstract Nr.1256, *Diabetologia* (2012) 55: [Suppl1]S1-S538. S509.
 11. Skapare E, Kuka J, Makrecka M, Liepinsh E, Dambrova M. The regulation of energy metabolism in isolated rat heart during ischemia-reperfusion, *HypoxiaNet (COST action TD0901)*, “Sensing Hypoxia in the Cell and the Organism”, Essen, Germany, September 20–23, **2012**, Programme & Abstracts, P. 87.
 12. Makrecka M, Kuka J, Liepinsh E, Dambrova M. Reduced availability of L-carnitine protects cardiac mitochondria against fatty acid-induced stress. *FEBS Workshop & MiP Summer “Mitochondrial Biochemistry, Physiology and Pathology”*, Cambridge, UK, July 7–13, **2012**, Abstracts, P.59.
 13. Kuka J, Makrecka M, Liepinsh E, Dambrova M. The role of glucose and fatty acid metabolism on the outcome of cardiac ischemia-reperfusion injury, *SHVM 2012 Tenth annual scientific sessions - Cardiac metabolism in hypertrophy and failure*, Oxford, June 24–27, **2012**, Programme & Abstracts, P.96.
 14. Kuka J, Makrecka M, Vavers E, Dambrova M. The effect of sodium pivalate on mitochondrial energy metabolism in the rat heart, *International Conference in Pharmacology*, Riga, Latvia, April 20–21, **2012**, Abstract book, P.47.
 15. Makrecka M, Kuka J, Liepinsh E, Dambrova M. The ischemic damage of rat heart in fed and fasted states, *International Conference in Pharmacology*, Riga, Latvia, April 20–21, **2012**, Abstract book, P.51.
 16. Makrecka M, Kuka J, Liepinsh E, Dambrova M. The regulation of mitochondrial energy metabolism by L-carnitine lowering agents in ischemia-reperfusion injury, *The British Society for Cardiovascular*

Research Autumn meeting 2011, London, UK, September 5–6, **2011**, Abstracts, P.20.

17. Makrecka M, Kuka J, Liepinš E, Maurina B, Dambrova M. The effects of L-carnitine lowering agents on mitochondrial energy metabolism, *6th Baltic Sea Region Conference in Medical Sciences*, Riga, Latvia, April 29–May 1, **2011**, Abstract book, P.28.

Par darba rezultātiem ziņots sekojošās vietēja mēroga konferencēs:

1. Makrecka-Kūka M. L-karnitīna sistēmas loma enerģijas metabolisma regulācijā un kardioprotekcijā, *Latvijas Farmaceitu biedrības 20 gadu jubilejas konference*, Rīga, Latvija, 22.novembris, **2014**.
2. Makrecka M, Kūka J, Voļska K, Liepiņš E, Dambrova M. Garķēžu acil-karnitīnu loma enerģijas metabolisma regulācijā un sirds išēmijas-reperfūzijas bojājuma attīstībā, *RSU 2014. gada zinātniskā konference, Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte*, Rīga, Latvija, 10.–11. aprīlis, **2014**, Tēzes, 70.lpp.
3. Voļska K, Makrecka M. Substrātu pieejamības ietekme uz enerģijas metabolismu sirds mitohondrijos, *RSU 63. studentu zinātniskā konference*, Rīga, Latvija, 9. aprīlis, **2014**, Tēzes, 24.lpp.
4. Makrecka M, Kūka J, Vilšķērsts R, Liepiņš E, Dambrova M. Sirds išēmijas-reperfūzijas bojājums pēc ēšanas un tukšā dūšā: pētījumi žurku eksperimentālajos modeļos. *RSU 2013. gada zinātniskā konference, Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte*, Rīga, Latvija, 21.–22. marts, **2013**, Tēzes, 86.lpp
5. Voļska K, Makrecka M. Taukskābju metabolītu bojājošā ietekme uz mitohondriju funkcionalitāti. *RSU 62. studentu zinātniskā konference, Bāzes priekšmetu sekcija*, Rīga, Latvija, 20. marts, **2013**, Tēzes, 67.lpp.
6. Makrecka M, Kūka J, Vāvers E, Liepinš E, Dambrova M. Dažādu enerģijas substrātu pieejamības ietekme uz sirds funkcionālajiem rādītājiem, *RSU 2012. gada zinātniskā konference, Veselības traucējumu radīto funkcionālo ierobežojumu klīniskā epidemioloģija Latvijā*, Rīga, Latvija, 29.–30. marts, **2012**, Tēzes, 324.lpp.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Awad S., Stephens F., Shannon C., Lobo D.N. Perioperative perturbations in carnitine metabolism are attenuated by preoperative carbohydrate treatment: Another mechanism by which preoperative feeding may attenuate development of postoperative insulin resistance // *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 2012; 31(5): 717–720.
2. Bell J.A., Reed M.A., Consitt L.A., et al. Lipid partitioning, incomplete fatty acid oxidation, and insulin signal transduction in primary human muscle cells: effects of severe obesity, fatty acid incubation, and fatty acid translocase/CD36 overexpression // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2010; 95(7): 3400–3410.
3. Bentebibel A., Sebastián D., Herrero L., et al. Novel effect of C75 on carnitine palmitoyltransferase I activity and palmitate oxidation // *Biochemistry*, 2006; 45(14): 4339–4350.
4. Bhat S.L., Abbasi F.A., Blasey C., et al. Beyond fasting plasma glucose: the association between coronary heart disease risk and postprandial glucose, postprandial insulin and insulin resistance in healthy, nondiabetic adults // *Metabolism: clinical and experimental*, 2013; 62(9): 1223–1226.
5. Blachnio-Zabielska A.U., Koutsari C., Jensen M.D. Measuring long-chain acyl-coenzyme A concentrations and enrichment using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring // *Rapid communications in mass spectrometry*, 2011; 25(15): 2223–2230.
6. Broderick T.L., Christos S.C., Wolf B.A., et al. Fatty acid oxidation and cardiac function in the sodium pivalate model of secondary carnitine deficiency // *Metabolism: clinical and experimental*, 1995; 44(4): 499–505.
7. Brooks G.A., Dubouchaud H., Brown M., et al. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999; 96(3): 1129–1134.
8. Campbell S.E., Tandon N.N., Woldegiorgis G., et al. A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: Involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria // *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279: 36235–36241.
9. Dambrova M., Liepinsh E., Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect // *Trends in cardiovascular medicine*, 2002; 12(6): 275–279.
10. Dambrova M., Cirule H., Svalbe B., et al. Effect of inhibiting carnitine biosynthesis on male rat sexual performance // *Physiology & behavior*, 2008; 95(3): 341–347.
11. Degrace P., Demizieux L., Gresti J., et al. Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat // *Molecular and cellular biochemistry*, 2004; 258(1-2): 171–182.
12. Diks J., van Hoorn D.E.C., Nijveldt R.J., et al. Preoperative fasting: an outdated concept? // *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 2005; 29(4): 298–304.
13. Dyck J.R.B., Cheng J.-F., Stanley W.C., et al. Malonyl coenzyme a decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation // *Circulation research*, 2004; 94(9): e78–84.

14. Fillmore N., Mori J., Lopaschuk G.D. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy // *British Journal of Pharmacology*, 2014; 171(8): 2080-2090.
15. Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association // *Circulation*, 2014; 129(3): e28-e292.
16. Grossman A.N., Opie L.H., Beshansky J.R., et al. Glucose-insulin-potassium revived: current status in acute coronary syndromes and the energy-depleted heart // *Circulation*, 2013; 127(9): 1040-1048.
17. Hafstad A.D., Khalid A.M., How O.-J., et al. Glucose and insulin improve cardiac efficiency and postischemic functional recovery in perfused hearts from type 2 diabetic (db/db) mice // *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 2007; 292(5): E1288-1294.
18. Jaswal J.S., Keung W., Wang W., et al. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation--a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart // *Biochimica et biophysica acta*, 2011; 1813(70): 1333-1350.
19. Jaudzems K., Kuka J., Gutsaits A., et al. Inhibition of carnitine acetyltransferase by mildronate, a regulator of energy metabolism // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2009; 24(6): 1269-1275.
20. Kantor P.F., Lucien A., Kozak R. and Lopaschuk G.D. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase // *Circulation research*, 2000; 86(5): 580-588.
21. Kato S., Maeda Y., Nakajima Y., et al. Tissue specificity of pivaloylcarnitine and short-chain acylcarnitine profiles after administration of pivalate-containing antibiotics in rat // *Nagoya Med J*, 2012; 52: 171-183.
22. Koves T.R., Li P., An J., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency // *The Journal of biological chemistry*, 2005; 280(39): 33588-33598.
23. Koves T.R., Ussher J.R., Noland R.C., et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance // *Cell metabolism*, 2008; 7(1): 45-56.
24. Kuka J., Vilskersts R., Cirule H., et al. The Cardioprotective Effect of Mildronate is Diminished After Co-Treatment With L-Carnitine // *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2012; 17(2): 215-222.
25. Lavie C.J., Milani R. V, Ventura H.O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss // *Journal of the American College of Cardiology*, 2009; 53(21): 1925-1932.
26. Liepinsh E., Vilskersts R., Loca D., et al. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction // *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2006; 48(6): 314-319.
27. Liepinsh E., Vilskersts R., Skapare E., et al. Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart // *Life Sciences*, 2008; 83(17-18): 613-619.
28. Liepinsh E., Vilskersts R., Zvejniece L., et al. Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats // *British journal of pharmacology*, 2009; 157(8): 1549-1556.

29. Liepinsh E., Skapare E., Svalbe B., et al. Anti-diabetic effects of mildronate alone or in combination with metformin in obese Zucker rats // *European Journal of Pharmacology*, 2011; 658(2-3): 277–283.
30. Liepinsh E., Skapare E., Kuka J., et al. Activated peroxisomal fatty acid metabolism improves cardiac recovery in ischemia-reperfusion // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2013a; 386(6): 541–550.
31. Liepinsh E., Kuka J., Dambrova M. Troubleshooting digital macro photography for image acquisition and the analysis of biological samples // *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 2013b; 67(2): 98–106.
32. Liu B., Clanachan A.S., Schulz R., Lopaschuk G.D. Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons // *Circulation research*, 1996; 79(5): 940–948.
33. Ljungqvist O. Modulating postoperative insulin resistance by preoperative carbohydrate loading // *Best practice & research. Clinical anaesthesiology*, 2009; 23(4): 401–409.
34. Lopaschuk G.D., Barr R.L. Measurements of fatty acid and carbohydrate metabolism in the isolated working rat heart // *Molecular and cellular biochemistry*, 1997; 172(1-2): 137–147.
35. Lopaschuk G.D., McNeil G.F., McVeigh J.J. Glucose oxidation is stimulated in reperfused ischemic hearts with the carnitine palmitoyltransferase 1 inhibitor, Etomoxir // *Molecular and cellular biochemistry*, 1989; 88(1-2): 175–179.
36. Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D.L., et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease // *Physiological reviews*, 2010; 90(1): 207–258.
37. Luttkhold J., Oosting A., van den Braak C.C.M., et al. Preservation of the gut by preoperative carbohydrate loading improves postoperative food intake // *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 2013; 32(4): 556–561.
38. McGarry J.D., Mills S.E., Long C.S., Foster D.W. Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat // *The Biochemical journal*, 1983; 214(1): 21–28.
39. Mjos O.D. Effect of free fatty acids on myocardial function and oxygen consumption in intact dogs // *The Journal of clinical investigation*, 1971; 50(7): 1386–1389.
40. Moran A.E., Forouzanfar M.H., Roth G., et al. The Global Burden of Ischemic Heart Disease in 1990 and 2010: The Global Burden of Disease 2010 Study // *Circulation*, 2014; 129(14):1493–1501.
41. Muoio D.M., Neuffer P.D. Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle // *Cell metabolism*, 2012; 15(5): 595–605.
42. Nakajima H., Inoue F., Kizaki Z., et al. Carnitine import to isolated hepatocytes and synthesis are accelerated in pivalate-treated rats // *The Journal of nutrition*, 1999; 129(9): 1688–1691.
43. Nichols M., Townsend N., Scarborough P., Rayner M. Cardiovascular disease in Europe: Epidemiological update // *European Heart Journal*, 2013; 34(39): 3028–3034.
44. Nowbar A.N., Howard J.P., Finegold J.A., et al. 2014 Global geographic analysis of mortality from ischaemic heart disease by country, age and income: Statistics from World Health Organisation and United Nations // *International Journal of Cardiology*, 2014; 174(2): 293–298.

45. Pochini L., Scalise M., Galluccio M., Indiveri C. OCTN cation transporters in health and disease: role as drug targets and assay development // *Journal of biomolecular screening*, 2013; 18(8): 851–867.
46. Randle P.J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: The glucose fatty acid cycle after 35 years // *Diabetes/Metabolism Reviews*, 1998; 14(4):263–283.
47. Ruff L.J., Brass E.P. Metabolic effects of pivalate in isolated rat hepatocytes // *Toxicology and applied pharmacology*, 1991; 110(2): 295–302.
48. Schroeder M.A., Atherton H.J., Dodd M.S., et al. The cycling of acetyl-coenzyme A through acetylcarnitine buffers cardiac substrate supply: a hyperpolarized ¹³C magnetic resonance study // *Circulation. Cardiovascular imaging*, 2012; 5(2): 201–209.
49. Schürch R., Todesco L., Novakova K., et al. The plasma carnitine concentration regulates renal OCTN2 expression and carnitine transport in rats // *European journal of pharmacology*, 2010; 635(1-3): 171–176.
50. Sesti C., Simkhovich B.Z., Kalvinsh I., Kloner R.A. Mildronate, a novel fatty acid oxidation inhibitor and antianginal agent, reduces myocardial infarct size without affecting hemodynamics // *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2006; 47(3): 493–499.
51. Sievers J., Lindh J., Johansson B.W., Karnell J. Acute myocardial infarction treated by glucose-insulin-potassium (GIK) infusion // *Cardiologia*, 1966; 49(4): 239–247.
52. Simonsen S., Kjekshus J.K. The effect of free fatty acids on myocardial oxygen consumption during atrial pacing and catecholamine infusion in man // *Circulation*, 1978; 58(3 Pt 1): 484–491.
53. Stanley W.C., Recchia F.A., Lopaschuk G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart // *Physiological reviews*, 2005; 85(3): 1093–1129.
54. Tars K., Rumnieks J., Zeltins A., et al. Crystal structure of human gamma-butyrobetaine hydroxylase // *Biochemical and biophysical research communications*, 2010; 398(4): 634–639.
55. Tars K., Leitans J., Kazaks A., et al. Targeting carnitine biosynthesis: discovery of new inhibitors against γ -butyrobetaine hydroxylase // *Journal of medicinal chemistry*, 2014; 57(6): 2213–2236.
56. Tominaga H., Katoh H., Odagiri K., et al. Different effects of palmitoyl-L-carnitine and palmitoyl-CoA on mitochondrial function in rat ventricular myocytes // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2008; 295(1): H105–H112.
57. Unger S.A., Kennedy J.A., McFadden-Lewis K., et al. Dissociation between metabolic and efficiency effects of perhexiline in normoxic rat myocardium // *Journal of cardiovascular pharmacology*, 2005; 46(6): 849–855.
58. Ussher J.R., Lopaschuk G.D. Targeting malonyl CoA inhibition of mitochondrial fatty acid uptake as an approach to treat cardiac ischemia/reperfusion // *Basic research in cardiology*, 2009; 104(2): 203–210.
59. Ussher J.R., Wang W., Gandhi M., et al. Stimulation of glucose oxidation protects against acute myocardial infarction and reperfusion injury // *Cardiovascular Research*, 2012; 94(2): 359–369.
60. Van den Brom C.E., Bulte C.S., Loer S.A., et al. Diabetes, perioperative ischaemia and volatile anaesthetics: consequences of derangements in myocardial substrate metabolism // *Cardiovascular diabetology*, 2013; 12: 42.

61. Van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Middelaar-Voskuilen M.C., et al. Preoperative feeding preserves heart function and decreases oxidative injury in rats // *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 2005; 21(7-8): 859–866.
62. Wang W., Lopaschuk G.D. Metabolic therapy for the treatment of ischemic heart disease: reality and expectations. // *Expert review of cardiovascular therapy*, 2007; 5(6): 1123–1134.
63. Yoshida Y., Holloway G.P., Ljubicic V., et al. Negligible direct lactate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria obtained from red and white rat skeletal muscle // *The Journal of physiology*, 2007; 582(Pt 3): 1317–1335.
64. Zammit V.A., Ramsay R.R., Bonomini M., Arduini A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. // *Advanced drug delivery reviews*, 2009; 61(14): 1353–1362.
65. Zhao G., Jeong N.H., Burgess S.C., et al. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy // *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2008; 294(2): H936–H943.
66. Zhao Y.-T., Weng C.-L., Chen M.-L., et al. Comparison of glucose-insulin-potassium and insulin-glucose as adjunctive therapy in acute myocardial infarction: a contemporary meta-analysis of randomised controlled trials // *Heart* (British Cardiac Society), 2010; 96(20): 1622–1626.