



Elīna Škapare

**OGĻHIDRĀTU VIELMAIŅAS
PATOĻOĢIJU MOLEKULĀRIE
MEHĀNISMI:
PĒTĪJUMI EKSPERIMENTĀLAJOS MODEĻOS
UN KLĪNISKAJĀ MATERIĀLĀ**

Promocijas darbs
farmācijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai
Specialitāte – farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2013

1053071



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Elīna Škapare

OGĻHIDRĀTU VIELMAIŅAS
PATOĻOĢIJU MOLEKULĀRIE
MEHĀNISMI:
PĒTĪJUMI EKSPERIMENTĀLAJOS MODEĻOS
UN KLĪNISKAJĀ MATERIĀLĀ

Promocijas darbs

farmācijas doktora grāda iegūšanai

Specialitāte – farmaceutiskā farmakoloģija

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. pharm., asoc. prof. Maija Dambrova

Dr. chem. Renāte Medne



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



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

Rīga, 2013

0221007691

ANOTĀCIJA

Mūsdienās cukura diabēta (CD) terapijas mērķis ir ne tikai kontrolēt glikozes koncentrāciju asinīs, bet arī aizkavēt CD vēlīno komplikāciju attīstību, tādējādi uzlabojot pacientu dzīves kvalitātes rādītājus. Līdz ar to nozīmīgi ir vēlīno komplikāciju molekulāro mehānismu pētījumi, tostarp glioksalāžu enzīmu sistēmas izpēte. Ņemot vērā to, ka ogļhidrātu vielmaiņas patoloģijas ir saistītas ar izmainītu enerģijas metabolismu, glikozes un taukskābju vielmaiņas optimizēšana varētu uzlabot slimības un ar to saistīto komplikāciju ārstēšanas iespējas. Promocijas darba mērķis bija izpētīt jaunus enerģijas metabolisma molekulāros mehānismus, to regulēšanas iespējas un marķierus ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā.

Promocijas darba ietvaros pirmo reizi parādīta zemākas asins glioksalāzes 1 (Glo1) aktivitātes saistība ar sāpīgas perifērās diabētiskās neiropatijas attīstību 1. un 2. tipa CD pacientiem, kas apliecina samazinātas Glo1 aktivitātes nozīmi sāpīgas diabētiskās neiropatijas attīstībā. Zemāka Glo1 aktivitāte nervaudos saistīta ar augstāku glikozes un triglicerīdu koncentrāciju, kā arī traucētu endotēlija funkcionalitāti eksperimentālajā 2. tipa diabēta modelī. Pētījuma rezultāti liecina, ka Glo1 aktivitāte asinīs nav izmainīta, attīstoties agrīniem vaskulāriem bojājumiem, tomēr Glo1 aktivitātes mērījumi varētu būt noderīgi vēlīno komplikāciju attīstības pētījumiem CD vēlīnās stadijās.

Darba ietvaros parādīti jauni mildronāta molekulārie darbības mehānismi un apstiprināta hipotēze, ka, samazinot L-karnitīna biopieejamību, iespējams uzlabot enerģijas metabolisma procesus traucētas ogļhidrātu vielmaiņas gadījumā. Mildronāta izraisītais L-karnitīna samazinājums aktivē peroksisomu proliferāciju aktivējošā receptora (PPAR) α /PPAR γ koaktivatora 1 α (PGC1 α) signālceļu un taukskābju plūsmas pārvirzīšanu, pasargājot mitohondrijus no garķēžu taukskābju uzkrāšanās. Pētījuma rezultāti apliecina, ka CD pacientiem ar samazinātu L-karnitīna koncentrāciju asinīs ir mazāk CD vēlīno komplikāciju, tāpēc L-karnitīna biopieejamības samazināšana varētu būt noderīga vēlīno komplikāciju attīstības aizkavēšanai.

ANNOTATION

Modern therapy of diabetes mellitus (DM) aims both to control blood glucose levels and also to prevent late complications, thus improving the patients' quality of life. Consequently, the molecular mechanisms of late complications, including glyoxalase enzyme system, are intensively studied. Given the fact that the carbohydrate metabolism disorders are associated with impaired energy metabolism, the optimization of glucose and fatty acid metabolism could improve the treatment of the disease as well as associated complications. The aim of the thesis was to discover novel molecular markers and possibilities for the regulation of the molecular mechanisms underlying energy metabolism pathways.

This study is the first to associate a lower blood glyoxalase 1 (Glo1) activity with development of the painful peripheral diabetic neuropathy in type 1 and 2 diabetes mellitus patients thus providing the experimental evidence for the role of altered Glo1 activity in the development of painful diabetic neuropathy. Lower Glo1 activity in the neuronal tissues was associated with higher blood glucose and triglyceride concentrations, as well as impaired endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in aortic rings in the experimental model of type 2 diabetes. Obtained results show that blood Glo1 activity could not be used as an early marker of the development of vascular complications, but nevertheless the measurements of blood Glo1 activity might be a useful approach to study the development of late complications of DM.

Novel insights into molecular mechanisms of action of mildronate have been provided in the thesis. Thus, the mildronate-induced reduction in bioavailability of L-carnitine improves adaption to hyperglycemia- and hyperlipidemia-induced metabolic disturbances. These processes include activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α /PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α) signaling pathways and redirection of fatty acid metabolism, which protects the mitochondria against long-chain fatty acid overload. The results of the study provide evidence that the reduction of L-carnitine bioavailability could be useful approach to delay the development of late complications of DM.

SATURA RĀDĪTĀJS

Darbā lietotie saīsinājumi	6
Ievads	8
Darba mērķis.....	9
Darba uzdevumi.....	9
Darba hipotēzes.....	10
Darba zinātniskā novitāte.....	10
1. Literatūras apskats	11
1.1. Cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības mehānismi	11
1.1.1. Dziļās glikēšanās galaproduktu (AGE) veidošanās	12
1.1.2. AGE atkarīgie molekulārie mehānismi.....	17
1.1.3. Glioksalāžu enzīmu aizsargsistēmas loma.....	20
1.1.4. Ogļhidrātu enerģijas metabolisma patoloģiski traucējumi	24
1.2. Cukura diabēta mikro- un makrovaskulāro komplikāciju pētīšanas iespējas	25
1.2.1. Ģenētiski noteikti metabolā sindroma un 2. tipa cukura diabēta eksperimentālie modeļi	26
1.2.2. Eksperimentāli izraisīta dislipidēmija un insulīna rezistence	27
1.3. Cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības aizkavēšana	27
1.3.1. Glikēšanās un AGE veidošanās procesu kavēšana	28
1.3.2. Lipīdu un ogļhidrātu metabolisma līdzsvara farmakoloģiska atjaunošana..	30
2. Materiāli un Metodes	34
2.1. Klīniskā pētījuma dalībnieki	34
2.2. Dzīvnieki.....	35
2.3. Materiāli.....	36
2.4. Metodes.....	37
2.4.1. Bioķīmisko parametru mērījumi eksperimentālajos paraugos.....	37
2.4.2. Bioķīmisko parametru mērījumi klīniskajos paraugos	37
2.4.1. Leikocītu izolēšana ar eritrocītu lizēšanas metodi	38
2.4.2. Plūsmas citometrijas analīze	38
2.4.3. Asins lizātu sagatavošana glioksalāžu aktivitātes noteikšanai	39
2.4.4. Glioksalāzes 1 aktivitātes noteikšana asins paraugos	39
2.4.5. Glioksalāzes 2 aktivitātes noteikšana asins paraugos	40
2.4.6. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes noteikšana audu homogenātos.....	40
2.4.7. Izolētas žurkas sirds infarkti	40
2.4.8. Taukskābju oksidācija izolētā žurku sirdī.....	41
2.4.9. Peroksisomālo taukskābju oksidācija	42
2.4.10. Mitohondriju un sirds muskuļa šķiedru skābekļa patēriņa mērījumi.....	42
2.4.11. Citosola un kodolu ekstraktu imunoblota analīze.....	43
2.4.12. Taukskābju daudzuma noteikšana ar GHMS metodi	44
2.4.13. mRNS izolēšana un kvantitatīva RT-PKĀR analīze	44
2.4.14. Diabēta pacientu vēlīno komplikāciju novērtēšana	45
2.4.15. Eksperimentālo diabēta dzīvnieku vēlīno komplikāciju novērtēšana.....	46
2.5. Datu statistiskā apstrāde.....	47
3. Rezultāti	48
3.1. Glioksalāžu aizsargsistēmas nozīme diabēta vēlīno komplikāciju attīstībā	48
3.1.1. Glioksalāzes enzīmu sistēmas mērīšanas metožu izstrāde	48
3.1.2. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar sāpīgu neiropatijas attīstību	51
3.1.3. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes un ekspresijas izmaiņas eksperimentālajos dzīvnieku modeļos	56

3.2. Enerģijas metabolismu ietekmējošu savienojumu un to kombināciju lietošanas efektivitāte ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā	65
3.2.1. Mildronāta un tā kombinācijas ar metformīnu ievadīšanas ietekme aptaukošanās un metabolā sindroma modelī	65
3.2.2. Mildronāta ievadīšanas ietekme hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī.....	76
3.2.3. Mildronāta kardioprotektīvā efekta molekulāro mehānismu izpēte	82
3.2.4. Asins L-karnitīna koncentrācijas saistība ar cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības pakāpi 1. un 2. tipa CD pacientiem	90
4. Diskusija	96
4.1. Glioksalāžu aktivitātes noteikšanas metožu un uzglabāšanas apstākļu standartizēšana	96
4.2. Glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņas diabēta gadījumā	98
4.3. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar vēlīno komplikāciju attīstību	100
4.4. Enerģijas metabolisma regulācija eksperimentālajos ogļhidrātu un lipīdu vielmaiņas patoloģiju modeļos.....	104
4.5. Mildronāta molekulārie darbības mehānismi	109
4.6. L-karnitīna koncentrācijas saistība ar cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības pakāpi CD pacientos	112
5. Secinājumi	116
6. Publikācijas un ziņojumi par pētījuma tēmu.....	117
7. Pateicības	120
8. Izmantotā literatūra	121
9. Pielikumi.....	136

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

- 3-DG-H1 - 3-dezoksiglikozon-imidazolons
ABL-holesterīns - augsta blīvuma holesterīns
ACSL - garķēžu acil-koenzīmu A sintetāze
ACOX - acil-koenzīma-A oksidāze 1
ADA - Amerikas Diabēta asociācija
AGE - dziļās glikēšanās galaprodukti
AMF - adenoziņa monofosfāts
AMPK - adenoziņa monofosfāta kināze
ATF - adenoziņa trifosfāts
BSA - vērša seruma albumīns
CD - cukura diabēts
CML - Nε-(1-karboksimetil)lizīns
CoA - koenzīms A
CRP - C-reaktīvais proteīns
DNS - dezoksiribonukleīnskābe
DPP-4 - dipeptidil peptidāze-4
DTT - ditiotreitols
EASD - Eiropas Diabēta pētniecības asociācija
EDTA - etilēndiamīna tetraetiķskābe
EGTA – etilēnglikola tetraetiķskābe
EI - ekspresijas indekss
FAT/CD36 - taukskābju translokāze
FA - brīvās taukskābes
FADH₂ - reducētais flavīna-adenīna dinukleotīds
FABP - taukskābes saistošais proteīns
FATP - transmembrānas taukskābju transportproteīns
FE - fikoeritrīns
GADPH - gliceraldehīd-3-fosfātdehidrogenāze
GFĀ - glomerulu filtrācijas ātrums
GHMS - gāzu hromatogrāfijas masspektrometrija
GLUT - glikozes transportproteīns
Glo1 - glioksalāze 1 (EC 4.4.1.5, laktoilglutaciona liāze)
Glo2 - glioksalāze 2 (EC 3.1.2.6, hidroksiacilglutaciona hidrolāze)
GLO^{+/-} - peles, kam ar ģenētisku manipulāciju palīdzību deaktivizēts GLO gēns
(abreviatūra no angļu val., *knockout*)
GLP-1 - glikagonam līdzīgais peptīds-1
GSH - reducētais glutations

HbA1c - glikētais hemoglobīns
HK II - heksokināze II
hs-CRP - augstas jutības C-reaktīvais proteīns
InsR - insulīna receptors
kDNS - komplementārā dezoksiribonukleīnskābe
 K_m - Mihaelisa-Mentenā konstante
KMI - ķermeņa masas indekss
KPT - karnitīna palmitoiltransferāze
LPL - lipoproteīnu lipāze
LOX1 - lektīnam-līdzīgais oksidētu zema blīvuma lipoproteīnu (ZBL) receptors 1
MFI - fluorescences intensitāte
MG-H1 - no metilglioksāla atvasināts hidroimidazolons
mRNS - matricē jeb informācijas ribonukleīnskābe
 NAD^+ - oksidētais nikotīnamīda-adenīna dinukleotīds
 $NADH^+$ - reducētais nikotīnamīda-adenīna dinukleotīds
NDS - neiropātijas deficīta skala
NF- κ B - kodola faktors κ B
NO - slāpekļa oksīds
NSS - neiropātijas simptomu skala
OKTN - organisko katjonu/karnitīna transportproteīns
P-AMPK - fosforilēta adenoīna monofosfāta kināze
PARP - poli(ADF-ribozes) polimerāze
PBS - fosfātu buferšķīdums
PDH - piruvātdehidrogenāzes komplekss
PDK - piruvātdehidrogenāzes kināze
PI3K - fosfatidilinozitol 3-kināze
PEX - peroksisomālo membrānu proteīni
PGC1 α - PPAR γ koaktivators 1 alfa
PKC - proteīnkināze C
PMSF - fenilmetilsulfonilfluorīds
PPAR - peroksisomu proliferāciju aktivējošie receptori
RAGE - dziļās glikēšanās galaproduktu receptors
RT-PK α - reālā laika reversās transkripcijas polimerāzes ķēdes reakcija
SDS – nātrija dodecilsulfāts
SEM - vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda
SUS - nesāpīgs strāvas uztveres sliksnis
TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletildiamīns
ZBL-holesterīns - zema blīvuma holesterīns

IEVADS

Mūsdienās cukura diabēta (CD) terapijas mērķis ir ne tikai kontrolēt glikozes koncentrāciju asinīs, bet arī aizkavēt CD vēlīno komplikāciju attīstību. Epidemioloģiskajos pētījumos parādīts, ka CD vēlīno komplikāciju attīstību galvenokārt nosaka hiperglikēmijas pakāpe un ilgums, tomēr tajā pašā laikā arī pacientiem ar normāliem vai nedaudz paaugstinātiem glikozes metabolismu raksturojošiem rādītājiem attīstās smagas komplikācijas. Turklāt klīnisko pētījumu dati liecina, ka tikai glikozes vai glikētā hemoglobīna koncentrācijas normalizēšana diabēta pacientiem pilnībā nenovērš vēlīno komplikāciju simptomus. Precīzāku molekulāro mehānismu noskaidrošana un jaunu marķieru pētījumi ļautu prognozēt vēlīno komplikāciju attīstības risku diabēta, kā arī prediabēta gadījumā. Aizkavējot vēlīno komplikāciju attīstību CD pacientiem, būtu iespējams samazināt ārstēšanās izmaksas un uzlabot pacientu dzīves kvalitāti. Veidojot efektīvākas stratēģijas vēlīno komplikāciju aizkavēšanai, ir nepieciešams zināt, kādi molekulārie mehānismi paātrina vai kavē to attīstību.

Hroniska hiperglikēmija CD pacientiem var izraisīt neatgriezenisku neenzimātisku glikozes saistīšanos ar proteīniem. Šīs saistīšanās rezultātā veidojas ķīmiski ļoti stabili savienojumi - dziļās glikēšanās galaprodukti (AGE) (Peppas, 2005). AGE veidošanās izmaina proteīnu funkcionālo aktivitāti un izraisa šūnu un audu bojājumus, kas veicina CD vēlīno komplikāciju attīstību, tādējādi neenzimātiskā glikēšanās un AGE uzkrāšanās ir viens no CD vēlīno komplikāciju patoģenēzes mehānismiem. Glioksalāžu sistēmas enzīmi, glioksalāze 1 (Glo1) un glioksalāze 2 (Glo2), veido šūnas enzimatisko aizsardzības sistēmu pret neenzimātisku glikēšanos, pārvēršot ļoti reaģētspējīgos glikozes metabolītus netoksiskās molekulās, kas iesaistās šūnas normālajās metabolisma reakcijās un neveido AGE (Rabbani, 2011). Samazinot AGE veidošanos, glioksalāžu sistēma var kavēt arī CD vēlīno komplikāciju attīstību, tomēr līdzšinējos pētījumos pārlicinoši pierādījumi tam nav atrasti, tāpēc joprojām aktuāli ir pētījumi par glioksalāžu enzīmu lomu CD vēlīno komplikāciju patoģenēzē.

Ogļhidrātu vielmaiņas patoloģijas ir saistītas arī ar izmaiņām enerģijas metabolismā, kā rezultātā palielinās taukskābju un samazinās glikozes oksidācija kopējā šūnas izdzīvošanai nepieciešamajā enerģijas plūsmā. Proporcionāla tauku un ogļhidrātu metabolisma līmeņa uzturēšana sirds audos un organismā kopumā ir nozīmīgs mūsdienu biomedicīnas jautājums, jo traucējumi enerģijas metabolismā veicina tādu saslimšanu masveidīgu izplatību kā cukura diabēts, sirds mazspēja, ateroskleroze un ar tām saistīto

dzīves kvalitātes zudumu (Carvajal, 2003, Kamalesh, 2007, Larsen, 2008). Latvijā labi pazīstamajam kardioprotektīvajam savienojumam mildronātam pēdējo gadu laikā atklāta glikozes metabolismu veicinoša aktivitāte (Liepinsh, 2006, Liepinsh, 2008), kas tiek skaidrota ar mildronāta L-karnitīna biosintēzi kavējošo darbību (Simkhovich, 1988). L-karnitīns ir nepieciešams kofaktors taukskābju metabolismā, kur tas piedalās garķēžu taukskābju transportēšanā cauri mitohondrija membrānai, tādējādi veicinot to oksidāciju (Rebouche, 1992). Mildronāts samazina karnitīna koncentrāciju organismā, kā rezultātā izpaužas tā kardioprotektīvā un glikozes metabolismu regulējošā aktivitāte (Dambrova, 2002). Tomēr detalizēti šie procesi līdz šim nav izpētīti, un nepieciešams noskaidrot, vai mildronāta lietošana varētu uzlabot rādītājus ogļhidrātu vielmaiņas patoloģijas gadījumā, saglabājot kardioprotektīvo efektu. Turklāt nepieciešams arī noskaidrot iespējamās mildronāta molekulārās darbības mehānismus sirds audos.

Izmantojot L-karnitīna signālceļu modulēšanu ar mildronāta palīdzību, kā arī klīnisko paraugu analīzi, darba ietvaros pētīti jauni CD vēlino komplikāciju molekulārie marķieri un iespējamo terapiju darbības mehānismi. Molekulāro mehānismu padziļināta izpratne ne tikai var likt pamatus jaunu zāļu meklējumiem, bet arī palīdzēt atrast jaunas metodes esošo terapiju efektivitātes novērtēšanai.

Promocijas darba eksperimentālā daļa veikta Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā.

DARBA MĒRĶIS

Pētīt jaunus enerģijas metabolisma molekulāros mehānismus, to regulēšanas iespējas un marķierus ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā.

DARBA UZDEVUMI

1. Pētīt Glo1 kā bioķīmiskā marķiera saistību ar sāpīgas perifērās diabētiskās neiropatijas attīstību 1. un 2. tipa CD pacientu asins paraugos.
2. Pētīt Glo1 un Glo2 enzīmus kā bioķīmiskos marķierus eksperimentālajos laboratorijas dzīvnieku diabēta modeļos.
3. Pētīt enerģijas metabolisma modulatora, mildronāta, kardioprotektīvā efekta molekulāros mehānismus sirds audos.

4. Pētīt samazinātas asins L-karnitīna koncentrācijas saistību ar diabēta vēlīno komplikāciju attīstību un smaguma pakāpi.

DARBA HIPOTĒZES

1. Glo1 aktivitāte ir izmantojama agrīnu CD vēlīno komplikāciju un diabētiskās neiropātijas fenotipa noteikšanai.
2. Samazinātai L-karnitīna biopieejamībai ir kardioprotektīvs efekts ogļhidrātu metabolisma patoloģiju gadījumā.

DARBA ZINĀTNISKĀ NOVITĀTE

Darba ietvaros pirmo reizi parādīta zemākas asins Glo1 aktivitātes saistība ar sāpīgas perifērās diabētiskās neiropātijas attīstību 1. un 2. tipa CD pacientiem, līdz ar to apstiprinot izvirzīto hipotēzi par Glo1 kā molekulāro marķieri diabēta vēlīno komplikāciju pētījumos. Eksperimentāli parādīti jauni mildronāta molekulārie darbības mehānismi un apstiprināta hipotēze, ka, samazinot L-karnitīna biopieejamību, iespējams uzlabot enerģijas metabolisma procesus traucētas ogļhidrātu vielmaiņas gadījumā. Mildronāta izraisītais L-karnitīna samazinājums aktivē PPAR α /PGC1 α signālceļu un pārvirza taukskābju plūsmu, pasargājot mitohondrijus no garķēžu taukskābju uzkrāšanās išēmijas apstākļos un ogļhidrātu metabolisma patoloģiju gadījumā.

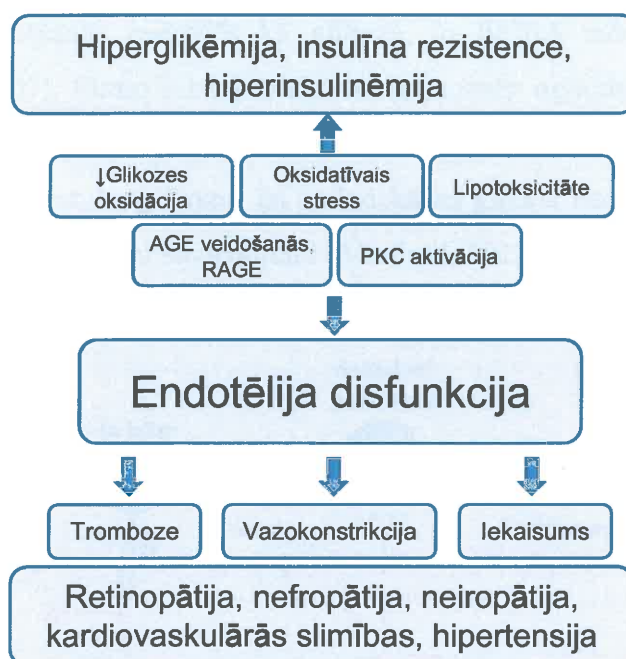
1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības mehānismi

Cukura diabēts (CD) ir apkārtējās vides un ģenētisku faktoru noteikta hroniska, metaboliska saslimšana, kas raksturojas ar paaugstinātu glikozes koncentrāciju asinīs insulīna deficīta vai rezistences dēļ. Pirmā tipa CD gadījumā pacientiem insulīna produkcija nenotiek autoimūnas aizkuņģa dziedzera beta (β) šūnu destrūkcijas rezultātā, savukārt 2. tipa CD raksturīga aptaukošanās un insulīna rezistences attīstība. Pasaules Veselības organizācijas dati liecina, ka mūsdienās pasaulē ar CD slimo vairāk nekā 300 miljoni cilvēku, turklāt 90-95% gadījumos no kopējā skaita - ar 2. tipa CD. Nozīmīgi, ka 35% no pieaugušo populācijas ir diagnosticēts prediabēts jeb metabolais sindroms, kas raksturojas ar abdominālu aptaukošanos, mēreni paaugstinātu glikozes koncentrāciju asinīs, insulīna rezistenci un paaugstinātu asinsspiedienu, taču neatbilst visiem CD klasifikācijas kritērijiem (Centers for Disease Control and Prevention, 2011). Pirmā tipa CD ir tikai 5-10% no kopējā cukura diabēta slimnieku skaita, tomēr jaunu gadījumu skaits katru gadu palielinās vidēji par 3% (Onkamo, 1999). Lai gan atšķiras slimības etioloģija, klīniskie simptomi un sastopamības biežums, gan 1. tipa, gan 2. tipa CD gadījumā raksturīga vēlīno komplikāciju attīstība. Bez mikrovaskulārajām komplikācijām, kas klīniski izpaužas kā nefropātija, retinopātija vai neiropātija (Marshall, 2006), CD pacientiem bieži sastopamas arī makrovaskulārās komplikācijas – ateroskleroze, kardiovaskulārās un cerebrovaskulārās slimības.

CD komplikāciju patoģenēzes pamatā ir ogļhidrātu metabolisma izmaiņu un oksidatīvā stresa izraisīta endotēlija disfunkcija (Potenza, 2009, 1.1. attēls). Ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā pārmērīgu mitohondriālā superoksīda anjona veidošanos mazo asinsvadu endotēlija šūnās sekmē ilgstoša iekšēju hiperglikēmija, savukārt lielo asinsvadu endotēlija šūnās un sirds muskuļaudos - insulīna rezistences izraisīta pastiprināta taukskābju oksidācija (Giacco, 2010). Pastiprinātā superoksīda anjonu veidošanās aktivē 5 galvenos komplikāciju patoģenēzē iesaistītos vielmaiņas ceļus: poliolu vielmaiņas ceļa aktivāciju, proteīnkināzes C (PKC) aktivāciju, heksozamīnu vielmaiņas ceļa aktivāciju, dziļās glikēšanās galaproduktu (angl. val. *Advanced Glycation Endproducts* – AGE) daudzuma palielināšanos un uzkrāšanos, kā arī AGE receptoru (RAGE) ekspresijas un to aktivējošo ligandu daudzuma palielināšanās. Pēdējo gadu pētījumos tiek uzskatīts, ka visus vielmaiņas signālceļus

apvieno viens komplikāciju attīstības mehānisms - pastiprināta reaktīvo skābekļa savienojumu veidošanās mitohondrijos (Brownlee, 2005).



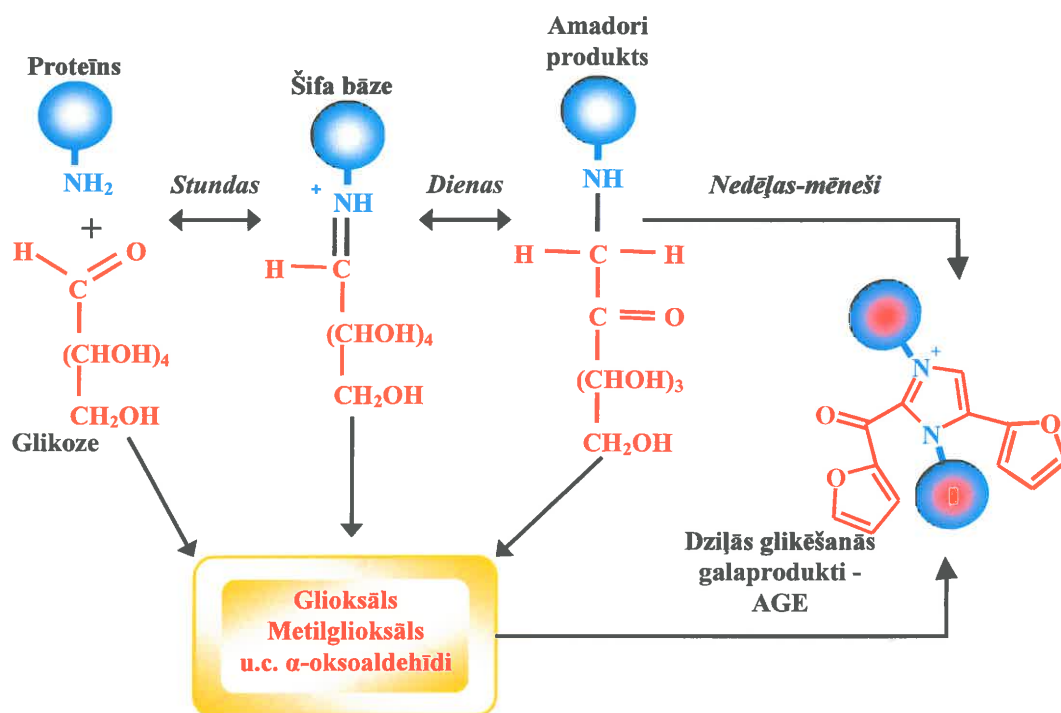
1.1. att. Cukura diabēta mikro- un makrovaskulāro komplikāciju attīstības mehānismi (adaptēts pēc Potenza, 2009)

Diabēta vēlīno komplikāciju attīstību var sekmēt arī ar cukura diabētu saistīts hronisks iekaisuma process, izraisot vaskulāro un β šūnu darbības traucējumus 1. tipa CD un insulīna rezistenci – 2. tipa CD gadījumā (Villeneuve, 2010). Insulīna rezistence raksturojas ar paaugstinātu brīvo taukskābju koncentrāciju, kas kopā ar hiperinsulinēmiju veicina dislipidēmijas attīstību (Mooradian, 2009). Tā rezultātā, hiperglikēmija un dislipidēmija var veicināt iekaisuma un citu patoloģisku gēnu un proteīnu ekspresijas izmaiņas, sekmējot mikro- un makrovaskulāro komplikāciju attīstību (King, 2008).

1.1.1. Dzīlās glikēšanās galaproduktu (AGE) veidošanās

Neenzimātiska glikēšanās ir ogļhidrātu molekulu (biežāk glikozes vai fruktozes, galaktozes, mannozes, ribozes) vai to ļoti reaģētspējīgo metabolītu (glioksāla, metilglioksāla un 3-dezoksiglikozona) neenzimātiska saistīšanās pie brīvo aminogrupu atlikumiem aminoskābju, proteīnu, nukleīnskābju un fosfolipīdu molekulās (Miyazawa, 2012, Thornalley, 2008). Fizioloģiskos apstākļos 99% glikozes cilvēka organismā

atrodama cikliskā formā, kas glikēšanās reakcijās neiesaistās, tomēr, ja glikozes koncentrācija asinīs ir pietiekami augsta un tā pāriet lineārā struktūrā, strauji palielinās varbūtība, ka šādas reakcijas notiks. Fruktoze ir reaģētspējīgāka un ātrāk iesaistās neenzimātiskās glikēšanās reakcijās kā glikoze, jo lielākā mērā atrodama lineārā struktūrā (Nass, 2007). Pirmo reizi ķīmisko reakciju starp ogļhidrātiem un proteīniem 20. gadsimta sākumā aprakstīja franču zinātnieks L.C. Majjārs (franču val. *L.C.Maillard*), novērojot, ka glikozes un aminoskābes glicīna neenzimātiskās reakcijas rezultātā veidojas dzeltenbrūni savienojumi (Maillard, 1912). Neenzimātiskā glikēšanās notiek vairākos posmos (1.2. attēls).

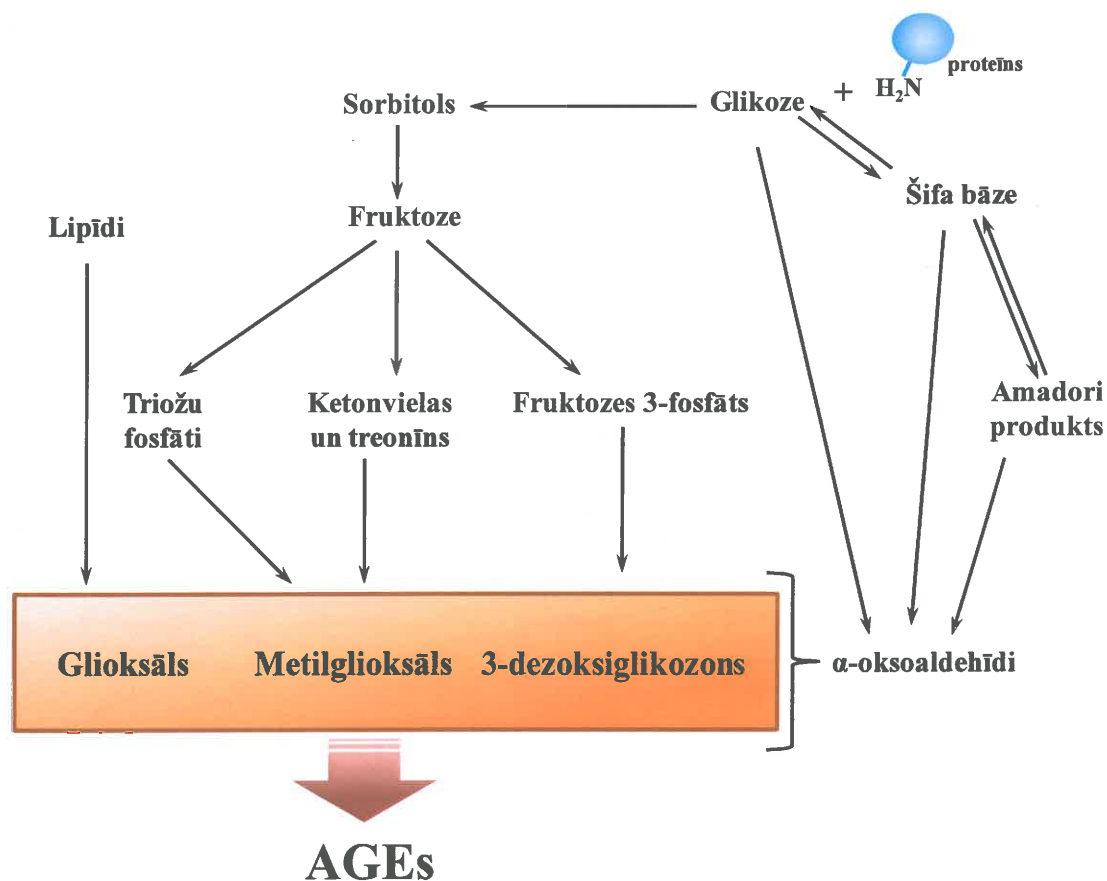


1.2. att. Majjāra reakcijas jeb neenzimātiskās glikēšanās shēma

Pirmajā glikēšanās posmā notiek reakcija starp glikozes aldehīdgrupu un proteīna brīvo aminogrupu, kuras rezultātā dažu stundu laikā veidojas ķīmiski nestabili agrīnas glikēšanās produkti - Šifa bāzes (Ulrich, 2001). Dažu dienu laikā Šifa bāzu struktūrās notiek lēna saišu pārgrupēšanās un veidojas daudz stabilāki savienojumi, Amadori produkti jeb glikozamīni (Nass, 2007). Lai gan atgriezeniska reakcija ir iespējama, tai ir zemāks enerģētiskais līmenis, tādēļ Amadori produkti uzkrājas organismā (Stitt, 2001, Ulrich, 2001). Glikētais hemoglobīns (HbA1c) ir visvairāk pētītais un pazīstamākais Amadori produkts un tā veidošanās ātrums un daudzums asinīs ir atkarīgs no hiperglikēmijas pakāpes un ilguma (ADA, 2009, Koenig, 1976). Ja Amadori produktu veidošanā ir iesaistīti stabili proteīni (piemēram, kolagēns), un

savienojumi organismā atrodas vairākus mēnešus vai pat gadus, tie var lēni dehidratēties un pārgrupēties. Mainoties molekulas konformācijai, atbrīvojas sulfhidrilgrupas un izveidojas disulfīdsaites, kas veicina proteīnu agregāciju un ķīmiski ļoti stabilu proteīnu struktūru – AGE veidošanos. AGE veidojas ne tikai glikozei saistoties ar proteīniem, bet arī no reaģētspējīgiem metabolītiem: glioksāla, metilglioksāla un citiem α -oksoaldehīdiem (Degenhardt, 1998, Thornalley, 1999). Neenzimātiska glikēšanās un pastiprināta AGE veidošanās ir iesaistītas novecošanās procesa, neiroloģisko saslimšanu un cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstībā. Zināmas vairākas reaģētspējīgo metabolītu veidošanās iespējas (Singh, 2001, 1.3. attēls):

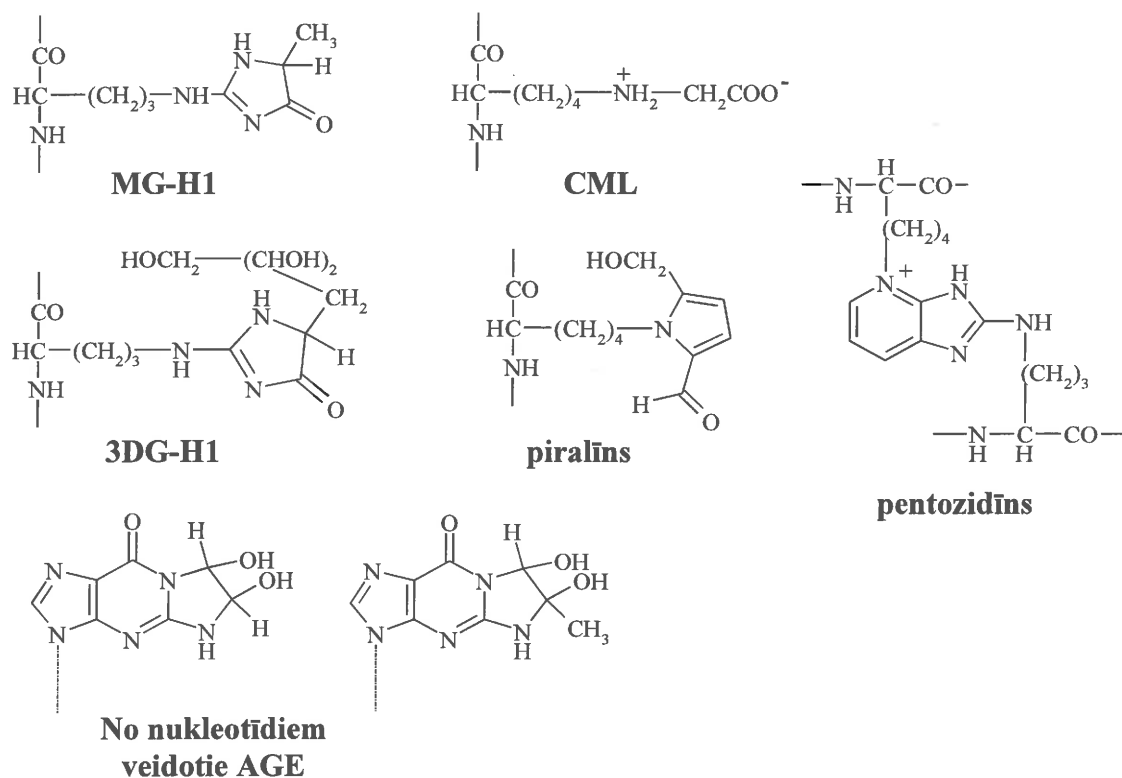
1. Glikozes autooksidācija, ko katalizē metāli
2. Šifa bāzu un Amadori produktu noārdīšanās
3. Triožu fosfātu fragmentācija
4. Lipīdu peroksidācija
5. Ketonvielu un treonīna katabolisms
6. Fruktozes 3-fosfāta veidošanās un sadalīšanās



1.3. att. Reaģētspējīgo metabolītu veidošanās

Metilglioksāls ir viens no reaģētspējīgākajiem starpproduktiem AGE veidošanās procesā un galvenokārt rodas, noārdoties triožu fosfātiem - neenzimātiski defosforilējoties glicerāldehīda 3-fosfātam un dihidroksiacetona fosfātam (Thornalley, 2005, Thornalley, 2007). Zināms, ka zīdītājiem fizioloģiskos apstākļos metilglioksāla veidošanās sastāda apmēram 0,1-0,4% no kopējā triožu fosfātu metabolisma apjoma (Phillips, 1993). Ilgstošas hiperglikēmijas apstākļos metilglioksāla veidošanās triožu fosfātu metabolisma ceļā palielinās līdz pat 1% no kopējās glikozes triožu plūsmas (Thornalley, 1988). Metilglioksāls atgriezeniski reaģē ar cisteīna atlikumiem, veidojot hemitioacetāla atvasinājumus, kā arī ar lizīna un arginīna atlikumiem, veidojot glikozamīnus. Tālākās reakcijas ir neatgriezeniskas, un svarīgākais produkts ir no metilglioksāla atvasinātais hidroimidazolons (MG-H1) (1.4. attēls). MG-H1 daudzuma palielināšanās ir saistīta ar kataraktas attīstību (Ahmed, 2003) un lielāku retinopātijas gadījumu skaitu 1. tipa CD pacientiem (Fosmark, 2009). Metilglioksāls, reaģējot ar lizīna atlikumiem, veido tādu AGE kā Nε-(1-karboksietil)lizīnu (CEL) vai metilglioksāla lizīna dimēru (MOLD) (Degenhardt, 1998).

Līdzīgi metilglioksālam glioksāls reaģē ar lizīna un arginīna atlikumiem, veidojot tādus AGE kā Nε-(1-karbosimetil)lizīnu (CML) (1.4. attēls) (Wells-Knecht, 1995) un no glioksāla atvasināto hidroimidazolonu (Thornalley, 2003).



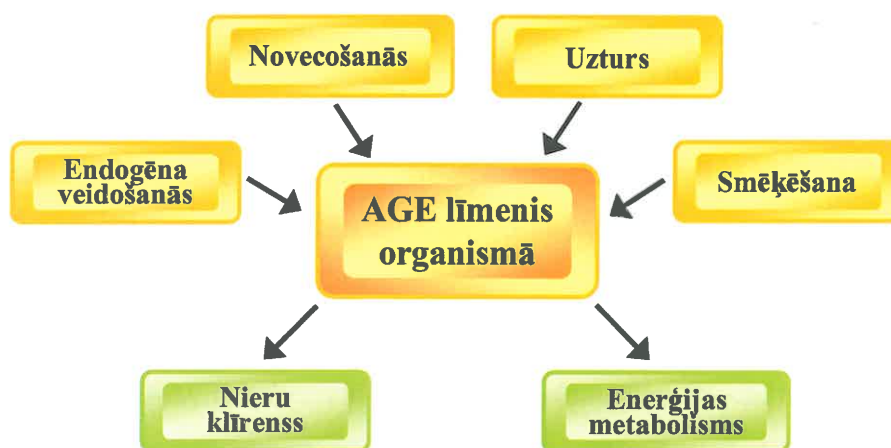
1.4. att. AGE fragmentu struktūrformulas

CML veidošanās norit salīdzinoši ātri un sastāda lielāko daļu no lizīna atvasinātiem AGE (Knecht, 1991). CML var veidoties gan glikozes autooksidācijas, gan lipīdu peroksidācijas rezultātā, tādējādi var būt par marķieri oksidatīvam stresam, oksidējoties oglekļa hidratātiem un lipīdiem (Requena, 1996).

Pētījumos noskaidrots, ka 3-dezoksiglikozonam reaģējot ar proteīnu amino- grupām, veidojas CML, 3-dezoksiglikozon-imidazolons (3-DG-H1) (Jono, 2004, Konishi, 1994), piralīns (Hayase, 1989) un nelielā daudzumā arī pentozidīns (Dyer, 1991) (1.4. attēls). 3-Dezoksiglikozons piedalās arī kristalīna un kolagēna neenzimātiskā glikēšanā, sekmējot novecošanos un diabēta vaskulāro komplikāciju, aterosklerozes un hipertensijas attīstību (Niwa, 1999).

Arī DNS struktūra nav pasargāta no glikēšanās ar glioksālu un metilglioksālu (Krymkiewicz, 1973). Fizioloģiskos apstākļos dezoksiguanozīns ir visreaģētspējīgais nukleotīds, tas reaģē ar α -oksoaldehīdiem, veidojot imidazopurinona atvasinājumus – no nukleotīdiem atvasinātos AGE (1.4. attēls) (Yuan, 2008). Nukleotīdu AGE klātbūtne DNS struktūrā paaugstina mutāciju biežumu, izraisa DNS dubultspirāles pārrāvumus un citotoksicitāti (Murata-Kamiya, 2001, Thornalley, 2010).

AGE daudzumu organismā nosaka ne tikai to endogēnā veidošanās, bet arī eksogēni avoti, piemēram, uzturs un smēķēšana (1.5. attēls). Līdz ar novecošanos palēninās enerģijas metabolisms un nieru glomerulārās filtrācijas ātrums, tādējādi paaugstinot AGE koncentrāciju organismā.



1.5. att. Faktori, kas nosaka cirkulējošo AGE koncentrāciju

Uzturā AGE veidojas, termiski apstrādājot pārtikas produktus. Faktori, kas nosaka izveidoto AGE daudzumu, ir uzturvielas, temperatūra, ūdens daudzums un termiskās apstrādes laiks. Ar olbaltumvielām un taukiem bagātā maltītē AGE saturs ir

12-30 reižu augstāks, salīdzinot ar ogļhidrātus saturošiem produktiem (Goldberg, 2004). AGE veidošanos veicina produktu apstrāde augstā temperatūrā, piemēram, cepšana, grilēšana, fritēšana. AGE saturu uzturā iespējams samazināt, izmantojot zemāku temperatūru, lielāku ūdens daudzumu (vārot, tvaicējot vai sautējot) vai skābas marinādes (citrona sulu, etiķi) (Goldberg, 2004, Uribarri, 2010). No AGE, kas uzņemti ar pārtiku, uzsūcas aptuveni 10%, un divas trešdaļas no tiem uzkrājas audos (Finot, 2005, Koschinsky, 1997). Pēc spējas izraisīt oksidatīvo stresu un iekaisumu ar uzturu uzņemtie AGE ir līdzvērtīgi endogēnajiem (Vlassara, 2004). Tabaka un tabakas dūmi ir viens no reaģētspējīgo α -oksoaldehīdu un eksogēno AGE avotiem (Cerami, 1997). Tabakas gruzdēšana pēc būtības ir Majjāra reakcija: ciete pārvēršas par glikozi un reaģētspējīgiem α -oksoaldehīdiem, kas reaģē ar proteīniem, tādējādi veicinot toksisku AGE veidošanos (Nicholl, 1998). Pētījumos noskaidrots, ka smēķētājiem ir augstāks AGE daudzums asins serumā, artērijās un acu lēcās (Nicholl, 1998, Stitt, 2001).

1.1.2. AGE atkarīgie molekulārie mehānismi

Gan Šifa bāzu, gan Amadori produktu veidošanās ir tieši atkarīga no glikozes koncentrācijas asinīs, līdz ar to hroniska hiperglikēmija CD pacientiem veicina reaģētspējīgo α -oksoaldehīdu un AGE veidošanos un uzkrāšanos audos. CD pacientiem reaģētspējīgo metabolītu un AGE daudzums organismā ir 1,3-1,4 reizes augstāks nekā cilvēkiem bez CD, turklāt attīstoties vēlīnām komplikācijām to koncentrācija vēl pieaug un ir 2-3 reizes augstāka nekā veseliem indivīdiem (Ghanem, 2011, He, 2001, Lu, 2011, Turk, 2009).

Dziļās glikēšanās galaproduktu uzkrāšanās audos veicina tādu mikrovaskulāro CD vēlīno komplikāciju attīstību kā retinopātija, nefropātija, neiropātija un diabētiskās pēdas sindroms. Ir parādīts, ka CML koncentrācija intraokulārajā šķidrumā un serumā 2.tipa CD pacientiem ticami korelē ar diabētiskās retinopātijas attīstību (Boehm, 2004, Ghanem, 2011). Arī AGE koncentrācija urīnā korelē ar diabētiskās nefropātijas stadiju (Aso, 2004). Lai gan nav atrasta AGE daudzuma korelācija ar diabētiskās neiropātijas attīstību, ir parādīts, ka CD pacientiem ir raksturīga pārmērīga AGE uzkrāšanās perifērajos nervos, īpaši aksonos, kas varētu sekmēt nervu bojājumu un komplikāciju attīstību (Misur, 2004).

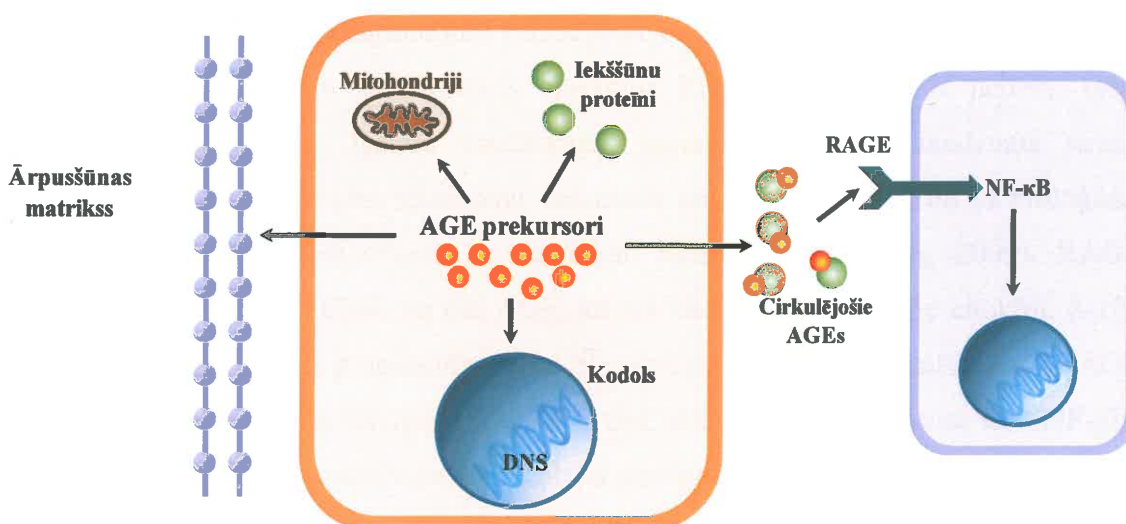
Metilglioksāla daudzums ir paaugstināts diabēta (Han, 2007), urēmijas (Lapolla, 2005) un hroniskas nieru saslimšanas (Nakayama, 2008) gadījumā, sasniedzot pat



vairāk kā 800 nM koncentrāciju. Vidējā metilglioksāla koncentrācija veseliem kontroles indivīdiem plazmā ir 100-120 nM, savukārt audos tā ir 1-5 μ M (Thornalley, 2008). Papildus tam slāpekli saturošo vielmaiņas galaproduktu uzkrāšanās un urēmija ir saistīta ar sāpīgas neiropatijas attīstību (Burn, 1998). Metilglioksāla koncentrācija asinīs 1. tipa cukura diabēta pacientiem ir paaugstināta 5-6 reizes, taču 2. tipa cukura diabēta pacientiem 2-3 reizes (Rabbani, 2012). Nesen publicētā pētījumā parādīts, ka metilglioksāls, saistoties pie arginīna un lizīna atlikumiem lādiņa-atkarīgā $\text{Na}_v1.8$ jonu kanālā, maina tā jutīgumu un izraisa hiperalgēziju un izteiktus neiroloģiskus simptomus (Bierhaus, 2012).

Galvenie AGE radīto šūnu un audu bojājumu, kā arī diabēta vēlino komplikāciju veidošanās mehānismi (1.6. attēls) ir:

1. Iekššūnu AGE veidošanās, kas izsauc šūnu funkciju traucējumus.
2. Ārpusšūnas matricā uzkrāto AGE izsaukta stabilu saišu veidošanās starp proteīnu molekulām (angļu val. *cross-linking*), kas izraisa izmaiņas asinsvadu sienīšu struktūrā.
3. Cirkulējošo AGE saistīšanās ar šūnu dziļās glikēšanās galaproduktu receptoriem (RAGE) un šūnu signālceļu aktivācija ar sekojošām gēnu ekspresijas izmaiņām.



1.6. att. AGE atkarīgie molekulārie mehānismi

Iekššūnu AGE iesaistās šūnas signālceļu aktivācijā un proteīnu funkciju modificēšanā, tādā veidā sekmējot CD vēlino komplikāciju attīstību (Brownlee, 2005). Tie samazina endotēlija slāpekļa oksīda (NO) sintēzes ekspresiju un inaktivē NO, radot

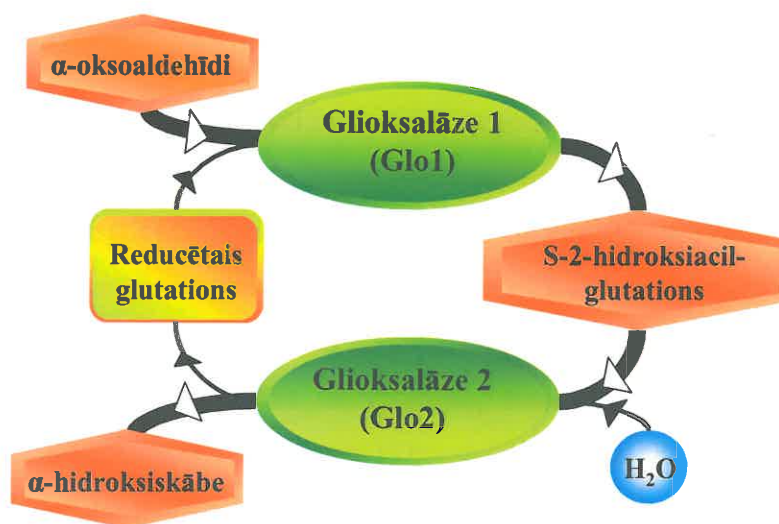
sīko asinsvadu sašaurināšanos (Soro-Paavonen, 2010). Mitohondriālo proteīnu glikēšanās izsauc traucējumus mitohondriju funkcionēšanā un veicina superoksīda anjonu veidošanos (Rosca, 2005). Gan pārmērīga superoksīda anjonu veidošanās, gan pats metilglioksāls samazina gliceraldehīd-3-fosfātdehidrogenāzes (GADPH) aktivitāti, kas ir svarīgs enzīms glikolīzes procesā. Līdz ar to lielākā daļa šūnā uzņemtās glikozes nevar tikt noārdīta līdz laktātam, un pastiprināti uzkrājas glikolīzes metabolisma starpprodukti (Lee, 2005). Tā kā ārpusšūnas matricas struktūras komponenti (kolagēns, laminīns) ir stabili savienojumi, un to atjaunošanās audos notiek lēni, tie ir pakļauti ilgstošai glikēšanai. Uzkrājoties AGE ārpusšūnas matricā, samazinās asinsvadu sieniņu elasticitāte un palielinās to pretestība un caurlaidība, kā arī sašaurinās lumens (Archer, 1999, McNulty, 2007). Šīm izmaiņām asinsvadu sieniņu struktūrā seko audu išēmija un bojājums. AGE veidošanās ārpusšūnas matricā ietekmē arī matricas un šūnas mijiedarbību un izjauc šūnu piestiprināšanās vietas, kā rezultātā izmainās signālu pārvade starp matricu un šūnu, un samazinās šūnu adhēzijas spēja (Schalkwijk, 2012). Šīs AGE izsuktās izmaiņas var būt svarīgs sākotnējais notikums CD mikrovaskulāro komplikāciju patoģenēzē, kas izsauc endotēlija šūnu disfunkciju un asinsvadu funkciju traucējumus.

RAGE lokalizēti daudzu šūnu, tajā skaitā endotēlija, mononukleāro fagocītu, limfocītu, kā arī asinsvadu gludās muskulatūras un neironu membrānās, un tie pēc savas struktūras pieskaitāmi imūnglobulīnu klases proteīniem (Barlovic, 2011). Lielākajā daļā cilvēka organisma šūnu fizioloģiskos apstākļos RAGE ekspresija ir neliela, taču, palielinoties specifisko ligandu daudzumam organismā, RAGE daudzums strauji pieaug. RAGE tiek aktivēts iekaisumu veicinošu reakciju rezultātā, un tā bioloģiskā aktivitāte atkarīga no saistīšanās ar dažādiem ligandiem (Bierhaus, 2009). RAGE receptorus var stimulēt CML un citi AGE, kā arī iekaisumu veicinošie citokīni, S-100 kalgranulīni, amfoterīns, β -amiloīds un citi fibrilārie proteīni. AGE saistīšanās ar RAGE šūnā izraisa iekaisumam līdzīgus procesus - tiek aktivēta kodola faktora κ B (NF- κ B) regulēto mērķa gēnu transkripcija, kā rezultātā pastiprinās citokīnu, adhēzijas molekulu, protrombotisko un vazokonstriktīvo faktoru, RAGE, un paša NF- κ B ekspresija (Bierhaus, 2001, Li, 1997). Ja īslaicīga NF- κ B aktivācija ir jutīga šūnas atbilde uz bojājumu un nodrošina tās izdzīvošanu, tad RAGE atkarīga neatgriezeniska NF- κ B aktivācija spēj radīt pastāvīgu un patoloģiski pastiprinātu iekššūnas signāla pānesi, kas veicina, piemēram, CD vēlino komplikāciju attīstību. Eksperimentālajos pētījumos noskaidrots, ka RAGE antivielu ievadīšana samazina NF- κ B aktivāciju un interleikīna-6

gēna ekspresiju sēžas nerva audos, bet RAGE^{-/-} pelēm nenovēro ne CML un AGE izraisītus efektus spinālo nervu saknīšu ganglijos, ne diabēta izraisītu NF- κ B aktivāciju (Okamoto, 2001, Vlassara, 1981). Lai gan RAGE un tā ligandi ir iesaistīti diabēta komplikāciju attīstībā, līdz šim klīniskajos un eksperimentālajos pētījumos apstiprinoši dati par RAGE noteicošo lomu orgānu bojājumu izraisīšanā cukura diabēta gadījumā nav iegūti. Turklāt nepieciešami turpmāki pētījumi RAGE receptoru fizioloģiskās funkcijas, kā arī AGE inhibēšanas vai šķīstošo RAGE lietošanas klīniskā lietderīguma noskaidrošanai.

1.1.3. Glioksalāžu enzīmu aizsargsistēmas loma

Glioksalāžu sistēma ir viena no visaktīvākajām šūnas enzimatiskajām aizsardzības sistēmām pret neenzimātisku glikēšanos (Vander Jagt, 2003). Tā katalizē reaģētspējīgo α -oksoaldehīdu pārvēršanos atbilstošās netoksiskās α -hidroksiskābēs, kas iesaistās šūnas normālajās metabolisma norisēs. Enzīmu sistēmas darbības rezultātā tiek novērsta α -oksoaldehīdu iesaistīšanās neenzimātiskās reakcijās ar olbaltumvielām un kavēta AGE uzkrāšanās šūnās. Glioksalāžu sistēmu veido divi enzīmi Glo1 un Glo2, kā arī glutations kā kofaktors (1.7. attēls).



1.7. att. Glioksalāžu sistēmas katalizētā toksisku α -oksoaldehīdu detoksificēšanas reakcija

Glioksalāze 1 (EC 4.4.1.5, laktoilglutaciona liāze) katalizē no α -oksoaldehīda un reducētā glutaciona neenzimātiski veidotā hemitioacetāla izomerizāciju par S-2-hidroksiacilglutacionu. Glo1 ir atrodama visos cilvēka audos un ir viens no visagrīnāk

ekspresētajiem enzīmiem embriogēnēzē, turklāt tās aktivitāte augļa audos ir apmēram 3 reizes augstāka nekā atbilstošos audos pieaugušam cilvēkam (Thornalley, 1993). Cilvēka Glo1 pēc uzbūves ir dimērs ar molekulāro masu 42 - 46 kDa, ko veido divas vienādas subvienības (Cameron, 1997). Glo1 fizioloģiskie substrāti ir metilglioksāls, glioksāls un citi acikliskie α -oksoaldehīdi. Mihaelisa-Mentenā konstantes (K_m) un maksimālās ātruma vērtības samazinās, pieaugot sānu ķēdes hidrofobajām īpašībām. Piemēram, metilglioksālam K_m sastāda 71-130 μ M, kamēr fenilglioksāla K_m – 35-40 μ M (Aronsson, 1981, Ridderstrom, 1996, Schimandle, 1979).

Glioksalāze 2 (EC 3.1.2.6, hidroksiacilglutationa hidrolāze) katalizē S-2-hidroksiacilglutationa hidrolīzi līdz atbilstošai α -hidroksiskābei un reducētām glutatoniem. Atšķirībā no Glo1, kas ir citosola enzīms, Glo2 ir atrodama gan citosolā, gan mitohondrijos (Talesa, 1989). Enzīms ir monomērs un bāzisks proteīns (pI 7.7-8.5), un tā molekulārā masa cilvēkam ir 23-29 kDa (Allen, 1993). Glo2 spēj hidrolizēt daudz dažādus glutatoniem tie esterus, tomēr S-D-laktoilglutatiens ir tās galvenais substrāts ne tikai cilvēka organismā, bet arī raugos un augos (Bito, 1999, Talesa, 1990). S-D-laktoilglutationa K_m ir 130-440 μ M un ir atkarīga no enzīma avota (Allen, 1993, Talesa, 1989). Cilvēku Glo2 katalizētās S-D-laktoilglutationa hidrolīzes K_m vērtība paaugstinās, pieaugot pH robežās no 5 līdz 10 (Allen, 1993).

Glioksalāžu sistēma aizsargā organisma šūnas pret aciklisko α -oksoaldehīdu, īpaši metilglioksāla, izraisītiem bojājumiem (Creighton, 2001, Thornalley, 2008), līdz ar to tai varētu būt svarīga nozīme CD vēlino komplikāciju attīstībā. Vairāki pētījumi ir veltīti glioksalāžu sistēmas saistībai ar hiperglikēmiju, tomēr līdz šim nav izdevies pārliecinoši apstiprināt enzīmu lomu CD vēlino komplikāciju patoģenēzē. Sākotnēji glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņas tika pētītas hiperglikēmijas apstākļos *in vitro* eksperimentos. Inkubējot cilvēku eritrocītus 25 mM glikozes šķīdumā (hiperglikēmijas modelis), glioksalāžu enzīmu aktivitāte neizmainījās, tomēr metilglioksāla un S-D-laktoilglutationa koncentrācijas šūnās pieauga (Thornalley, 1988). Citos pētījumos tika parādīts, ka, inkubējot endotēlija šūnas hiperglikēmijas apstākļos, pastiprināta GLO1 gēna ekspresija samazina metilglioksāla un AGE uzkrāšanos šūnā (Ahmed, 2008, Shinohara, 1998).

Glioksalāžu sistēma tika pētīta arī CD eksperimentālajos modeļos. Streptozotocīna diabētisko (1. tipa CD modelis) un ģenētiski aptaukojušos (ob/ob) peļu eritrocītos, sākoties saslimšanai, pazeminājās Glo1 aktivitāte un paaugstinājās Glo2 aktivitāte (Atkins, 1989). Pētot glioksalāžu sistēmas izmaiņas streptozotocīna diabētisko

žurku audos, tika novērota samazināta Glo1 aktivitāte aknās un paaugstināta – muskuļaudos, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem; līdzīgas izmaiņas tika konstatētas arī Glo2 aktivitātē (Phillips, 1993). Vairākos pētījumos tika parādīts, ka CD eksperimentālajos modeļos, līdzīgi pētījumiem in vitro, pastiprināta GLO1 ekspresija novērš toksisko α -oksoaldehīdu un AGE uzkrāšanos, kā arī kavē CD vēlīno komplikāciju attīstību (Brouwers, 2011, Kumagai, 2009). Izmantojot *C.elegans* modeli, izpētīts, ka glioksalāzes enzīmu sistēma būtiska ne vien dzīvildzes, bet arī neironālās integritātes regulēšanai (Morcos, 2008, Schlotterer, 2009).

Pirmie klīniskie pētījumi parādīja, ka CD pacientu asins paraugos glioksalāžu sistēmas substrātu un metabolītu, metilglioksāla, S-D-laktoilglutaciona un D-laktāta, koncentrācijas ir paaugstinātas, salīdzinot ar cilvēkiem bez CD (McLellan, 1994, Thornalley, 1989). Šie rezultāti netieši norāda uz paaugstinātu glioksalāžu sistēmas aktivitāti hiperglikēmijas apstākļos, lai gan dati par Glo1 un Glo2 aktivitātēm CD gadījumā dažādos pētījumos atšķiras. Pētījumā par glioksalāžu sistēmu CD gadījumā tika parādīts, ka abu enzīmu aktivitāte asinīs CD pacientiem neatšķīrās no veselīem cilvēkiem, un 1.tipa CD pacientiem ar retinopātiju Glo1 aktivitāte bija augstāka nekā pacientiem bez retinopātijas, kuriem savukārt bija augstāka Glo2 aktivitāte (Thornalley, 1989). Citā pētījumā 1. un 2. tipa CD pacientiem tika novērota paaugstināta Glo1 aktivitāte eritrocītos, kamēr Glo2 bija augstāka tikai 2.tipa CD gadījumā, salīdzinot ar cilvēkiem bez CD. Neiropātijas gadījumā abu tipu CD pacientiem tika konstatēta augstāka Glo2 aktivitāte nekā pacientiem bez neiropātijas, savukārt Glo1 aktivitāte paaugstinājās attīstoties jebkurai mikrovaskulārai komplikācijai - retinopātijai, nefropātijai vai neiropātijai (McLellan, 1994). Lai gan eksperimentālajos pētījumos iegūti rezultāti par samazinātas Glo1 aktivitātes saistību ar AGE daudzuma palielināšanos un RAGE receptoru pastāvīgas aktivācijas nozīmi diabētiskās neiropātijas funkcionālo bojājumu attīstībā, tomēr diabētiskās neiropātijas un Glo1 aktivitātes saistība CD pacientiem maz pētīta, kā arī nav vienošmīgu datu par Glo1 aktivitātes izmaiņām CD pacientos (Konrāde, 2008, McLellan, 1994, Ratliff, 1996, Thornalley, 1993).

Diabētiskā neiropātija ir visbiežāk sastopamā un grūtāk ārstējamā CD vēlīnā komplikācija (Boulton, 2005). Piecdesmit procentiem cukura diabēta pacientu attīstās diabētiskās neiropātijas simptomi, kas klīniski raksturojas ar sāpīgas neiropātijas simptomiem (spontānas, dedzinošas, lēkmjveidīgas sāpes vai nepatīkamas sajūtas, tīršana, hiperalgēzija, alodīnija) vai nejutīgumu, kas palielina apdegumu, savainojumu,

pēdu bojājumu un čūlas attīstības risku (Tesfaye, 2012). Lai gan ilgstoša hiperglikēmija un diabēta stāžs ir nozīmīgi riska faktori diabētiskās neiropātijas attīstībai, tomēr nereti pacientiem ar mērenu hiperglikēmiju attīstās izteikti neiropātijas simptomi, savukārt pacientiem ar ilgstoši paaugstinātu glikozes koncentrāciju nenovēro neiropātijas simptomu attīstību (Duckworth, 2009, Gaede, 2003, Siegelaar, 2009). Pētījumos parādīts, ka arī tādi kardiovaskulāro slimību riska faktori kā hipertensija, smēķēšana, aptaukošanās un paaugstināta triglicerīdu koncentrācija saistīti ar paaugstinātu diabētiskās neiropātijas attīstības risku (Tesfaye, 2005, Ziegler, 2004). Lai gan neiropātisko sāpju patoģenēzē iesaistīti gan centrāli, gan perifēri mehānismi, precīzi sāpīgas diabētiskās neiropātijas cēloņi un faktori, kas nosaka slimības simptomus, nav zināmi (Jack, 2011, Tesfaye, 2012). Pētījumi par neiropātijas patoģenēzi liecina, ka gan metabolo, gan vaskulāro faktoru mijiedarbība sekmē endotēlija funkcijas traucējumu un nervu bojājumu attīstību (Tesfaye, 2012). Eksperimentālajos dzīvnieku modeļos pētīti vairāki ar hiperglikēmiju saistīti signālceļi, kas veicina neiropātisko sāpju un traucētas jušanas funkcijas attīstību. Ilgstoša hiperglikēmija veicina oksidatīvi-nitrozatīvā stresa attīstību un poli(ADF-ribozes) polimerāzes (PARP) aktivāciju, kas savukārt palielina aldozes reduktāzes aktivitāti un veicina PKC aktivāciju, kā arī iekaisumu veicinošo faktoru stimulāciju (Obrosova, 2008). Klīnisko pētījumu dati liecina, ka tikai glikozes koncentrācijas normalizēšana 1. un 2. tipa CD pacientiem nenovērš sāpīgas neiropātijas simptomus, kas var parādīties arī indivīdiem ar prediabēta simptomiem, tādēļ vēl joprojām aktuāli ir CD vēlino komplikāciju mehānismu pētījumi gan metabolo, gan vaskulāro faktoru noskaidrošanai.

Paaugstinātas glioksalāžu sistēmas aktivitātes gadījumā CD slimniekiem varētu būt lielāka iespēja izvairīties no vēlino komplikāciju izraisītās dzīves kvalitātes pasliktināšanās. Lai gan glioksalāžu sistēma ir būtiskākais solis α -oksoaldehīdu detoksifikācijā, līdz šim nav izdevies pārlicinoši apstiprināt enzīmu aktivitātes vai ekspresijas korelāciju ar CD vēlino komplikāciju attīstības pakāpi. Turklāt nepieciešams izstrādāt jaunas metodes, kas ļautu ne tikai padziļināti izpētīt glioksalāžu sistēmas lomu metabolās disfunkcijas, CD un aptaukošanās gadījumos, bet arī noteikt glioksalāžu nozīmi kā iespējamo zāļu mērķi mikrovaskulāro un makrovaskulāro komplikāciju ārstēšanā un profilaksē.

1.1.4. Oglhidrātu enerģijas metabolisma patoloģiski traucējumi

Organisma enerģijas homeostāzi nodrošina nepārtraukta lipīdu un ogļhidrātu metabolisma regulācija. Normālos apstākļos veseli indivīdi, atbilstoši enerģijas substrātu, glikozes vai taukskābju, pieejamībai, var mainīt to izmantošanu adenoziņa trifosfāta (ATF) iegūšanai un optimālu vielmaiņas procesu nodrošināšanai. Tukšā dūšā, aktivējoties lipolīzei, enerģija pārsvarā tiek iegūta no taukskābju oksidācijas, savukārt postprandiālā stāvoklī, kad palielinās glikozes un insulīna koncentrācija, glikozes oksidācija pieaug, un vairāk enerģijas tiek iegūta no glikozes metabolisma.

Taukskābju β -oksidācija nodrošina 60 - 90% sirds audiem nepieciešamo ATF daudzumu, bet pārējie 10 - 40% rodas no piruvāta piruvātdehidrogenāzes kompleksa (PDH) stimulētās glikozes un laktāta oksidācijas rezultātā (Huss, 2004). Acetilkoenzīms A (acetil-CoA) rodas gan taukskābju, gan piruvāta oksidācijas rezultātā un tiek oksidēts Krebsa ciklā, veidojot NADH un FADH₂, kas elpošanas ķēdes oksidatīvās fosforilēšanas procesā tiek izmantoti kā elektronu donori ATF sintēzei. Garķēžu taukskābju transportu šūnās nodrošina taukskābes saistošais proteīns (FABP), kā arī transmembrānas taukskābju transportproteīni (FATP) un taukskābju translokāze (FAT/CD36) (Schaffer, 1994). Uzņemtais taukskābes tiek esterificētas ar taukskābju acil-CoA sintēzāžu (ACSL) palīdzību, veidojot acil-CoA. Mitohondriju ārējās membrānas enzīms karnitīn-palmitoiltransferāze I (KPT I, EC. 2.3.1.21) pārveido garķēžu (vairāk par C12) acil-CoA par atbilstošiem acilkarnitīniem, savukārt karnitīna-acilkarnitīna translokāze nodrošina to transportu cauri mitohondrija membrānai apmaiņā pret brīvo karnitīnu. Mitohondriju iekšējās membrānas enzīms KPT II (EC. 2.3.1.21) mitohondriju matricā katalizē šo garķēžu acilkarnitīnu transesterifikāciju un atbilstošo acil-CoA veidošanos (Bonfont, 2004), kas tālāk iesaistās β -oksidācijā.

Glikoze sirds, muskuļu un tauku šūnās tiek transportēta ar glikozes transportproteīniem, GLUT1 un GLUT4 (Gould, 1993), vai tiek iegūta, atbrīvojot to no glikogēna rezervēm. Pieauguša cilvēka sirdī glikozes transportproteīnu GLUT4 un GLUT1 daudzuma attiecība ir 3:1 (Santalucia, 1999). GLUT1 ir insulīna-neatkarīgs glikozes transportproteīns, kas galvenokārt regulē pamata glikozes transportu sirds šūnās, savukārt GLUT4 ir insulīna-atkarīgs glikozes transportproteīns un tiek stimulēts lielākoties fosfatidilinozitol 3-kināzes (PI3K) regulētos signālceļos. Insulīns stimulē glikozes uzņemšanu šūnās, veicinot GLUT4 translokāciju no tā šūnas depo uz plazmatisko membrānu (Fischer, 1997). Arī palielināts adenoziņa monofosfāta-aktivētās

proteīnu kināzes (AMPK) daudzums, piemēram, išēmijas laikā stimulē GLUT4 ekspresiju, palielinot glikozes uzņemšanu šūnās, turklāt neatkarīgi no PI3K (Russell, 1999). Šūnās glikozi fosforilē heksokināze, veidojot glikozes 6-fosfātu, kas tālāk var iesaistīties glikolīzes, glikogēna veidošanā aknās un muskuļaudos vai pentožu fosfātu reakciju norisēs. Glikolīzes rezultātā rodas piruvāts, kas tālāk tiek pārvērsts par laktātu enzīma laktātdehidrogenāzes ietekmē vai, nokļūstot mitohondrijos, piruvātdehidrogenāzes kompleksa enzīmu ietekmē oksidatīvajā dekarboksilēšanā veido acetilkoenzīmu A.

Ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju (aptaukošanās, metabolā sindroma un 2. tipa cukura diabēta) gadījumā enerģijas substrātu metabolisma homeostāze ir traucēta (Larsen, 2008). Attīstoties hiperglikēmijai, palielinās gan ogļhidrātu, gan taukskābju pieejamība, taču šo substrātu oksidācija tiek kavēta. Pārmērīgs brīvo taukskābju daudzums samazina insulīna jutību jeb izraisa insulīna rezistenci audos (aknu, sirds, muskuļu un taukaudos), ko sākotnēji kompensē palielināta insulīna koncentrācija plazmā. Aknās insulīna rezistence veicina glikozes koncentrācijas paaugstināšanos, galvenokārt palielinoties glikoneoģenēzei (Consoli, 1989). Līdz ar to gan tukšā dūšā, gan postprandiālā stāvoklī paaugstinātu glikozes koncentrāciju plazmā nodrošina palielināta glikoneoģenēze aknās un traucēta insulīna stimulēta glikozes uzņemšana un oksidācija audos (galvenokārt skeleta muskuļaudos). Rezultātā asins plazmā veidojas pārmērīgs cirkulējošo lipīdu daudzums, kas veicina taukskābju ieplūšanu un uzkrāšanos mitohondrijos (Petersen, 2004). Palielinoties garķēžu taukskābju un taukskābju metabolisma starpproduktu, galvenokārt acetil-CoA, daudzumam, tiek kavēta piruvātdehidrogenāzes kināzes (PDK) un KPT I aktivitāte, kā arī rodas Krebsa cikla un elpošanas ķēdes darbības traucējumi (Koves, 2008a, Wang, 2007). Šo pārmaiņu rezultātā krasi samazinās glikozes un taukskābju oksidācijas ātrums, kā arī ATF sintēze mitohondrijos (Kelley, 2002).

1.2. Cukura diabēta mikro- un makrovaskulāro komplikāciju pētīšanas iespējas

Lai gan eksperimentālie dzīvnieku modeļi nevar pilnvērtīgi atveidot diabēta attīstības procesu cilvēkos, pētījumiem eksperimentālajos modeļos ir vairākas priekšrocības, salīdzinot ar klīniskajiem pētījumiem. Eksperimentālajos pētījumos tiek izslēgtas tādu limitējošo faktoru ietekmes kā rases, ekonomiskās un ģeogrāfiskās

atšķirības, kā arī zāļu mijiedarbība, diētas, dzimuma un vecuma atšķirības. Diabēta vēlino komplikāciju patoģenēzes, jaunu diabēta līdzekļu un to darbības molekulāro mehānismu izpētei izmantotie eksperimentālie modeļi pēc diabēta izcelsmes veida tiek iedalīti 2 kategorijās:

- 1) ģenētiski noteikts diabēts, kas attīstās spontāni,
- 2) eksperimentāli ierosināts diabēts.

1.2.1. Ģenētiski noteikti metabolā sindroma un 2. tipa cukura diabēta eksperimentālie modeļi

Zucker *fa/fa* žurkas ir visplašāk lietotais aptaukošanās un metabolā sindroma eksperimentālais modelis, kas raksturojas ar ģenētiski noteiktu palielinātu ķermeņa svaru jau no 3. līdz 5. dzīves nedēļai, palielinātu apetīti, dislipidēmiju un insulīna rezistenci. Dzīvniekiem raksturīga leptīna receptora mutācija *fa* gēna ekstracelulārā domēna 269. pozīcijā (glutamīna vietā kodējot prolīnu), kas samazina leptīna afinitāti jeb saistīšanās spēju 10 reizes un molekulārā līmenī nosaka Zucker *fa/fa* fenotipisko raksturojumu (Chua, 1996). Leptīns proporcionāli lipīdu rezervēm taukaudos sintezējas un izdalās no adipocītiem, un saistās ar leptīna receptoriem hipotalāmā, centrāli regulējot enerģijas patēriņu organismā un apetīti. Leptīna receptoru defekts un to regulatoro funkciju trūkums nosaka ievērojami paaugstinātu cirkulējošo leptīna, kā arī citu ēstgribu un svaru regulējošu hormonu (piemēram, grelīna un oreksīna) koncentrāciju Zucker *fa/fa* žurku plazmā. Hiperfāģijas un traucētas termogēnēzes rezultātā Zucker *fa/fa* žurkām palielinās enerģijas rezervju uzglabāšana taukaudos, attīstās aptaukošanās un adipocītu hipertrofija. Jau 14 nedēļu vecām žurkām 40% no ķermeņa svara sastāda lipīdi (Aleixandre de, 2009). Papildus tam Zucker *fa/fa* žurkām raksturīgi arī cilvēku metabolajam sindromam līdzīgi endokrinoloģiski traucējumi – insulīna rezistence, dislipidēmija, mēreni glikozes tolerances traucējumi, kā arī paaugstināta insulīna koncentrācija. Lai gan glikozes koncentrācija Zucker *fa/fa* žurku plazmā nav atšķirīga no Zucker *lean* žurkām vai ir nedaudz paaugstināta, vecākām Zucker *fa/fa* žurkām attīstās tādas diabēta vēlīnās komplikācijas kā hipertensija un endotēlija disfunkcija (Aleixandre de, 2009).

Goto-Kakizaki žurkas ir spontāns 2. tipa cukura diabēta modelis ar normālu ķermeņa svaru (Goto, 1976), kas radīts, selektīvi vairojot Wistar līnijas žurkas, kurām spontāni attīstījās glikozes tolerances traucējumi. Goto-Kakizaki žurkām ir mērena

hiperglikēmija, perifērā insulīna rezistence, 2. tipa cukura diabētam raksturīgās metabolo, hormonālo un vaskulāro funkciju traucējumu pazīmes (Gotoh, 2006), taču tām nepiemīt hiperlipidēmija vai aptaukošanās. Goto-Kakizaki žurkām 2. tipa cukura diabēts attīstās 14-16 nedēļu vecumā, savukārt vēlāk novēro arī mikrovaskulāro komplikāciju attīstību (Shriver, 2011).

1.2.2. Eksperimentāli izraisīta dislipidēmija un insulīna rezistence

Augsts aptaukošanās un metabolā sindroma sastopamības biežums tiek saistīts ar populācijas kopējo fruktozes patēriņa pieaugumu, ko galvenokārt veicinājusi augsta fruktozes satura kukurūzas sīrupa lietošanas ieviešana saldinātajos dzērienos un pārtikā. Pretēji glikozei, kas tiek metabolizēta visos organisma audos, fruktoze galvenokārt tiek metabolizēta aknās, un tā vāji stimulē leptīna un insulīna sekrēciju (Hallfrisch, 1990). Fruktokināze (ketoheksokināze) aknās fosforilē fruktozi, veidojot fruktozes-1-fosfātu, kas tiek sašķelts enzīma aldolāzes B ietekmē un rodas gliceraldehīds un dihidroacetona fosfāts. Fruktozei atšķirībā no glikozes nav metabolismu kavējošas enzimatiskas regulācijas, un pastiprinātā glikolīze ievērojami palielina glikozes, glikogēna, laktāta un piruvāta koncentrācijas glicerola un acil-glicerola sintēzei. Intensīva fruktozes metabolisma rezultātā pastiprināti veidojas triglicerīdi un ļoti zema blīvuma lipoproteīni. Eksperimentālajos pētījumos parādīts, ka ilgstoša fruktozes lietošana žurkām izraisa daudzus metabolisma traucējumus - hipertensiju, insulīna rezistenci, hiperinsulinēmiju un dislipidēmiju, kā arī palielinātu kardiovaskulāro slimību risku (Hu, 2010).

1.3. Cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības aizkavēšana

Ņemot vērā to, ka cukura diabēta vēlīno komplikāciju patofizioloģijas pamatā iesaistīti daudzi faktori un signālceļi, terapijas mērķis slimības un komplikāciju ārstēšanā nav tikai glikozes koncentrācijas regulācija. Konvencionālās diabēta terapijas un vēlīno komplikāciju aizkavēšanas pamatā ir glikozes koncentrācijas regulācija, insulīna jutības atjaunošana audos, lipīdu profila atjaunošana un asinsspiediena samazināšana, tādējādi kavējot endotēlija disfunkcijas attīstību.

1.3.1. Glikēšanās un AGE veidošanās procesu kavēšana

Glikēšanās procesa samazināšanai *in vivo* iespējams ietekmēt dažādas AGE veidošanās un AGE izraisīto bojājumu stadijas. AGE uzkrāšanās un tālāku komplikāciju attīstības novēršanai, tiek izstrādāti un pētīti jauni savienojumi, piemēram, reaktīvo α -oksoaldehīdu saistīšanai, AGE saišu šķelšanai, AGE receptora (RAGE) un tā signālceļu bloķēšanas, aldozes reduktāzes inhibēšanai. Zāļu vielas un savienojumi glikēšanās un AGE veidošanās procesu aizkavēšanai apkopoti 1.1. tabulā.

Hiperglikēmija ir tieši saistīta ar palielinātu AGE veidošanos, tāpēc ilgstoša glikēmijas kontrole nodrošina organisma kopējā AGE daudzuma samazināšanos. Diabēta žurkām ar labu glikēmijas kontroli, salīdzinot ar ilgstoši paaugstinātu glikozes koncentrāciju, tika novērots zemāks AGE daudzums un samazināts ar kolagēnu-saistītais glikozilēšanās process (Odetti, 1996). Arī CD pacientiem ar intensīvu glikozes koncentrācijas samazinošu terapiju tika konstatēta zemāka ādas kolagēna glikozilēto savienojumu veidošanās, salīdzinot ar pacientiem, kas ārstēti ar tradicionālu terapiju (Monnier, 1999). Papildus tam, pētījumā ar 2. tipa cukura diabēta pacientiem, lietojot metformīnu, kas samazina α -oksoaldehīdu koncentrāciju, uzlabojās glikēmijas kontrole un samazinājās 3-dezoksiglukazona un AGE daudzums (Engelen, 2011).

Lai gan veiksmīgi un daudzsološi izrādījušies daudzi *in vitro* un eksperimentālie pētījumi AGE veidošanās procesu kavēšanai, pagaidām veiktie klīniskie pētījumi liecina par jauno savienojumu nepietiekamu efektivitāti diabēta vēlīno komplikāciju aizkavēšanā (Hartog, 2011a), tādēļ nepieciešami turpmāki pētījumi diabēta vēlīno komplikāciju kavējošu medikamentu izstrādei.

**Medikamentozās terapijas iespējas glikēšanās un AGE
veidošanās procesu kavēšanai**

Zāļu vielas vai savienojumi	Efeki eksperimentālajos modeļos	Blaknes, trūkumi	Klīniskie pētījumi (pētījuma fāze)	Literatūras avots
1. Reaktīvo α-oksoaldehīdu saistīšana				
Amino-guanidīns	↓Sirds funkcijas traucējumus ↓Neiropātiju ↓Nefropātiju ↓Retinopātiju	1) Ātra eliminācija caur nierēm, $T_{1/2} = 1.4h$ 2) Farmakoloģiskās devās vidēja darbības efektivitāte 3) Inhibē NOS 4) Toksicitāte	Diabētiskā nefropātija (II. fāze) – pārtraukts drošības apsvērumu un efektivitātes trūkuma dēļ	(Chang, 2006, Thornalley, 2003, Wu, 2008)
Piridoksamīns	↓ Nefropātiju ↓ Retinopātiju ↓ Hiperlipidēmiju ↓ Insulīna rezistenci	Nav būtisku blakusparādību	Diabētiskā nefropātija (II. fāze)	(Degenhardt, 2002, Williams, 2007)
Tiamīns, Benfotiamīns	↓ Nefropātiju	Ādas alergiskas reakcijas, nieze	Diabētiskā nefropātija (II. fāze) – nav efekta; Diabētiskā neiropātija (III. fāze)	(Alkhalaf, 2010, Beltramo, 2008, Stracke, 2008)
ALT-946 OPB-9195 LR-90	↓ Nefropātiju ↓ Retinopātiju (selektīvāki AGE inhibitori kā aminoguanidīns)	Nav novērotas	Diabētiskā nefropātija (preklīniskā fāze)	(Figarola, 2008, Nakamura, 2003, Wilkinson-Berka, 2002)
Metformīns	↓Ar diabētu saistīto kardiovaskulāro risku ↓ Nefropātiju	Gastrointestinālā trakta darbības traucējumi, laktacidoze, B12 vitamīna deficīts	Plaši lietots medikaments 2. tipa CD ārstēšanai ↓ Metilglikoksāla koncentrāciju ↑ Glo1 aktivitāti	(Beisswenger, 2003, Beisswenger, 1999)
2. AGE saišu šķelšana (AGE šķelēji)				
Alagebrija hlorīds (ALT-711)	↓ Nefropātiju	Nav novērotas	Hipertensija, hroniska sirds mazspēja (II. fāze)	(Coughlan, 2007, Hartog, 2011b, Little, 2005)
3. AGE receptora (RAGE) signālceļu bloķēšana				
TTP488	↓ β amiloīda izraisītus bojājumus	Nav novērotas	Alcheimera slimība (II. fāze) - pārtraukts efektivitātes trūkuma dēļ	(Mangialasche, 2010)
4. Aldozes reduktāzes inhibīcija				
Epalrestats	↓ Retinopātiju ↓ Mikroalbuminūriju	Gastrointestinālā trakta darbības traucējumi (vemšana, slikta dūša)	Diabētiskā neiropātija (III. fāze)	(Hotta, 2012)

1.3.2. Lipīdu un ogļhidrātu metabolisma līdzsvara farmakoloģiska atjaunošana

Ārstēšanas mērķis aptaukošanās un 2. tipa cukura diabēta patoloģijas gadījumā galvenokārt ir atjaunot enerģijas metabolisma līdzsvaru un uzlabot glikēmijas kontroli, veicinot insulīna sekrēciju un atjaunojot insulīna jutību perifērajos audos. Ogļhidrātu un lipīdu vielmaiņas traucējumu novēršanai izstrādāto medikamentu darbības pamatā ir enzīmu un kodola faktoru (piemēram, AMPK un PPAR), kas iesaistīti šūnu un organisma enerģijas homeostāzes uzturēšanā, aktivēšana, regulējot enerģijas substrātu piegādi un to izmantošanu (Sugden, 2009, Viollet, 2012). Pašlaik plašāk lietotie medikamenti diabēta ārstēšanai ir biguanidīnu klases savienojums - metformīns, sulfonilurīnvielas atvasinājumi un insulīna jutības atjaunotāji – tiazolidīndioni, α -glikozidāzes inhibitori, inkretīnu (glikagonam līdzīgā peptīda-1 (GLP-1)) analogi un dipeptidil peptidāzes-4 enzīma (DPP-4) inhibitori (1.2. tabula). Aptaukošanās, insulīna rezistence un CD saistīti ar paaugstinātu kardiovaskulāro slimību risku, tādēļ nereti papildus tiek lietoti medikamenti sirds un asinsvadu slimību ārstēšanai.

Metformīns (1,1-dimetilbiguanidīns) ir visplašāk lietotais, pirmās izvēles orālais medikaments 2. tipa cukura diabēta ārstēšanai pēc Amerikas Diabēta asociācijas (ADA) un Eiropas Diabēta pētniecības asociācijas (EASD) ieteikuma (Nathan, 2009). Medikamenta lietošana līdz ar dzīvesstila izmaiņām (diētu, svara kontroli un fiziskām aktivitātēm) samazina hiperglikēmiju un ķermeņa masu, neradot hipoglikēmijas risku. Metformīns, stimulējot insulīna receptoru ekspresiju un tirozīnkināzes aktivitāti, samazina insulīna rezistenci un tukšas dūšas plazmas insulīna koncentrāciju, tādējādi uzlabojot insulīna jutību. Nesenā pētījumā metformīnam parādīta arī inkretīnu signālceļu ietekmējošas īpašības, akūti palielinot plazmas GLP-1 daudzumu un stimulējot PPAR α -atkarīgo inkretīnu receptoru gēnu ekspresiju (Maida, 2011). Lai gan sākotnēji metformīna darbība un metabolie efekti tika skaidroti ar tiešu AMPK aktivāciju, tika atklāts, ka metformīns neietekmē AMPK fosforilāciju un tā aktivēšanu (Hardie, 2006). Izmantojot primāros cilvēku hepatocītus, nesēnā pētījumā noskaidrots, ka metformīna izraisītā AMPK aktivācija drīzāk ir īslaicīga samazināta šūnu enerģijas stāvokļa sekas, kas saistītas ar metformīna izraisītu mērenu un specifisku mitohondriālās elpošanas ķēdes enzīmu kompleksa I inhibēšanu (Stephene, 2011). Farmakoloģiska AMPK aktivācija uzlabo glikēmijas kontroli, palielinot GLUT4 transkripciju un translokāciju, tādējādi stimulējot insulīna-atkarīgo glikozes uzņemšanu

šūnās. Papildus tam AMPK aktivēšana, imitējot fiziskās aktivitātes vai badošanās izraisītas izmaiņas, veicina taukskābju uzņemšanu un oksidāciju skeleta muskuļu un sirds audos, glikolīzi sirds muskuļaudos, bet samazina glikoneoģenēzi, glikogēna un holesterīna sintēzi aknās, kā arī kavē taukskābju sintēzi un lipolīzi taukaudos (Viollet, 2011).

1.2. tabula

Medikamenti lipīdu un oglehidrātu metabolisma līdzsvara farmakoloģiskai atjaunošanai

Savienojumu klase	Medikamenta nosaukums	Darbības mehānisms	Metabolisma efekti	Blakusefekti	Literatūras avots
Biguanidīni	Metformīns	AMPK aktivācija, ↓ glikoneoģenēzi aknās	↓ Plazmas FA koncentrāciju, glikēmijas, HbA1c, kopējā un ZBL-holesterīna koncentrāciju, ķermeņa masu un taukaudu daudzumu	Gastrointestinālā trakta darbības traucējumi (kuņģa kairinājums, caureja, vemšana, slikta dūša) laktacidoze, B12 vitamīna deficīts	(Bailey, 1996)
Tiazolidīndioni	Pioglitazons	PPAR γ aktivācija	↓ Cirkulējošo taukskābju daudzumu, lipolīzi ↓ Insulīna rezistenci skeleta muskuļos un taukaudos	Paaugstināta kopējā un ZBL-holesterīna koncentrācija, hepatotoksicitāte, sirds mazspējas dekompensācija, svara pieaugums, urīnpūšļa vēža risks	(Cheng, 2005)
α -glikozidāzes inhibitori	Akarboze Miglitol	Inhibē α -glikozidāzi, kavē oglehidrātu šķelšanos un uzsūkšanos zarnās	↓ Glikozes uzsūkšanos tievajās zarnās ↓ Pēcēšanas hiperglikēmiju	Meteorisms, caureja, hipoglikēmija	(Cheng, 2005)
DPP-4 inhibitori	Sitagliptīns Vildagliptīns	↓ GLP-1 degradāciju, palielinot aktīvās formas cirkulācijas ilgumu	↓ Glikagona sekrēciju ↑ Insulīna produkciju ↑ Sāta sajūtu ↓ Svaru	Pankreatīta attīstība	(Dicembrini, 2011)

Savienojumu klase	Medikamenta nosaukums	Darbības mehānisms	Metabolisma efekti	Blakusefekti	Literatūras avots
Enerģijas modulatori	Mildronāts (meldonijs)	Enerģijas metabolisma regulācija	↓ L-karnitīna koncentrāciju un KPT I-atkarīgo taukskābju oksidāciju ↓ Asins glikozes koncentrāciju	Nav būtisku blakusparādību	(Dambrova, 2002, Liepinsh, 2009a)
	Trimetazidīns Ranolazīns	Enerģijas metabolisma regulācija	Inhibē 3-ketoacil koenzīma A tiolāzi un taukskābju β-oksīdāciju mitohondrijos ↓ Asins glikozes koncentrāciju	Nav būtisku blakusparādību	(Monti, 2006, Sossalla, 2012)

Latvijā labi pazīstamajam kardioprotektīvajam savienojumam mildronātam (3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija) propionātam) agrāk veiktos pētījumos parādīta glikozes metabolismu veicinoša aktivitāte (Liepinsh, 2008), kas tiek skaidrota ar mildronāta L-karnitīna biosintēzi inhibējošo efektu (Simkhovich, 1988). L-karnitīns ir nepieciešams kofaktors taukskābju metabolismā, kur tas piedalās garķēžu taukskābju transportēšanā cauri mitohondrija membrānai, tādējādi veicinot to oksidāciju (Rebouche, 1992). Mildronāts samazina L-karnitīna koncentrāciju organismā, kavējot tā transportu audos un reabsorbciju nierēs caur organisko katjonu transportproteīnu 2 (OKTN2), kā rezultātā izpaužas tā kardioprotektīvā un glikozes metabolismu regulējošā aktivitāte (Dambrova, 2002, Kuwajima, 1999). Papildus mildronāta kardioprotektīvajam un aterosklerozi samazinošajam efektam (Hayashi, 2000, Liepinsh, 2006, Sesti, 2006, Vilskersts, 2009a, Vilskersts, 2009b), parādīts, ka mildronāts samazina glikozes koncentrāciju un aizkavē endotēlija disfunkcijas un jušanas traucējumu attīstību Goto-Kakizaki žurkām (Liepinsh, 2009a). Vairākos pētījumos ir novērtēta mildronāta terapijas izraisītās karnitīna koncentrācijas samazināšanās ietekme uz taukskābju un glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu aktivitātes un proteīna daudzuma, kā arī gēnu ekspresijas izmaiņām (Degrace, 2007, Liepinsh, 2008). Mildronāta izsauktais karnitīna pazeminājums stimulēja ne tikai KPT IA un B, bet arī insulīna receptoru un PDH kompleksa pirmo divu enzīmu gēnu ekspresijas palielināšanos; vienlaicīgi tika novērota arī insulīna stimulētās glikozes uzņemšanas palielināšanās, kā arī GLUT4, heksokināzes

II (HK II) un insulīna receptoru (InsR) proteīna daudzuma pieaugums (Liepinsh, 2008). Tomēr precīzi molekulārie mehānismi un kodola faktori, kas saistīti ar mildronāta lietošanas izraisītiem metabolisma izmaiņu efektiem, līdz šim nav noskaidroti.

Turklāt nepieciešams noskaidrot, vai mildronāta lietošanas izraisītā karnitīna koncentrācijas samazināšanās varētu uzlabot rādītājus ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā, kā arī detalizēti izpētīt mildronāta molekulārās darbības mehānismus gan sirds audos, gan citās organisma šūnās.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

2.1. Klīniskā pētījuma dalībnieki

Pētījumā tika iekļauti 108 pacienti ar 1. tipa CD un 109 pacienti ar pierādītu 2. tipa CD, kuri no 2008. - 2010. gadam ārstējās Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas "Gaiļezers" Endokrinoloģijas nodaļā vai Ambulatorajā daļā. Kontroles grupā tika iekļauti 132 cilvēki bez CD. Pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju, un tā atbilstību bioētikas normām apstiprinājusi Centrālā medicīnas ētikas komiteja (2008. gada 27. jūnija lēmums A-11, skatīt 8.1. pielikumu). Visi pētījuma dalībnieki parakstījuši informētas piekrišanas formu. Izslēgšanas kritēriji bija: hroniska nieru mazspēja (GFĀ < 60 ml/min), hroniska aknu slimība, aktīvs iekaisuma process (leikocītu skaits > $8.5 \times 10^3/\text{mm}^3$, eritrocītu grimšanas ātrums > 20 mm/h, vai augstas jutības C-reaktīvā proteīna koncentrācija (hs-CRP) > 15 mg/l), anēmija, ļaundabīgs audzējs vai saslimšanas gadījums pēdējo 5 gadu laikā, alkohola atkarība, vai neiropātijas, kuru cēlonis nav diabēts. Pētījuma sākumā tika ievākta informācija par pētījuma dalībnieku vecumu, dzimumu, slimībām, vecumu diagnozes noteikšanas brīdī, medikamentozo terapiju, smēķēšanas statusu, alkohola lietošanas biežumu. Pētījuma dalībniekiem aprēķināja ķermeņa masas indeksu (KMI) un noteica diabēta vēlīnās komplikācijas. Diabēta pacientu atlase, vēlīno komplikāciju noteikšana un paraugu savākšana tika veikta sadarbībā ar Dr. med. Ilzi Konrādi.

Plūsmas citometrijas analīzes metodes izstrādei GLO1 ekspresija leikocītos tika noteikta 11 pacientiem ar pierādītu 1. un 2. tipa CD, kā arī 8 brīvprātīgajiem bez CD asins paraugos. Asins paraugi tika savākti etilēndiamīn-tetraetiķskābi (EDTA)-saturēšos stobriņos, un leikocītus izolēja, izmantojot eritrocītu lizēšanas metodi. Papildus GLO1 ekspresijas mērījumiem tika noteiktas plazmas glikozes (Cobas 6000, Roche Diagnostics, Vācija), asins HbA_{1C} (Primus Corporation, ASV) koncentrācijas un Glo1 aktivitāte asins paraugos.

Brīvā L-karnitīna koncentrācija tika noteikta 1. (n=93) un 2. (n=87) tipa CD pacientu, kā arī veselu indivīdu (n=122) asins paraugos. No pētījuma izslēdza mildronāta un L-karnitīna lietotājus, kā arī veģetāriešus.

2.2. Dzīvnieki

Eksperimentiem tika izmantoti pieauguši, 200 – 320 g smagi *Wistar* līnijas žurku tēviņi (Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Latvija), 6 nedēļas veci, 250 g smagi *Wistar* un *Goto-kakizaki* līnijas žurku tēviņi (Taconic Farms, ASV), 280-300 g smagi *Zucker fa/fa* un atbilstoša vecuma 190 g smagi *Zucker lean* (Charles River Laboratories, Francija) līnijas žurku tēviņi. Pirms eksperimenta sākuma dzīvnieki tika 2 nedēļas pieradināti vietējiem apstākļiem. Eksperimenta laikā dzīvnieki tika turēti standarta sprostos pa 5-6 vienā sprostā, standartizētos apstākļos (gaisa temperatūra 21-23°C, 12 stundu gaismas/tumsas cikls) ar neierobežotu pieeju ūdenim un barībai (R3 diēta, Lactamin AB, Zviedrija). Visas eksperimentālās procedūras tika veiktas saskaņā ar Eiropas Komisijas direktīvas 86/609/EEC vadlīnijām un tika saskaņotas ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi (skatīt 8.2. pielikumu).

Lai izvērtētu enerģijas metabolismu regulējošu savienojumu efektus un noteiktu mildronāta molekulārās darbības mehānismus, mildronātu (200 mg/kg), metformīnu (300 mg/kg) un abu vielu kombināciju vadīja perorāli (p.o.) *Zucker fa/fa* žurkām 4 nedēļas. Kontroles *Zucker fa/fa* un *Zucker lean* žurkām p.o. vadīja ūdeni. Eksperimenta laikā ēdušām un žurkām tukšā dūšā no astes vēnas asins paraugus savāca EDTA/diamīdu un proteāžu inhibitorus (fenilmetilsulfonilfluorīds (PMSF), pepstatīns, leipeptīns, aprotinīns) saturošos endorfos un centrifugēja. Iegūtā plazma tika sasaldēta un līdz analizēšanai uzglabāta -80°C temperatūrā. Eksperimenta beigās sirds un aknas tika skalotas ledus-aukstā PBS buferšķīdumā (2.6 mM KCl, 136 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ un 1.75 mM KH₂PO₄) un izmantotas imunoblota (*Western blot*) analīzei un lipīdu satura noteikšanai. Kvantitatīvajai reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijas (RT-PKĀR) analīzei 100 mg audu sasaldēja šķidrā slāpekļī un uzglabāja -80°C.

Ilgstošas fruktozes lietošanas izraisītu metabolisma traucējumu attīstībai *Wistar* līnijas žurkām tika dots 10% fruktozes šķīdums 8 nedēļas. Lai izvērtētu enerģijas metabolisma regulējoša savienojuma kardioprotektīvos efektus, *Wistar* žurkas pēc 4 nedēļu 10% fruktozes šķīduma lietošanas sadalīja 2 eksperimentālajās grupās, un mildronātu (200 mg/kg) vai ūdeni vadīja p.o. 4 nedēļas. *Wistar* līnijas žurkas, kas visu eksperimenta laiku fruktozes šķīduma vietā saņēma dzeramo ūdeni, tika izmantotas kā kontroles grupa.

Mildronāta kardioprotektīvā efekta molekulāro mehānismu pētījumiem, Wistar žurkām mildronātu (100 mg/kg) vadīja p.o. 14 dienas. Kontroles žurkām vadīja ūdeni. Eksperimenta beigās sirdis tika izņemtas, skalotas ledus-aukstā PBS buferšķīdumā un izmantotas mitohondriju izolēšanai, izolēta sirds infarkta veikšanai, imunoblota un gēnu ekspresijas analīzei.

Glioksalāžu enzīmu izmaiņu nozīmes izvērtēšanai *Zucker fa/fa* un *Zucker lean*, kā arī *Wistar* un *Goto-Kakizaki* līnijas žurku tēviņiem 8., 12., 16., 20. un 24. nedēļā no astes vēnas tika ņemti asins paraugi bioķīmisko parametru un glioksalāžu enzīmu aktivitātes noteikšanai. *Zucker lean* and *Wistar* žurkas izmantoja kā atbilstošas kontroles, lai novērtētu diabēta attīstību *Zucker fa/fa* un *Goto-Kakizaki* žurkām. Eksperimenta beigās galvas smadzeņu, muguras smadzeņu un sēžas nerva audu paraugus pēc savākšanas nekavējoties sasaldēja šķidrajā slāpekļī un uzglabāja -80°C Glo1 un Glo2 aktivitātes un gēnu ekspresijas izmaiņu noteikšanai.

2.3. Materiāli

S-D-laktoilglutations, 38% metilglioksāla šķīdums, reducētais glutations (GSH), vērša seruma albumīns (BSA), 4% formaldehīda šķīdums, EDTA, TRI reaģents, glikoze, PMSF, diamīds, pepstatīns, leipeptīns, aprotinīns, noradrenalīns un acetilholīns tika pirkti no firmas Sigma-Aldrich (Vācija). Na_2HPO_4 , NaCl, KCl, NaF, KH_2PO_4 , Tris·HCl, NH_4Cl , KHCO_3 , Triton X-100, CaCl_2 , MgSO_4 , NaHCO_3 , SDS, amonija persulfāts, NaN_3 , Igepal CA 630, D-fruktoze un metilēnzilais tika pirkti no Acros Organics (Beļģija). Akrilamīds, N,N,N',N'-tetrametiletilēndiamīns (TEMED), N, N'-metilēnbisakrilamīds tika iegādāts no Fluka Chemika (Šveice). Metanols tika pirktis no Merc (Vācija). 2,3,5-trifeniltetrazolija hlorīds tika iegādāts no Alfa Aesar (Vācija). Primārās monoklonālās antivielas pret peļu IgG_1 (izotipu kontrole) un ar fikoeritrīnu (PE)-konjugētas kazas $\text{F(ab}')_2$ pret peļu IgG otrējās antivielas tika iegādātas no R&D Systems (ASV). Primārās monoklonālās antivielas peļu anti-GLO1 tika pirktas no Abcam (ASV). Heparīns tika pirktis no Sandoz GmbH (Austrija). Meldonijs (3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija) propionāta dihidrāts, tekstā lietots ražotāja izmantotais nosaukums – mildronāts) tika iegūts no AS „Grindeks” (Latvija). Metformīna hidrohlorīds tika pirktis no firmas International Laboratory (ASV). Primārās poliklonālās trušu antivielas pret $\text{PPAR}\alpha$, $\text{PPAR}\gamma 1/\gamma 2$ un pret $\text{NF}\kappa\text{B}$ (p65) NLS tika iegādātas no Cayman Chemicals (ASV). Primārās poliklonālās trušu antivielas pret $\text{PGC}1\alpha$, P-AMPK, β -aktīnu, peļu

monoklonālās antivielas pret AMPK un sekundārās ar peroksidāzi-konjugētas kazas pret-trušu un pret-peļu IgG antivielas bija no Abcam (Lielbritānija). Primārās monoklonālās peļu antivielas pret TATA-saistošo proteīnu tika iegādātas no QED Bioscience (ASV).

2.4. Metodes

2.4.1. Bioķīmisko parametru mērījumi eksperimentālajos paraugos

Glikozes koncentrāciju asins paraugos noteica, izmantojot MediSense Optium glikometru un atbilstošas teststrēmeles. HbA_{1C} daudzumu noteica ar augstas izšķirtspējas šķidrums hromotogrāfiju (Primus Corporation, ASV) akreditētā diagnostikas laboratorijā. Plazmas insulīna koncentrāciju noteica ar radioimunoloģisku reaģentu komplektu atbilstoši ražotāja instrukcijām (Millipore, ASV). Diabēta un kontroles dzīvniekiem tika veikts glikozes tolerances tests. Glikozes šķīdumu ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ķermeņa svara) ievadīja i.p. un asins paraugos no astes vēnas noteica glikozes koncentrāciju 0 (tukšā dūšā) un pēc 5, 15, 30, 45, 60, 120 un 240 minūtēm.

Plazmas paraugus izmantoja brīvo taukskābju, triglicerīdu, glikozes un laktāta koncentrācijas mērījumiem ar Wako (Vācija), Instrumentation Laboratory (Itālija) un Roche (Vācija) noteikšanas reaģentu komplektiem atbilstoši ražotāju instrukcijām.

Lipīdu profila un glikogēna noteikšanai aknu un sirds audu gabaliņus homogenizēja ar ledus aukstu PBS buferšķīdumu, kas satur 1 % Igepal CA 630, masas tilpuma attiecībā 1:10, izmantojot Cole Parmer 130-Watt ultraskaņas homogenizatoru. Homogenātu centrifugēja 10 minūtes $6000 \times g$ un virsnogulšņu šķīdumu izmantoja brīvo taukskābju, triglicerīdu un glikogēna koncentrācijas noteikšanai sirds un aknu audos ar reaģentu komplektiem atbilstoši ražotāju instrukcijām.

2.4.2. Bioķīmisko parametru mērījumi klīniskajos paraugos

Venozās asins paraugus pētījuma dalībniekiem savāca no rīta tukšā dūšā. Plazmas kopējā holesterīna, ZBL-holesterīna un ABL-holesterīna un triglicerīdu daudzumu noteica ar komerciāli pieejamiem noteikšanas reaģentu komplektiem atbilstoši ražotāja instrukcijām akreditētā klīniskās slimnīcas laboratorijā. Plazmas glikozes koncentrāciju noteica, izmantojot heksokināzes metodi (Cobas 6000, Roche

Diagnostics, Vācija), HbA_{1c} koncentrāciju noteica ar augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfijas analīzes metodi (Primus Corporation, ASV), hs-CRP testus veica ar imunoturbidometrijas metodi (Cobas Integra 700, Roche Diagnostics, Vācija) un C-peptīda koncentrāciju noteica ar elektrohemiluminiscences metodi (ECLIA, Roche Diagnostics, Vācija).

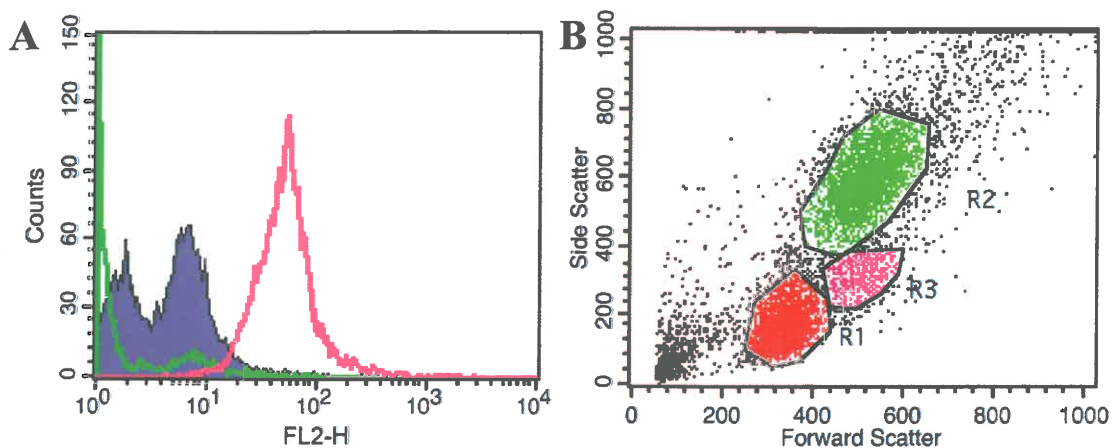
2.4.1. Leikocītu izolēšana ar eritrocītu lizēšanas metodi

Plūsmas citometrijas analīzei asins paraugus lizēja attiecībā 1:10 (tilp./tilp.) ar eritrocītu lizēšanas buferšķīdumu (168 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA, pH = 7.2) 10 minūtes istabas temperatūrā. Lizātus centrifugēja 380 x g, 5 min un nogulsnes (leikocītu frakcija) resuspendēja ledusaukstā 1% BSA fosfātu buferšķīdumā ar heparīnu. Izolētos leikocītus fiksēja 4% formaldehīda šķīdumā 10 min, un tad permeabilizēja 0.1 % Triton X-100 šķīdumā 30 min istabas temperatūrā.

2.4.2. Plūsmas citometrijas analīze

Leikocītus (~10⁶/100 µl) inkubēja 15 min ar vienu no sekojošām peļu primārām monoklonālajām antivielām (10 µg/ml) tumšā vietā istabas temperatūrā: pret GLO1 vai IgG₁ izotipu kontroli fona fluorescences noteikšanai. Pēc tam nesaistījušās antivielas noskaloja ar ledusaukstu sterilu PBS buferšķīdumu. Leikocītus 15 min inkubēja ar fikoeritrīnu (FE)-konjugētām kazas F(ab')₂ anti-peļu IgG otrējām antivielām (1 µg/ml) tumšā vietā istabas temperatūrā. Pēc tam šūnas tika skalotas tāpat kā iepriekš un resuspendētas 500 µl 1% BSA fosfātu buferšķīdumā plūsmas citometrijas analīzei.

Katram paraugam noteica šūnu sadalījumu pēc izmēra un granulocitātes, kā arī fluorescenci ar FACSCalibur aparātu (BD Biosciences, ASV). No katra parauga tika savākti dati par 10 000 šūnām (2.1.A. attēls). Datu iegūšana un analīze tika veikta ar CellQuest programnodrošinājumu (BD Biosciences, ASV). Leikocītu populācijas noteica pēc izmēra un granulocitātes sadalījuma punktu diagrammā (2.1.B. attēls), kā arī analizēja fluorescences intensitāti (MFI) iezīmētajās šūnās. Ekspresijas indekss (EI) GLO1 tika aprēķināts, ņemot vērā nespecifisko saistīšanos (NS), EI = (GLO1 % x MFI – NS % x MFI)/100.



2.1. att. Plūsmas citometrijas reprezentatīvā histogramma

Negatīvā kontrole (zaļa līnija), IgG₁ izotipa kontrole – fona fluorescences (pilna histogramma), GLO1 FE (rozā līnija) (A) un šūnu sadalījums pēc izmēra un granulocitātes: limfocīti – R1, neitrofīli – R2, monocīti – R3 (B)

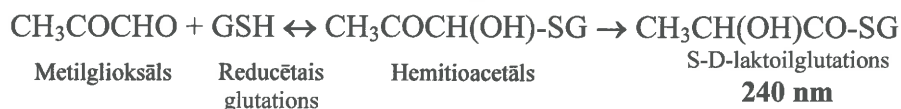
2.4.3. Asins lizātu sagatavošana glioksalāžu aktivitātes noteikšanai

Glioksalāžu enzīmu aktivitātes noteikšanai asins paraugus lizēja 10 minūtes ledusaukstā destilētā ūdenī attiecībā 1:40 (tilp./tilp.) +4°C temperatūrā. Lizātus centrifugēja 20000 x g, 10 minūtes, +4°C temperatūrā, un iegūtos virsnogulšņu šķīdumus izmantoja Glo1 un Glo2 aktivitātes spektrofotometriskai noteikšanai gan klīnikas, gan eksperimentālajos paraugos.

2.4.4. Glioksalāzes 1 aktivitātes noteikšana asins paraugos

Glo1 aktivitāti asins paraugos noteica, mērot absorbcijas pieaugumu 5 minūšu laikā pie 240 nm, no hemitioacetāla veidojoties S-D-laktoilglutacionam.

Glo1



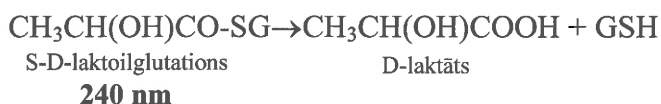
Lai nodrošinātu neenzimātisku hemitioacetāla veidošanos, 2 mM GSH ūdens šķīdumu un ekvimolāru metilglioksāla daudzumu inkubēja +37°C temperatūrā 15 minūtes. Reakcijas maisījuma sastāvs 96-lauciņu platītē: 20 μl parauga un 180 μl reagentu maisījuma (2 mM metilglioksāls, 2 mM GSH 50 mM Na₂HPO₄ buferšķīdumā pH = 6.6). Absorbcijas izmaiņas noteica, izmantojot μQuant™ daudzlauciņu platišu spektrofotometru (BioTek Instruments, ASV). Glo1 aktivitāte tika aprēķināta, izman-

tojot S-D-laktoilglutaciona standartlīkni, un izteikta kā μmol S-D-laktoilglutaciona, kas veidojušies 1 minūtes laikā 1 ml asins, standartizējot pret Hb daudzumu g (U/g Hb).

2.4.5. Glioksalāzes 2 aktivitātes noteikšana asins paraugos

Glo2 katalizē S-D-laktoilglutaciona hidrolīzi līdz GSH un D-laktātam. Tās aktivitāti asins paraugos noteica, mērot absorbcijas samazinājumu 5 minūšu laikā pie 240 nm.

Glo2



Reakcijas maisījuma sastāvs: 20 μl parauga un 180 μl reaģentu maisījuma (0.5 mM S-D-laktoilglutaciona 50 mM Tris-HCl buferšķīdumā pH = 7.4). Glo2 aktivitāte izteikta kā μmol S-D-laktoilglutaciona, kas hidrolizējušies 1 minūtes laikā 1 ml asins, standartizējot pret Hb daudzumu g (U/g Hb).

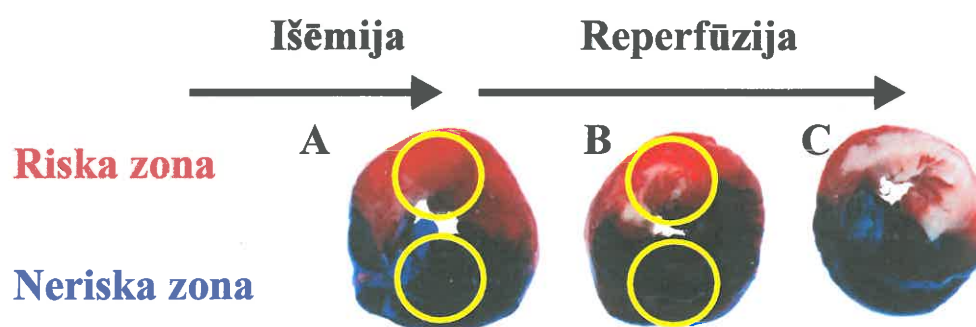
2.4.6. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes noteikšana audu homogenātos

Smadzeņu, muguras smadzeņu un sēžas nerva audu homogenātus sagatavoja atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Phillips, 1993) ar nelielām izmaiņām. Audus nosvēra (~50 mg), homogenizēja 500 μl ledus auksta 10 mM Na_2HPO_4 buferšķīduma (pH 7.4) un centrifugēja 20 000 x g, 10 min, +4°C. Glo1 un Glo2 aktivitāti noteica pēc centrifugācijas iegūtajā supernatantā atbilstoši enzīmu aktivitātes noteikšanas metodei. Reakcijas maisījums sastāvēja no 20 μl homogenāta (10-20 μg kopējā proteīna) un 180 μl reaģentu maisījuma. Kopējo proteīna daudzumu audu homogenātos noteica ar plaši lietotu kolorimetrisku (Lowry) metodi. Glioksalāžu enzīmu aktivitāte audu homogenātos tika izteikta kā μmol S-D-laktoilglutaciona, kas veidojušies vai hidrolizējušies 1 minūtes laikā, standartizējot pret proteīna daudzumu g (U/g proteīna).

2.4.7. Izolētas žurkas sirds infarkti

Izolētās žurku sirds infarktu eksperimentu veica saskaņā ar iepriekš aprakstītu procedūru (Liepinsh, 2006). Žurku sirdis izņēma, skaloja ar ledusaukstu Krebsa-Henselaita buferšķīdumu un kanulēja ADInstruments Langendorffa aparātā. Sirdis

20 minūtes adaptēja un tad, okludējot kreiso lejupejošo koronāro artēriju, izraisīja miokarda infarktu. Pēc 30 minūšu oklūzijas sekoja 120 minūšu ilga reperfūzija, kuras beigās sirds audus krāsoja ar metilēnzilā šķīdumu un 2,3,5-trifeniltetrazolija hlorīda šķīdumu, lai nodalītu riska zonu un tajā iezīmētu nekrotiskos un dzīvos audus (2.2. attēls). Sirds audu paraugi no neriska zonas (tumši zila) un riska zonas (sarkana) tika paņemti pēc 30 min išēmijas un 60 min reperfūzijas (2.2. attēlā attēloti ar dzelteniem apliem). Sirds audi pēc 120 min ilgas reperfūzijas tika izmantoti infarkta izmēra noteikšanai. Attēlu apstrādi veica, izmantojot Image-Pro Plus v6.3 programmu. Iegūtos rezultātus izmantoja infarkta lieluma noteikšanai, aprēķinot nekrozes lielumu pret kopējo riska zonas lielumu. Kontroles vērtības pieņēma kā 100 % un pārējos rezultātus attiecīgi pārrēķināja.



2.2. att. Sirds infarkta attīstība išēmijas-reperfūzijas laikā
Attēloti reprezentatīvi sirds griezumumi pēc 30 min išēmijas (A), 60 min reperfūzijas (B) un 120 min reperfūzijas (C).

Garķēžu taukskābju, gēnu mRNS daudzuma noteikšanai un imunoblota analīzei, kreiso lejupejošo koronāro artēriju okludēja 30 minūtes un išēmijas beigās vai pēc išēmijai sekojošas 60 minūšu ilgas reperfūzijas neriska zonu iekrāsoja ar 0,1% metilēnzilā šķīdumu (2.2. attēls). Sirds audus no neriska un riska zonas pēc atdalīšanas nekavējoties sasaldēja šķidrajā slāpekļī un uzglabāja -80°C temperatūrā.

2.4.8. Taukskābju oksidācija izolētā žurku sirdī

Radioiezīmētā palmitāta oksidāciju mērīja, izmantojot iepriekš aprakstītu metodi (Lopaschuk, 1997) ar nelielām izmaiņām. Palmitāta oksidāciju noteica, mērot $^3\text{H}_2\text{O}$ daudzumu, kas rodas no 9,10- ^3H palmitāta (specifiskā aktivitāte 60 Ci/mmol). $^3\text{H}_2\text{O}$ no 9,10- ^3H palmitāta atdalīja, samaisot 100 μl perfuzāta ar 500 μl hloroforma:metanola

attiecībā 1:2 (tilp./tilp.), 200 µl hloroforma un 200 µl 2M KCl/0.4M HCl. Tad paraugus centrifugēja 15 minūtes 1150 x g 4°C temperatūrā, lai maisījumu sadalītu polārajā un nepolārajā fāzē. 50 µl parauga no polārās fāzes sajauc ar scintilācijas šķīdumu un izmantoja radioaktivitātes mērījumiem ar šķidrums scintilācijas un luminescences skaitītāju MicroBeta Trilux (WALLAC). Palmitāta oksidācijas ātrums tika izteikts kā 9,10-[³H]palmitāta daudzums, kas oksidējas līdz ³H₂O 1 min laikā.

2.4.9. Peroksisomālā taukskābju oksidācija

Peroksisomas izolēja atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Harrison, 1988) no sirds audu riska un neriska zonas pēc 30 minūšu sirds kreisās lejupejošās koronārās artērijas oklūzijas. Palmitāta oksidācijas ātrumu peroksisomās noteica saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Degrace, 2004) ar nelielām izmaiņām. Peroksisomālo taukskābju oksidācijas ātruma noteikšanai izmantoja 9,10-[³H]palmitātu reakcijas maisījumā. Reakcijas maisījums saturēja 30 mM KCl, 75mM Tris-HCl, 10mM KH₂PO₄, 0.1mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM NAD, 5 mM ATF un 100 µM CoA. Lai inhibētu iespējamo mitohondriālo β-oksidāciju, paraugus preinkubēja 10 min ar 75 µM antimicīnu, 10 µM rotenonu un 250 µM KCN. Pēc 10 minūšu inkubācijas ar 120 µM palmitātu 37°C temperatūrā paraugus taukskābju oksidācijas noteikšanai sagatavoja un analizēja, tāpat kā izolētos žurku sirds audos.

2.4.10. Mitohondriju un sirds muskuļa šķiedru skābekļa patēriņa mērījumi

Skābekļa patēriņa mērījumiem mitohondrijus izolēja no *Wistar* žurku sirds audiem saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Kuka, 2012). Lai noteiktu KPT I-neatkarīgo garķēžu taukskābju oksidāciju, mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumus veica 37°C temperatūrā buferšķīdumā (150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM TRIS-HCl, 5 mM KH₂PO₄, pH = 7,2) ar 36 µM palmitoil-karnitīnu, izmantojot polarogrāfisko elektrodu (Microelectrodes Inc., Bedforda, ASV). Mitohondriālā proteīna daudzuma standartizēšanai noteica citrātsintāzes aktivitāti saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Srere, 1963).

Mitohondriju funkcionalitātes novērtēšanai pēc 30 minūšu oklūzijas, sirds kambara muskuļa šķiedras kūlīšus izolēja no sirds audu riska un neriska zonas un permeabilizēja saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Kuka, 2012). Sirds muskuļa

šķiedru ADF-stimulētā skābekļa patēriņa ātrumu noteica, izmantojot 6 mM piruvātu ar 6 mM malātu vai 10 mM sukcinātu kā substrātus.

2.4.11. Citosola un kodolu ekstraktu imunoblota analīze

PPAR α , PPAR γ un citu taukskābju metabolismā iesaistīto regulējošo faktoru daudzuma noteikšanai sirds un aknu paraugus homogenizēja ar ledus aukstu homogenizācijas buferšķīdumu (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM glicerola 3-fosfāts, 1 mM NaF, pH 7.4), kas satur proteāžu inhibitorus (10 μ M leipeptīna, 1 μ M pepstatīna, 1 μ M aprotinīna un 100 μ M PMSF), masas tilpuma attiecībā 1:10, izmantojot Ultra-Turrax[®] homogenizatoru (IKA, Vācija). Citosola ekstraktus imunoblota analīzei, kā arī taukskābju noteikšanai ieguva, homogenātu centrifugējot 6000 x g, 10 min, +4°C temperatūrā. Kodolu attīrīšana tika veikta, izmantojot metodi, ko iepriekš aprakstījis Williams (Williams, 2000). Homogenātu filtrēja caur 100 un 40 μ m izmēra neilona sietiņiem un filtrātu centrifugēja 1500 x g, 10 min, +4°C temperatūrā. Kodolu nogulsnes tika divreiz skalotas un resuspendētas ar aukstu homogenizācijas buferšķīdumu.

Kodolu un citosola ekstraktu imunoblota analīzei 50 μ g proteīnu sadalīja ar gela elektroforēzes aparātu (Owl P81, Thermo Scientific, ASV), izmantojot proteīnus denaturējošu SDS un poliakrilamīda gelu (7 vai 10% akrilamīds (atkarībā no nosakāmā proteīna molekulsvara), 1.5 M Tris-HCl, 0.1% SDS, 3% amonija persulfāts, 0.05% TEMED). Elektroforēzes buferšķīdums sastāvēja no 25 mM Tris bāzes, 192 mM glicīna un 0.1% SDS. Elektroforēzes apstākļi bija 100 V, 1,5 h. No gela uz poli-vinilidēndifluorīda (PVDF) membrānu (Imobilon-P membrāna, Merck Millipore, ASV) proteīnu pārnese veica ar elektroforēzes palīdzību, izmantojot pussauso pārnese metodi (elektroforēzes katoda buferšķīdums: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicīna un 10% metanola). Elektroforēzes apstākļi bija 180 mA, 20 min. Pēc pārnese membrānas noskaloja PBS buferšķīdumā un, lai novērstu antivielu nespecifisku saistīšanos, inkubēja 1h 4% BSA fosfātu buferšķīdumā istabas temperatūrā. Pēc tam membrānas inkubēja 1h istabas temperatūrā ar primārajām trušu poliklonālām antivielām pret PPAR α , PPAR γ 1/ γ 2, PGC1 α , P-AMPK alfa1/2 (1 μ g/ml, Abcam, Lielbritānija), NF κ B (p65) NLS (1 μ g/ml, Cayman chemical, ASV), peļu monoklonālajām antivielām pret AMPK alfa1/2 (1 μ g/ml, Abcam, Lielbritānija) vai antivielām pret β -aktīnu (1:5000, Abcam, Lielbritānija) un TATA-saistošo proteīnu (1:1000, QED Bioscience, ASV).

Membrānas trīs reizes pa 10 minūtēm skaloja ar PBS buferšķīdumu, kas satur 0.05% Tween 20. Tad tās 30 minūtes inkubēja istabas temperatūrā atbilstošām sekundārajām antivielām, kas konjugētas ar peroksidāzi (1:50000, Abcam, Lielbritānija). Pēc tam membrānas skaloja PBS buferšķīdumā tāpat kā iepriekš. Imunoblota vizualizācijai izmantoja hemiluminescences reaģentus (Merck Millipore, ASV), kas sajaukti tilpuma attiecībā 1:1 tieši pirms membrānu apstrādes. Gaismas emisija tika noteikta, eksponējot membrānas uz gaismas jutīgas filmas (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Limited, Lielbritānija). Atkarībā no signāla intensitātes ekspozīcijas laiks bija no 10 s līdz 5 min. Pēc tam filma tika attīstīta, izmantojot attīstītāju (X-Omat EX 4, Kodak, ASV) un fiksāžu (RPX-Omat LO, Kodak, ASV). Iegūtie attēli tika ieskenēti un signāla intensitāte analizēta ar datorprogrammu Gel-Pro Analyzer 6.0 (Media Cybernetics, ASV).

2.4.12. Taukskābju daudzuma noteikšana ar GHMS metodi

Brīvo taukskābju daudzumu noteica, analizējot taukskābju metilēsterus ar gāzu hromatogrāfijas masspektrometrijas metodi (GHMS). 500 µl sirds audu homogenāta endorfā mēģenēs centrifugēja 40 minūtes 100000 x g 4°C temperatūrā un supernatantu liofilizēja (Labconco corporation, ASV). Liofilizēto paraugu izšķīdināja 200 µl 0,2 % NaOH un pievienoja 800 µl acetonitrila:metanola maisījuma attiecībā 3:1 (tilp./tilp.) parauga deproteinizēšanai. Paraugus centrifugēja 10 minūtes 20000 x g 4°C temperatūrā, iegūto supernatantu pārlēja skrūvējamās stikla mēģenēs un liofilizēja. Metilēšanas reakciju veica ar HCl šķīdumu metanolā, iegūto metilesteru heksāna ekstraktus analizēja ar GHMS metodi izvēlētu jonu monitoringa režīmā. GHMS analīzi veica, izmantojot Agilent 6890N (Agilent Technologies, ASV) gāzu hromatogrāfu ar masas selektīvo detektoru un kapilāro kolonnu HP-5MS (Agilent Technologies, ASV). Taukskābju daudzuma noteikšana tika veikta sadarbībā ar Dr. chem. O. Pugoviču un Dr. chem. S. Grīnbergu (Latvijas Organiskās sintēzes institūts).

2.4.13. mRNS izolēšana un kvantitatīva RT-PKĀR analīze

Audus gēnu ekspresijas noteikšanai pēc savākšanas nekavējoties sasaldēja šķidrā slāpekļī un uzglabāja -80°C temperatūrā. Kopējo mRNS no audiem (sirds, aknas, smadzeņu, muguras smadzeņu vai sēžas nerva) izolēja, izmantojot TRI reaģentu

(Sigma, ASV) atbilstoši ražotāja instrukcijām. Izolētajam mRNS spektrometriski noteica daudzumu un kvalitāti, atšķaidot paraugus 1:20 (10 µl paraugs un 190 µl ūdens) un mērot absorbciju pie 230 nm, 260 nm un 280 nm. Paraugus atšķaidīja ar ūdeni, lai mRNS koncentrācija būtu 0.5 µg/ml, un sintezēja pirmās ķēdes komplementāro DNS (kDNS), izmantojot High Capacity cDNA Reverse Transcription reaģentu komplektu (Applied BiosystemsTM, ASV). Eendorfa mēģenē 10 µl reaģentu maisījumam, kas sastāvēja no 2 µl 10xRT buferšķīduma, 0.8 µl 25x dNTP MIX, 2 µl 10x RT Random Primers, 1 µl RNāzes inhibitora, 1 µl MultiScribeTM reversās transkriptāzes un 3.2 µl nukleāžu brīva ūdens, pievienoja 10 µl parauga. Paraugus inkubēja termostatā 10 minūtes 25°C temperatūrā, pēc tam 120 minūtes 37°C temperatūrā. kDNS sintēzes reakcija tika apstādināta, karsējot paraugus 5 minūtes 85°C temperatūrā. Paraugus atšķaidīja tilpumu attiecībā 1:10 (20 µl kDNS un 180 µl ūdens), samaisīja un šo maisījumu izmantoja gēnu ekspresijas izmaiņu noteikšanai.

Kvantitatīvā RT-PĶR analīze tika izmantota sekojošu gēnu ekspresijas noteikšanai: HK II, InsR, GLUT4, GLUT1, karnitīna palmitoiltransferāzes 1, muskuļu izoformas (mKPT I), acil-koenzīma-A (acil-CoA) oksidāzes 1 (ACOX), ACSL, lektīnam - līdzīga oksidētu zema blīvuma lipoproteīnu (ZBL) receptora 1 (LOX1), lipoproteīnu lipāzes (LPL), peroksisomālā membrānu proteīna (PEX13), FABP, PDK4, GLO1, GLO2, kā arī β-aktīna kā kontrole. Reaģentu maisījums RT-PĶR analīzei sastāvēja no 10 µl SYBR Green master Mix, 6 µl nukleāžu brīva ūdens, 2 µl atbilstošu praimeru maisījuma (R+F) un 2 µl uzsintezētā kDNS parauga. RT-PĶR reakcijas veica Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System aparātā atbilstoši ražotāju protokoliem un instrukcijām.

2.4.14. Diabēta pacientu vēlino komplikāciju novērtēšana

Sāpīgas diabētiskās neiropatiju klīniskās formas attīstību noteica atbilstoši pēc Young et al. aprakstītas metodes, lietojot neiropatiskās disfunkcijas skalu (NDS), kas iekļauj Ahileja cīpslas refleksa, vibrācijas, jutības, sāpju uztveres un temperatūras sliekšņa noteikšanu abām kājām, kā arī neiropatisko simptomu skalu (NSS), kas ietver jautājumus par simptomu lokalizāciju, kvalitāti, saasināšanos naktī vai uzlabošanos, veicot fiziskas aktivitātes (Young, 1993). NSS testa rezultāts ar 4 vai vairāk punktiem tika uzskatīts par patoloģiju un noteikta sāpīgas diabētiskās neiropatijas diagnoze. Papildus veica neirometrisku selektīvu sensorisko nervu vadīšanas sliekšņa novērtēšanu,

nosakot nesāpīgu strāvas uztveres sliekšni (SUS). SUS mērījumus veica, lietojot neirometra elektrodu radītus maiņstrāvas sinusoīdveida viļņu stimulus 5, 250, un 2,000 Hz frekvencēs (Neurotron Inc., Baltimora, ASV). Perifērā neiro-pātija tika diagnosticēta, ja vismaz divos no trim testiem (NSS, NDS un SUS) bija pārsniegta pieļaujamo punktu norma.

2.4.15. Eksperimentālo diabēta dzīvnieku vēlino komplikāciju novērtēšana

2.4.15.1. Mehāniski un termiski izraisīto sāpju sajūtu testi

Termiski izraisītu sāpju sajūtas tests (anļu val. *tail flick test*) tika veikts, izmantojot speciālu aparātu (Model DS20, Ugo Basile, Itālija) atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Liepinsh, 2009a). Šajā testā nosaka sāpju sliekšni, reģistrējot latentā perioda ilgumu līdz brīdim, kad dzīvnieks, sajūtot infrasarkanā lāzera karstuma radītās sāpes, pakustina asti vai maina pozu. Lai neradītu audu bojājumus, eksperimentu laiks nav ilgāks par 20 sekundēm.

Mehāniski izraisītu sāpju sajūtas (angļu val. *paw pressure test*) izmaiņas noteica ar speciālu aparātu (Ugo Basile, Itālija). Labajai un kreisajai pakaļējai ķepai, izmantojot spēka radītu spiedienu (g), noteica maksimālo sāpju sliekšni, kad dzīvnieks sajūt sāpes un izrauj ķepu. Katram dzīvniekam tests tika atkārtots piecas reizes, ievērojot 5 min intervālu, un tika aprēķinātas vidējās vērtības.

2.4.15.2. Darbības (īslaicīgās) atmiņas novērtēšanas tests

Y veida labirinta tests tika izmantots, lai novērtētu darbības atmiņu *Zucker*, *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurkām (Yamada, 1999). Tests tiek veikts, izmantojot melnu, krāsotu koka Y formas telpisku un simetriski izveidotu labirintu ar trim ejām (ejas garums: 40 cm, platums: 11 cm, augstums: 28 cm). Žurku ievietoja vienā no labirinta ejas sākuma daļām un novēroja 5 min, reģistrējot ieiešanas skaitu un secību ejās. Pareizi izvēlēta ejas maiņa tika definēta un aprēķināta procentuāli, kā secīga ieiešana visās trīs ejās bez atkārtšanās: $(\text{pareizi izvēlētais eju skaits}) / (\text{kopējais ieiešanas skaits ejās} - 2) * 100\%$.

2.4.15.3. Endotēlija disfunkcijas noteikšana izolētās aortās

Zucker fa/fa, *Zucker lean*, *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurku aortu endotēlija atkarīgo funkciju noteica atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Bartus, 2008). No anestezētām žurkām tika izgriezta krūšu aorta un ievietota ledusaukstā Krebsa-Henselaita (K-H) (118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1.18 mM KH₂PO₄, 11 mM glikoze) buferšķīdumā. Pēc apkārtējo audu atdalīšanas no aortas, to sagrieza 3 mm garos riņķīšos; katrs riņķītis tika ievietots atsevišķā orgānu vanniņā un, izmantojot nerūsējošā tērauda stieplītes, piestiprināts izometriskajam spēka sensoram. Aortas inkubēja 37°C temperatūrā K-H šķīdumā, kas piesātināts ar 95 % O₂ + 5 % CO₂. Mērījumus reģistrēja, izmantojot Chart 6 programmu un PowerLab 8/30 datu reģistrācijas sistēmu. Pasīvais spriegums tika uzstādīts uz 20 mN. Pēc 30 min perioda līdzsvara iegūšanai, aortu maksimālo kontrakciju noteica ar 80 mM KCl. Tad aortu riņķīši tika kontrahēti ar noradrenālīnu 60 līdz 80% no maksimālās kontrakcijas līmeņa un endotēlija funkciju noteica, pievienojot acetilholīnu 10⁻¹⁰–10⁻⁵M koncentrācijās.

2.5. Datu statistiskā apstrāde

Kvantitatīvie mainīgie attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības ± vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda (SEM) vai kā mediānas (starpkvartīļu intervāli), ja dati neatbilda normālajam sadalījumam. Kvalitatīvie mainīgie raksturoti kā skaits (n) un procentuālā proporcija (%). Grupų salīdzināšanai izmantoja atbilstošu analīzes metodi ar sekojošu pēctestu (Stjudenta t-tests, Manna-Vitnija, Dunnetta vai Bonferoni tests) rezultātu ticamība pārbaudei, kas norādīts pie rezultātu apkopojuma tabulās vai grafikos. Kvalitatīvus mainīgos analizēja, izmantojot hī kvadrāta (χ^2) un Fišera testu. Rezultātus uzskatīja par ticamiem, ja p vērtība bija mazāka par 0.05. Divu pazīmju saistības analīzei izmantoja Pīrsona parametrisko korelāciju vai Spīrmana korelāciju analīzi. Multivariantā lineārā regresijas analīze tika lietota, lai noteiktu sāpīgas DN risku un Glo1 aktivitātes saistību, ņemot vērā mainīgos, kas statistiski ticami atšķīrās starp pacientu grupām ar sāpīgu DN un neiropātiju bez sāpēm. Iegūtā ExpB vērtība raksturo koriģēto atkarīgā faktora relatīvo risku.

Datu apkopošanā un statistiskajā analīzē izmantoja Microsoft Excel 2003, GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software Inc., ASV) un SPSS 19.0 (SPSS, Chicago, IL, ASV) programmnodrošinājumu.

3. REZULTĀTI

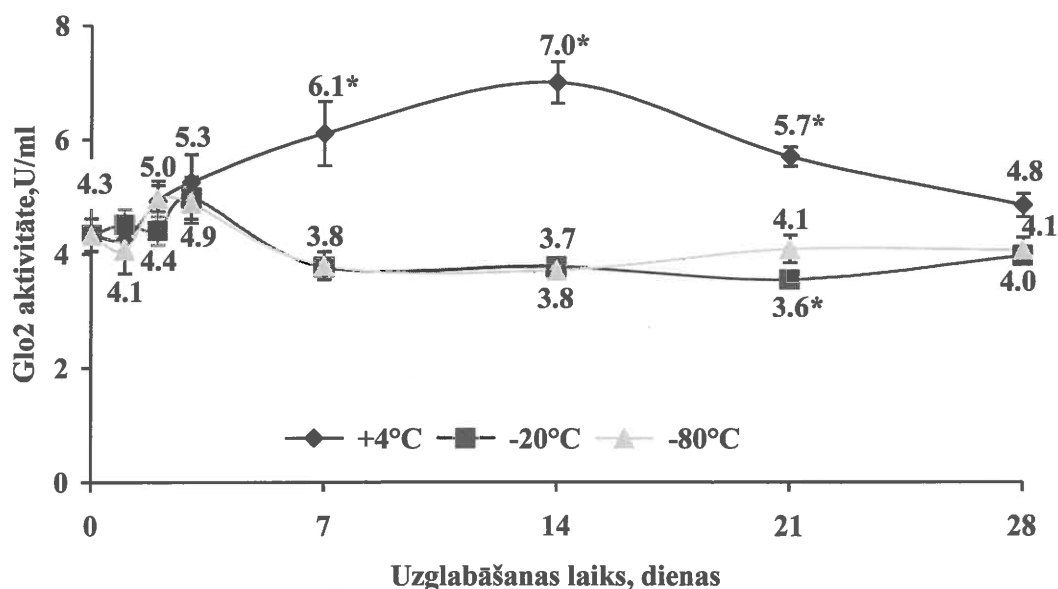
3.1. Glioksalāžu aizsargsistēmas nozīme diabēta vēlīno komplikāciju attīstībā

3.1.1. Glioksalāzes enzīmu sistēmas mērīšanas metožu izstrāde

3.1.1.1. Glioksalāzes 2 aktivitātes noteikšana asins un audu paraugos

Lai pielāgotu S-D-laktoilglutaciona optimālo koncentrāciju reakcijas norisei 96-lauciņu platītē, tika noteikta enzīma katalizētās reakcijas ātruma atkarība no substrāta daudzuma. Cilvēku asins lizātam tika pievienots reakcijas maisījums ar dažādām S-D-laktoilglutaciona koncentrācijām (0, 50, 100, 200, 500 un 1000 μM). Kā optimālā S-D-laktoilglutaciona koncentrācija tika izvēlēta 500 μM , jo pie šādas substrāta koncentrācijas enzīma katalizētās reakcijas ātrums bija $3.9 \pm 0.8 \mu\text{mol/min}$, kas ļāva nodrošināt tehniski precīzu un atkārtojamu eksperimenta norisi.

Lai standartizētu asins paraugu savākšanu un uzglabāšanu, 6 praktiski veseliem brīvprātīgajiem venozo asins paraugos 2 stundu laikā pēc to savākšanas tika noteikta Glo2 aktivitāte. Eksperimenta sākumā vidējā Glo2 aktivitāte asins paraugos bija $4,3 \pm 0,7 \text{ U/ml}$. Katra pētījuma dalībnieka asins paraugu alikvotēja un līdz 4 nedēļām uzglabāja $+4^\circ\text{C}$, -20°C un -80°C temperatūrā, nosakot Glo2 aktivitāti, attiecīgi, pēc 1 dienas, 2, 3, 7, 14, 21 un 28 dienām. Kā redzams 3.1. attēlā, pēc 3 dienām, uzglabājot paraugus $+4^\circ\text{C}$, -20°C , -80°C , tika konstatētas tikai nenozīmīgas enzīma aktivitātes izmaiņas. Interesanti, ka paraugus uzglabājot $+4^\circ\text{C}$ temperatūrā, tika novērots enzīma aktivitātes pieaugums, kas statistiski ticams bija līdz 3. nedēļai, sākot ar septīto uzglabāšanas dienu (3.1. attēls).



3.1. att. Glabāšanas temperatūras ietekme uz Glo2 aktivitāti cilvēku asins paraugos

Attēloti vidējie rezultāti \pm SEM (n=6). *p<0,05 salīdzinājumā ar aktivitāti eksperimenta sākumā „0” dienā

Būtiskākais +4°C temperatūrā uzglabāto paraugu aktivitātes pieaugums tika konstatēts 2. nedēļā, enzīma aktivitātei statistiski ticami palielinoties par 61% (7 ± 1 U/ml), bet eksperimenta beigās enzīma aktivitāte tomēr samazinājās līdz sākotnējam līmenim. Savukārt paraugos, kuri tika uzglabāti sasaldēti -20°C un -80°C temperatūrā, enzīma aktivitāte pēc divām nedēļām samazinājās par 13%, taču statistiski ticamu samazinājumu novēroja tikai 3. nedēļā, uzglabājot paraugus -20°C. Eksperimenta beigās paraugos, kas uzglabāti -20°C un -80°C, Glo2 aktivitāte samazinājās attiecīgi par 9% un 6%, tomēr šis enzīma aktivitātes samazinājums nebija statistiski ticams (3.1. attēls). Tālākajiem enzīmu aktivitātes mērījumiem tika noteikts, ka paraugu analīzes jāveic trīs dienu laikā pēc to ņemšanas.

3.1.1.2. Glioksalāzes 1 enzīma ekspresijas noteikšana leukocītos

GLO1 proteīna ekspresijas noteikšanas metodes izstrādei ar plūsmas citometrijas metodi, 19 brīvprātīgajiem: 5 pacientiem ar 1. tipa CD, 6 pacientiem ar 2. tipa CD un 8 līdzīga vecuma veseliem brīvprātīgajiem kā kontroles grupai tika noteikta asins Glo1 aktivitāte, kā arī GLO1 proteīna ekspresija izolētos leukocītos. Vidējais 1. un 2. tipa CD

stāžs bija attiecīgi 9 ± 9 un 7 ± 5 gadi. Diabēta pacientu un kontroles grupas klīniskais raksturojums un leukocītu analīzes dati apkopoti 3.1. tabulā.

Vidējā Glo1 aktivitāte kontroles grupas asins paraugos bija 61 ± 8 U/g Hb. Salīdzinot ar kontroles grupu, diabēta pacientu asins paraugos Glo1 aktivitāte bija paaugstināta. Tikai 2. tipa CD pacientiem Glo1 aktivitāte asinīs bija statistiski ticami augstāka par 20 % (3.1. tabula).

Plūsmas citometrijas reprezentatīvā histogramma attēlo negatīvās kontroles fluorescences intensitāti (nekrāsotas fiksētas un permeabilizētas šūnas), peļu IgG₁ izotipu kontroli un GLO1 FE pozitīvu paraugu (2.1.A. attēls). Plūsmas citometrijas analīze parādīja, ka vidēji vairāk kā 80% izolēto leukocītu krāsojas GLO1 pozitīvi visās pētījuma grupās. GLO1 ekspresijas indekss nebija izmainīts CD pacientiem, lai gan tika novērots neliels paaugstinājums (3.1. tabula).

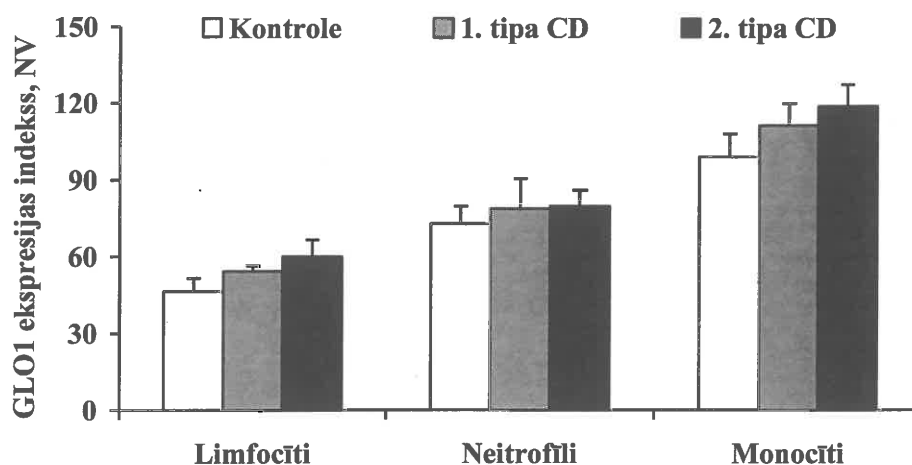
3.1. tabula

Cukura diabēta pacientu un kontroles grupas klīniskais raksturojums un leukocītu analīze

	Kontrole	1. tipa CD	2. tipa CD
Skaitis	8	5	6
Vecums, gadi	53 ± 14	38 ± 16	59 ± 8
Glikoze, mM	5.8 ± 0.4	$11.5 \pm 1.8^*$	$8.8 \pm 1.6^*$
HbA _{1c} , %	5.1 ± 0.4	$9.2 \pm 1.7^*$	$8.1 \pm 0.7^*$
Asins Glo1 aktivitāte, U/g Hb	61 ± 8	63 ± 12	72 ± 12
GLO1 pozitīvi leukocīti, %	82 ± 4	81 ± 8	83 ± 6
GLO1 ekspresijas indekss leukocītos, NV	71 ± 21	73 ± 14	78 ± 21

Attēloti vidējie rezultāti \pm SD. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta *t* tests, $p < 0,05$)

Izmantojot šūnu sadalījumu pēc izmēra un granulocitātes (2.1.B. attēls), tika analizēta fluorescences intensitāte un aprēķināts ekspresijas indekss limfocītu, monocītu un neitrofilu populācijās.



3.2. att. GLO1 ekspresijas indekss kontroles grupas un 1. un 2. tipa CD pacientu leikocītu populācijās
Attēloti vidējie rezultāti \pm SEM

Kā redzams 3.2. attēlā, visās pētījuma grupās ekspresijas indekss GLO1 pozitīvos monocītos bija attiecīgi 2 un 1,5 reizes augstāks kā limfocītos un neitrofilos. Statistiski ticamas GLO1 ekspresijas indeksa atšķirības leikocītu populācijās starp pētījuma grupām netika novērotas.

3.1.2. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar sāpīgu neiropatijas attīstību

3.1.2.1. Pētījuma dalībnieku demogrāfiskie un klīniskie rādītāji

Pētījuma dalībnieku demogrāfiskais un klīniskais raksturojums apkopots 3.2. tabulā. Kā redzams tabulā, salīdzinot ar 1. tipa CD pacientiem, 2. tipa CD pacientiem bija statistiski ticami augstāks \checkmark MI, augstāka triglicerīdu un C-peptīda koncentrācija plazmā, tie bija vecāki, smēķēja mazāk, kā arī biežāk lietoja antihipertensīvos medikamentus (3.2. tabula).

Cukura diabēta pacientu un kontroles grupas demogrāfiskais un klīniskais raksturojums

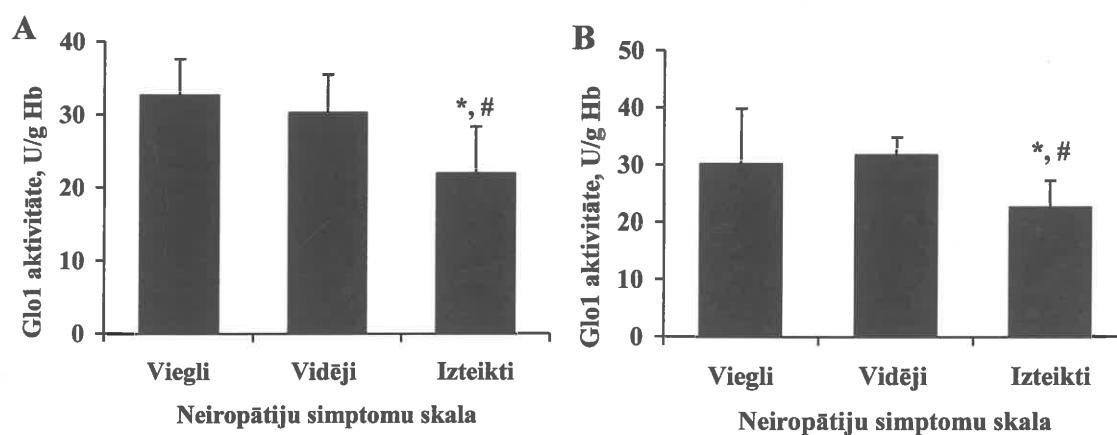
Noteiktie parametri	Kontrole	1. tipa CD	2. tipa CD
Skaitis, n	132	108	109
Vecums, gadi	42.0 (33.0-52.8)	34.5 (27.0-50.0)	58.0 (51.5-64.0)
Vīriešu dzimums, n (%)	50 (38)	52 (48)	44 (40)
Diabēta stāžs, gadi	-	11.0 (6.0-21.0)	7.0 (4.0-13.8)
Plazmas glikoze, mM	5.0 (4.7-5.4)	8.6 (6.6-11.6)	7.8 (6.9-9.6)
HbA _{1c} , %	5.1 (4.9-5.3)	8.6 (7.7-10.3)	7.9 (7.2-9.9)
ĶMI, kg/m ²	24.9 (23.1-28.7)	24.7 (22.4-27.0)	31.6 (28.4-36.1)
hs-CRP, mg/l	0.9 (0.5-1.7)	2.2 (1.2-3.3)	2.0 (1.1-3.7)
Kopējais holesterīns, mM	5.4 (4.8-6.1)	5.5 (4.6-6.1)	5.8 (5.1-6.4)
Triglicerīdi, mM	1.2 (0.8-1.8)	1.1 (0.9-1.8)	2.1 (1.6-3.2)
ABL-holesterīns, mM	1.4 (1.2-1.9)	1.5 (1.3-2.0)	1.3 (1.0-1.6)
ZBL-holesterīns, mM	3.7 (3.0-4.3)	3.4 (2.6-3.9)	3.4 (2.8-4.2)
C-peptīds, ng/ml	2.1 (1.7-3.2)	0.4 (0.2-0.5)	2.8 (1.8-4.1)
Asins Glo1 aktivitāte, U/g Hb	28.5 (25.7-32.8)	31.2 (26.6-36.9)	31.9 (26.0-38.4)
Asins Glo2 aktivitāte, U/g Hb ^a	22.0 (18.7-24.2)	21.5 (19.0-23.7)	22.0 (18.0-27.0)
Smēķēšana, n (%)	27 (21)	46 (43)	27 (25)
Alkohola lietošana (≥ 1 reizi/nedēļā), n (%)	28 (22)	12 (11)	6 (6)
Statīni, n (%)	13 (10)	29 (27)	63 (58)
AKE-inhibitori/AT1 receptoru antagonisti, n (%)	21 (17)	53 (50)	86 (79)

Rezultāti attēloti kā mediānas (starpkvartīļu intervāls) vai skaits (%).^aGlo2 aktivitāte noteikta 18 kontroles indivīdiem, 36 – 1. tipa CD un 37 – 2. tipa pētījumā iesaistītiem CD pacientiem.

Vidējā Glo1 aktivitāte 1. un 2 tipa CD pacientu asins paraugos bija attiecīgi 31.2 (26.6-36.9) un 31.9 (26.0-38.4) U/g Hb. Glo1 aktivitāte veselu brīvprātīgo asins paraugos bija 28.5 (25.7-32.8) U/g Hb un ticami atšķīrās no CD pacientiem.

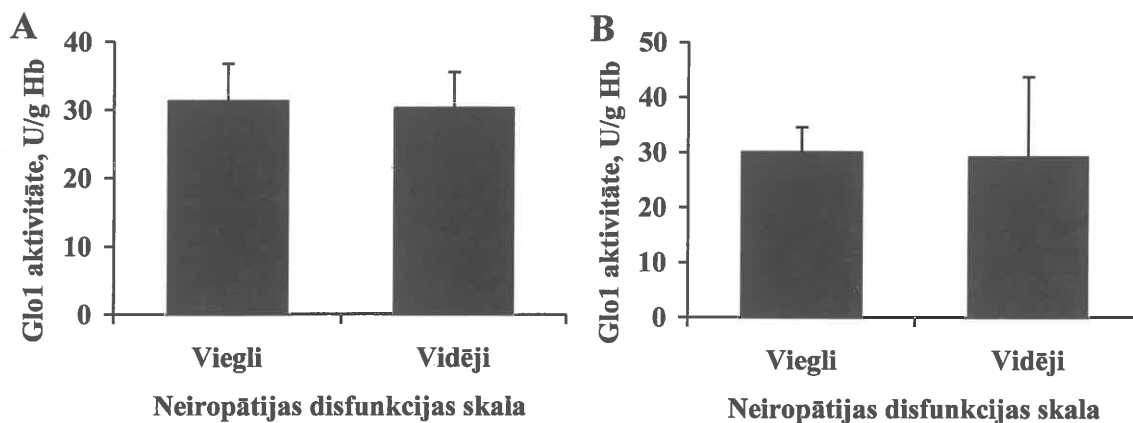
3.1.2.2. Glo1 aktivitātes saistība ar klīniskajiem parametriem un neiropātiju simptomu attīstības pakāpi

Pētījuma datu korelāciju analīze liecina, ka asins lizāta Glo1 aktivitāte negatīvi korelē ar diabēta stāžu ($r = -0.261, p = 0.007$) 1. tipa cukura diabēta pacientiem. Glo1 aktivitāte bija statistiski samazināta pacientiem ar izteiktiem sāpīgas neiropātijas simptomiem, salīdzinot ar vidējiem vai viegli izteiktiem neiropātijas simptomiem, gan 1. tipa, gan 2. tipa cukura diabēta pacientiem (3.3. attēls). Glo1 aktivitāte pacientiem ar viegli un vidēji izteiktu NDS nebija atšķirīga (3.4. attēls).



3.3. att. Glo1 aktivitātes saistība ar neiropātijas simptomu smaguma pakāpi (A) 1. tipa ($n = 88$) un (B) 2. tipa ($n = 74$) cukura diabēta pacientiem

NSS skalas iedalījums: viegli (1-4), vidēji (4-5) un izteikti (7-9) simptomi. Rezultāti attēloti kā mediānas \pm starpkvartīļu intervāls. *Statistiski ticami atšķiras no pacientu grupas ar vidēji izteiktiem neiropātijas simptomiem (Dunna tests, $p < 0,05$). #Statistiski ticami atšķiras no pacientu grupas ar viegli izteiktiem neiropātijas simptomiem (Dunna tests, $p < 0,05$)



3.4. att. Glo1 aktivitātes saistība ar neiropātijas disfunkcijas smaguma pakāpi (A) 1. tipa ($n = 88$) un (B) 2. tipa ($n = 74$) cukura diabēta pacientiem

NDS skalas iedalījums: viegli (3-4) un vidēji (5-8) simptomi. Rezultāti attēloti kā mediānas \pm starpkvartīļu intervāls

Gan 1. tipa, gan 2. tipa cukura diabēta pacientiem Glo1 aktivitāte nekorelēja ar vecumu, dzimumu, glikozes koncentrāciju, HbA_{1C}, hs-CRP, lipīdu koncentrācijām, ĶMI, alkohola patēriņu, smēķēšanu vai medikamentu lietošanu. Kontroles grupā nenovēroja ticamu Glo1 aktivitātes saistību ar dažādiem klīniskajiem parametriem.

3.1.2.3. Glo1 aktivitātes saistība ar sāpīgas neiropātijas risku

Tā kā Glo1 aktivitāte bija samazināta pacientiem ar izteiktiem sāpīgas neiropātijas simptomiem, noteiktie bioķīmiskie parametri tika salīdzināti cukura diabēta pacientiem ar nesāpīgu un sāpīgu neiropātiju. Pacientiem ar sāpīgu neiropātiju un neiropātiju bez sāpēm bija līdzīga nervu disfunkcijas pakāpe, kas raksturota ar NDS. Gan 1., gan 2. tipa CD pacientiem ar sāpīgu neiropātiju, salīdzinot ar pacientiem ar neiropātiju bez sāpēm, Glo1 aktivitāte bija statistiski ticami samazināta attiecīgi par 12 un 14% (3.3. tabula).

3.3. tabula

Cukura diabēta pacientu ar sāpīgu diabētisko neiropātiju un neiropātiju bez sāpēm klīniskais raksturojums

Noteiktie parametri	1. tipa cukura diabēts			2. tipa cukura diabēts		
	Nesāpīga neiropātija	Sāpīga neiropātija	<i>P</i> vērtība	Nesāpīga neiropātija	Sāpīga Neiropātija	<i>P</i> vērtība
Skaitis, n	43	51		45	48	
Vecums, gadi	32.0 (24.0-47.0)	45.0 (29.0-57.0)	0.03	56.0 (50.5-62.0)	59.0 (54.2-68.0)	0.03
Vīriešu dzimums, <i>n</i> (%)	21 (49)	24 (47)	ns	20 (44)	15 (31)	ns
Diabēta stāžs, gadi	10.5 (6.0-16.5)	19.0 (7.0-26.0)	0.01	5.5 (3.0-11.0)	11.0 (7.0-17.7)	<0.00 01
Glo1 aktivitāte, U/g Hb	33.0 (29.0-39.0)	28.9 (23.0-35.0)	0.01	32.6 (26.0-40.0)	29.2 (24.0-35.0)	0.04
Plazmas glikoze, mM	7.8 (6.1-10.4)	8.9 (7.0-11.5)	ns	7.8 (6.9-9.6)	8.1 (7.0-9.6)	ns
HbA _{1C} , %	8.4 (7.6-10.4)	9.1 (7.8-10.0)	ns	8.2 (7.1-11.2)	7.8 (7.3-9.0)	ns
ĶMI, kg/m ²	24.0 (21.3-25.2)	25.8 (22.6-28.4)	0.01	31.9 (28.3-37.4)	31.2 (28.1-34.0)	ns
hs-CRP, mg/l	2.4 (1.0-3.2)	2.3 (1.2-3.3)	ns	2.0 (1-3.7)	1.8 (1.1-3.5)	ns
Kopējais holesterīns, mM	5.5 (4.4-6.4)	5.6 (4.7-6.0)	ns	5.7 (4.9-6.4)	5.9 (5.2-6.5)	ns
Triglicerīdi, mM	1.2 (0.9-1.9)	1.1 (0.9-1.9)	ns	2.1 (1.5-2.7)	2.1 (1.6-3.4)	ns

3.3. tabulas turpinājums

Noteiktie parametri	1. tipa cukura diabēts			2. tipa cukura diabēts		
	Nesāpīga neuropātija	Sāpīga neuropātija	<i>p</i> vērtība	Nesāpīga neuropātija	Sāpīga neuropātija	<i>p</i> vērtība
ABL- holesterīns, mM	1.5 (1.3-1.9)	1.6 (1.3-2.1)	ns	1.2 (1-1.6)	1.4 (1.1-1.7)	ns
ZBL- holesterīns, mM	3.2 (2.7-4.1)	3.5 (2.6-3.9)	ns	3.4 (3.0-4.2)	3.4 (2.4-4.2)	ns
C-peptīds, ng/ml	0.5 (0.2-0.5)	0.3 (0.1-0.5)	ns	2.9 (2-4.1)	2.3 (1.4-4.5)	ns
Smēķēšana, <i>n</i> (%)	17 (40)	24 (47)	ns	12 (27)	7 (15)	ns
Alkohola lietošana (≥ 1 reizi/nedēļā), <i>n</i> (%)	7 (16)	4 (8)	ns	4 (9)	1 (2)	ns
Statīni, <i>n</i> (%)	8 (19)	17 (35)	ns	24 (53)	29 (60)	ns
AKE-inhibitori/AT1R antagonisti, <i>n</i> (%)	22 (51)	28 (56)	ns	39 (87)	38 (79)	ns

Rezultāti attēloti kā mediānas (starpkvartīļu intervāls) vai skaits (%)

Kā redzams 3.3. tabulā, 1. un 2. tipa diabēta pacienti ar sāpīgu neuropātiju, salīdzinot ar pacientiem ar nesāpīgu neuropātiju, bija ticami vecāki attiecīgi par 19 un 7%, kā arī tiem bija apmēram 2 reizes ilgāks diabēta stāžs. Turklāt 1. tipa cukura diabēta pacientiem ar sāpīgu neuropātiju, salīdzinot ar pacientiem ar neuropātiju bez sāpēm, KMI bija palielināts par 10%. Pacientiem ar sāpīgu neuropātiju pārējie noteiktie parametri neatšķīrās, salīdzinot ar pacientiem ar neuropātiju bez sāpēm (3.3. tabula).

3.4. tabula

Glo1 aktivitātes saistība ar sāpīgas neuropātijas risku

	1. tipa cukura diabēts	
	ExpB (95% KI)	<i>p</i> vērtība
Glo1 aktivitāte, U/g Hb	0.93 (0.87-1.00)	0.04
Diabēta stāžs, gadi	1.04 (0.99-1.10)	ns
Vecums, gadi	1.00 (0.97-1.04)	ns
KMI , kg/m^2	1.11 (0.96-1.28)	ns
	2. tipa cukura diabēts	
	ExpB (95% KI)	<i>p</i> vērtība
Glo1 aktivitāte, U/g Hb	0.92 (0.86-0.98)	0.01
Diabēta stāžs, gadi	1.12 (1.04-1.21)	0.003
Vecums, gadi	1.02 (0.97-1.07)	ns

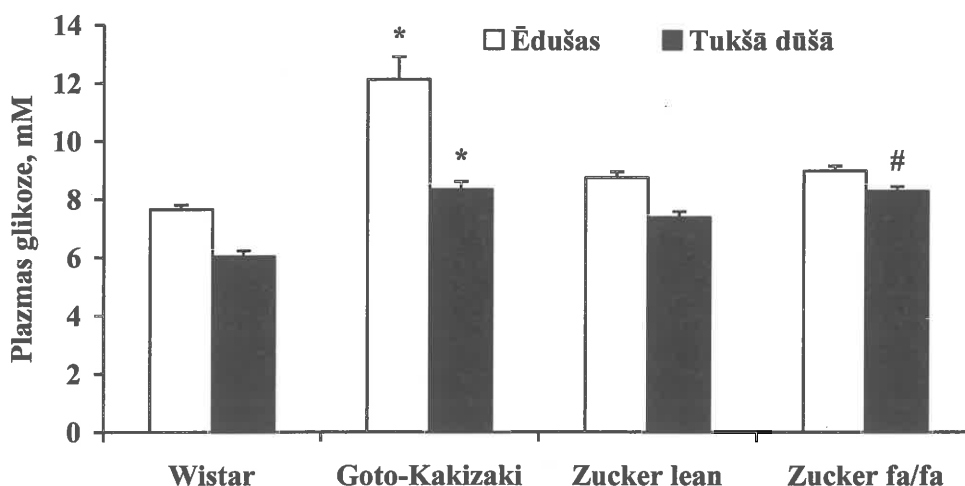
Rezultāti attēloti kā riska koeficients (95% konfidences intervāls (KI))

Glo1 aktivitātei palielinoties par vienu vienību, ticami samazinājās sāpīgas neiropātijas risks, ņemot vērā pacientu vecumu, diabēta stāžu un KMI multivariantajā analizē (3.4. tabula). Tikai 2. tipa CD pacientiem diabēta stāžs statistiski ticami bija saistīts ar paaugstinātu sāpīgas neiropātijas risku (3.4. tabula). Sāpīgas neiropātijas iespējamība nebija saistīta ar pacientu vecumu ne 1. tipa, ne 2. tipa CD gadījumā.

3.1.3. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes un ekspresijas izmaiņas eksperimentālajos dzīvnieku modeļos

3.1.3.1. Glikozes, insulīna un lipīdu daudzumu izmaiņas plazmā

Kā redzams 3.5. attēlā, *Goto-Kakizaki* žurkām novēroja mēreni izteiktu hiperglikēmiju. Eksperimenta beigās plazmas glikozes koncentrācija tukšā dūšā un ēdušām *Goto-Kakizaki* žurkām bija 1,5 reizes augstāka, salīdzinot ar vienāda vecuma *Wistar* kontroles žurkām. *Zucker fa/fa* žurkām plazmas glikozes koncentrācija bija palielināta par 12% tikai tukšā dūšā. Ēdušām *Zucker fa/fa* žurkām plazmas glikozes koncentrācija neatšķīrās no *Zucker lean* žurkām (3.5. attēls).



3.5. att. Plazmas glikozes koncentrācija *Wistar*, *Goto-Kakizaki*, *Zucker lean* un *Zucker fa/fa* žurkām 24. nedēļā

*Statistiski ticami atšķiras no *Wistar* kontroles grupas (Stjudenta *t* tests, $p < 0,05$). #Statistiski ticami atšķiras no *Zucker lean* kontroles grupas (Stjudenta *t* tests, $p < 0,05$)

HbA_{1C} koncentrācija *Goto-Kakizaki* un *Zucker fa/fa* žurkām bija attiecīgi $8,4 \pm 0,1$ un $6,7 \pm 0,2\%$ un statistiski ticami atšķīrās no kontroles dzīvniekiem (3.5. tabula). Glikozes tolerances testā no iegūtajiem rezultātiem tika aprēķināti zemlīknes laukumi

(AUC). Asins glikozes koncentrācija *Goto-Kakizaki* un *Zucker fa/fa* žurkām visos laika punktos bija statistiski ticami augstāka, salīdzinot ar kontroles žurkām, un AUC bija attiecīgi 3 un 2 reizes lielāki (3.5. tabula). Plazmas insulīna koncentrācija tukšā dūšā un ēdušām *Goto-Kakizaki* žurkām neatšķīrās no kontroles *Wistar* žurkām. *Zucker fa/fa* žurkām, salīdzinot ar *Zucker lean* žurkām, tukšā dūšā un ēdušām bija ievērojami palielināta insulīna koncentrācija attiecīgi 8 un 10 reizes (3.5. tabula).

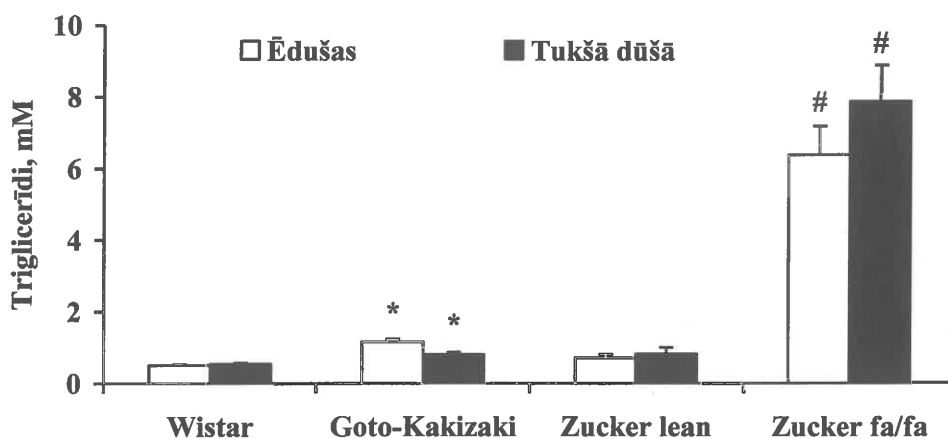
3.5. tabula

Bioķīmiskie parametri žurku plazmā

	Wistar	Goto-Kakizaki	Zucker lean	Zucker fa/fa
Ēdušas				
Insulīns, ng/ml	2.15±0.43	3.67±0.86	1.44±0.18	11.39±1.31#
Brīvās taukskābes, mM	0.37±0.03	1.05±0.13*	0.54±0.03	0.91±0.05#
HbA _{1C} , %	7.59±0.33	8.39±0.14*	5.75±0.37	6.74±0.22#
Tukšā dūšā				
Insulīns, ng/ml	0.31±0.03	0.48±0.07*	0.50±0.04	5.01±0.75#
Brīvās taukskābes, mM	1.22±0.06	1.47±0.08*	1.23±0.07	1.28±0.07
Glikozes tolerances tests, AUC	1473±110	3932±221*	812±62	1542±131#

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no *Wistar* kontroles grupas (Stjudenta *t* tests, $p < 0,05$). #Statistiski ticami atšķiras no *Zucker lean* kontroles grupas (Stjudenta *t* tests, $p < 0,05$)

Zucker fa/fa žurkām attīstījās hiperlipidēmija, un plazmas triglicerīdu un brīvo taukskābju koncentrācija ēdušām žurkām bija attiecīgi 9 un 2 reizes augstāka kā kontroles žurkām (3.6. attēls, 3.5. tabula).



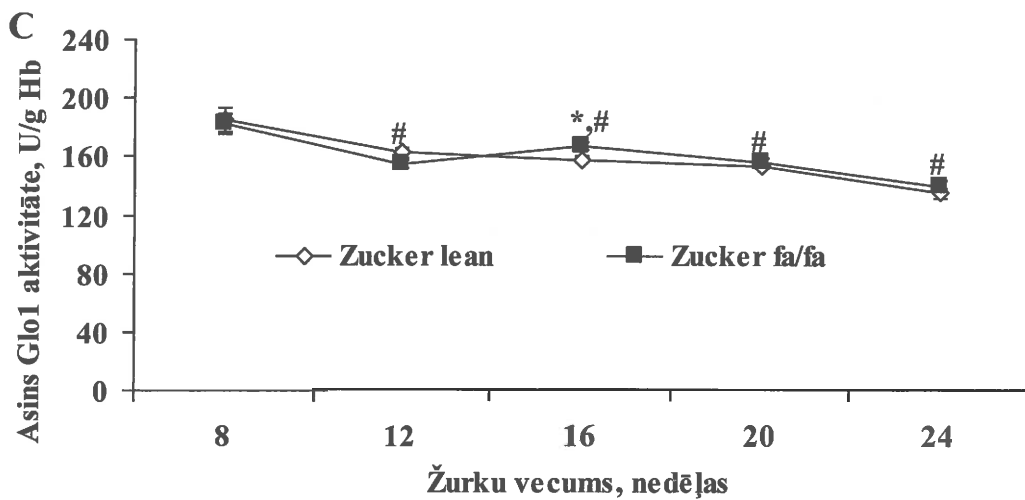
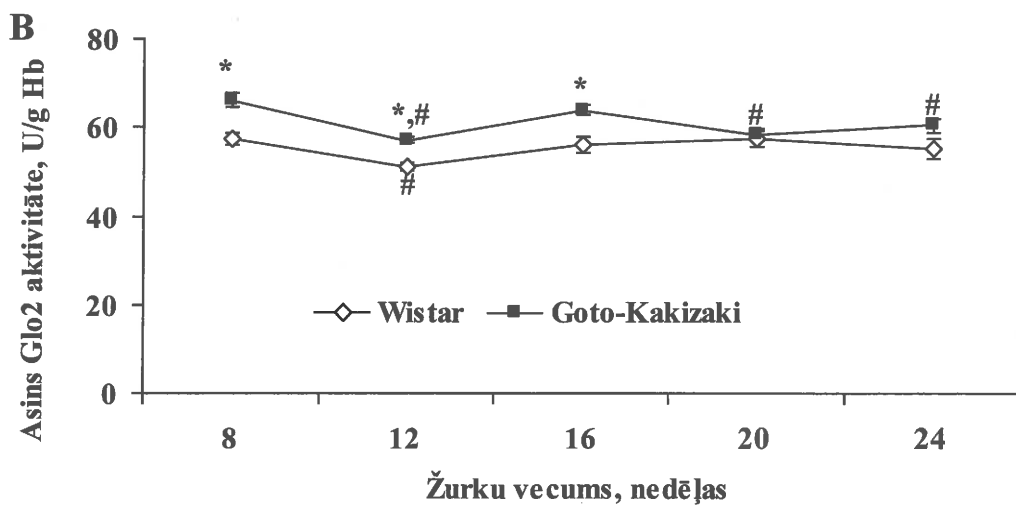
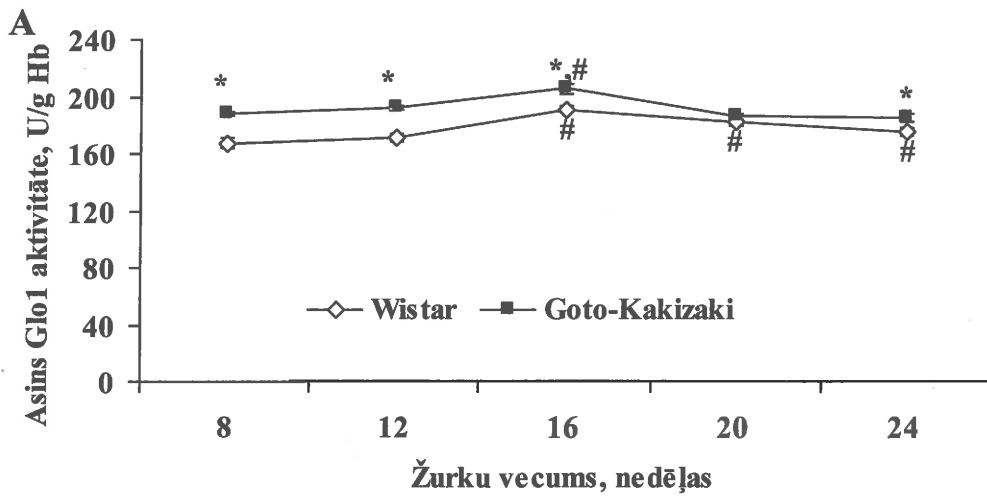
3.6. att. Plazmas triglicerīdu koncentrācija *Wistar*, *Goto-Kakizaki*, *Zucker lean* un *Zucker fa/fa* žurkām 24. nedēļā

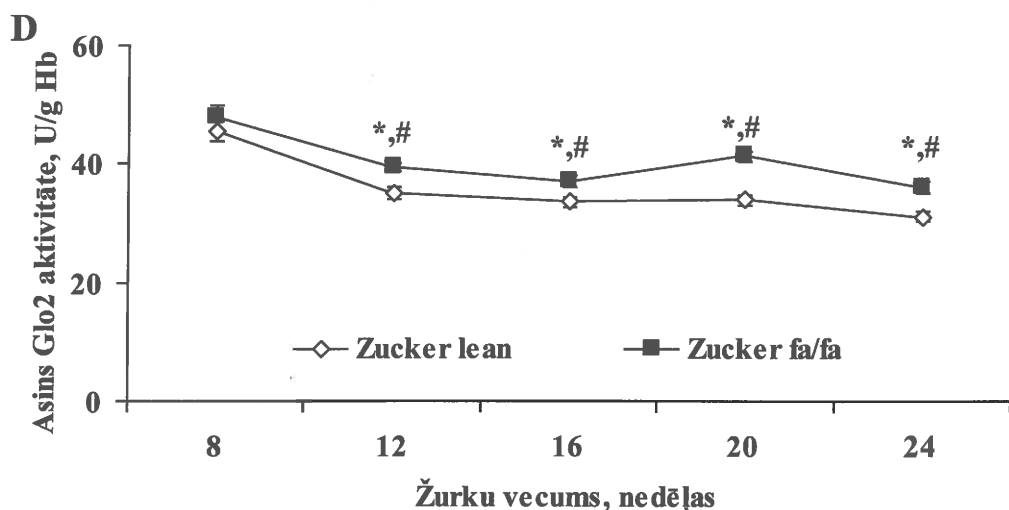
*Statistiski ticami atšķiras no *Wistar* kontroles grupas (Stjūdentu *t* tests, $p < 0,05$). #Statistiski ticami atšķiras no *Zucker lean* kontroles grupas (Stjūdentu *t* tests, $p < 0,05$)

Ēdušām Goto-Kakizaki žurkām plazmas triglicerīdu un brīvo taukskābju koncentrācija bija attiecīgi 2 un 3 reizes augstāka kā *Wistar* kontroles dzīvniekiem, bet Goto-Kakizaki žurkām tukšā dušā attiecīgi par 48 un 20% (3.6. attēls, 3.5. tabula).

3.1.3.2. Glo1 un Glo2 aktivitāte un ekspresija

Eksperimenta sākumā Glo1 un Glo2 aktivitāte *Goto-Kakizaki* žurkām 8 nedēļu vecumā bija statistiski ticami paaugstināta attiecīgi par 12 un 15%, salīdzinot ar vienāda vecuma *Wistar* žurkām, taču pēc 16 nedēļām šī atšķirība samazinājās līdz 5 un 9% (3.7.A. un 3.7.B. attēls).

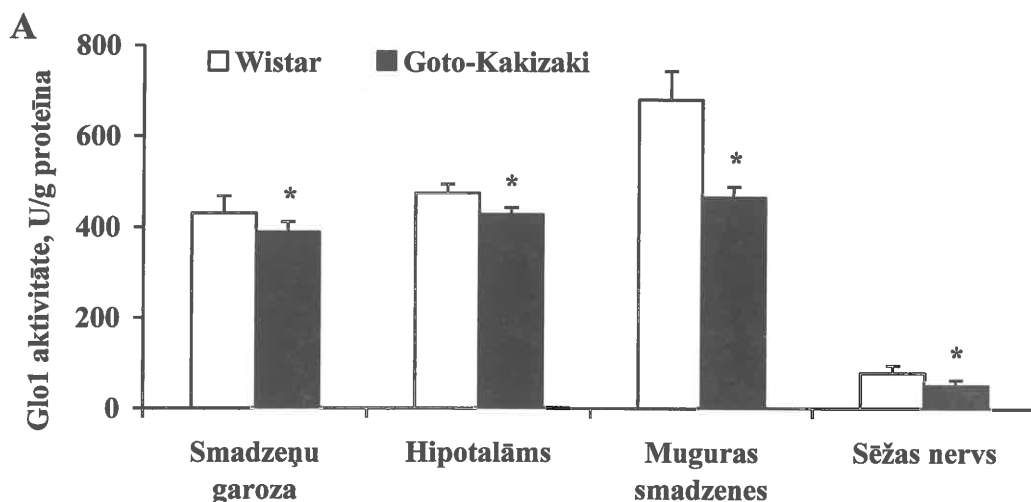


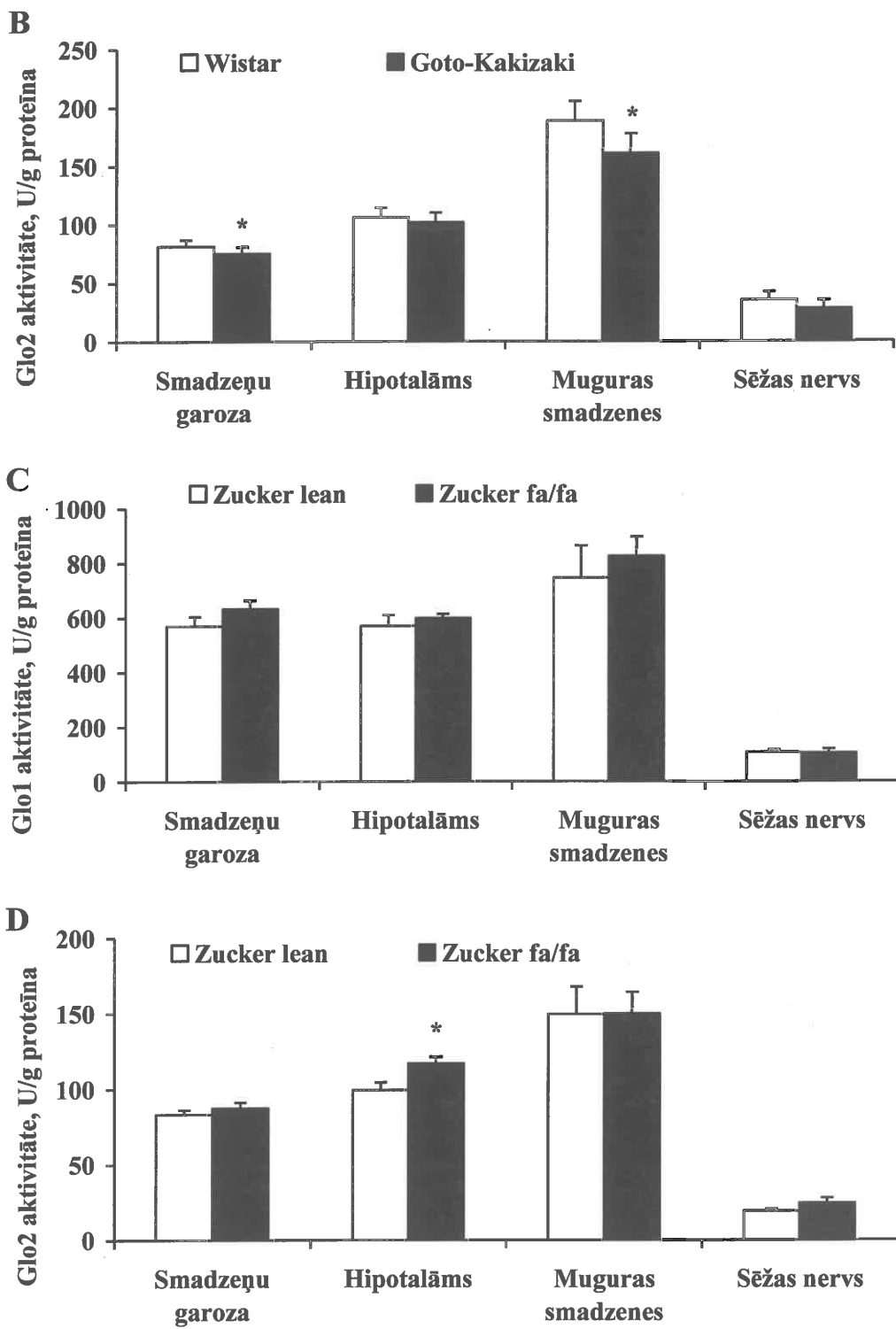


3.7. att. Glo1 un Glo2 aktivitātes izmaiņas *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurku (A, B), *Zucker fa/fa* un *Zucker lean* (C, D) žurku asins lizātos

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11-12 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdenta t tests, $p < 0,05$). #Statistiski ticami atšķiras no atbilstošās grupas 8. Nedēļas (Atkārtotu mērījumu tests, $p < 0,05$)

Glo1 aktivitāte *Goto-Kakizaki* žurku neironālajos audos (galvas, muguras smadzenēs un sēžas nervā) bija statistiski ticami samazināta attiecīgi par 10, 32 un 36% (3.8.A. attēls). Glo2 aktivitāte *Goto-Kakizaki* žurkām, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem, statistiski ticami bija samazināta tikai galvas smadzeņu garozas un muguras smadzeņu audos attiecīgi par 8 un 15%. Sēžas nerva audos Glo2 aktivitāte nebija izmainīta (3.8.B. attēls). GLO1 un GLO2 mRNS daudzums galvas, muguras un sēžas nerva audos 24 nedēļu vecām *Goto-Kakizaki* žurkām nebija izmainīts, salīdzinot ar kontroles grupu.





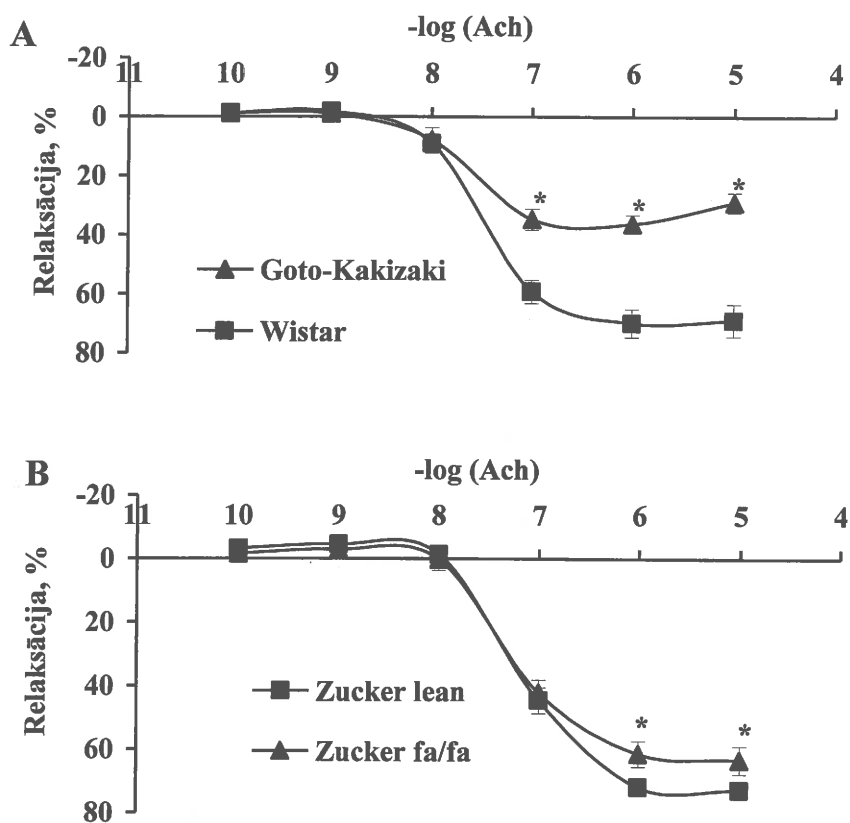
3.8. att. Glo1 un Glo2 aktivitāte galvas smadzeņu garozas, hipotalāma, muguras smadzeņu un sēžas nerva audos *Wistar* un *Goto-Kakizaki* (A, B), *Zucker fa/fa* un *Zucker lean* (C, D) žurkām 24. Nedēļā

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdena t tests, $p < 0,05$)

Zucker fa/fa žurkām, salīdzinot ar *Zucker lean* žurkām, asins lizātu un neironālo audu Glo1 aktivitāte nebija izmainīta (3.7.C. un 3.8.C. attēls). Glo2 aktivitāte asins lizātos 16 nedēļu laikā bija palielināta vidēji par 5-20% (3.7.D. attēls). Kā redzams 3.8.C. un 3.8.D. attēlā, Glo1 un Glo2 aktivitāte *Zucker fa/fa* žurku neironālajos audos neatšķīrās no *Zucker lean* žurku enzīmu aktivitātes vai bija nedaudz paaugstināta. Lai gan Glo2 aktivitāte 24 nedēļu vecām *Zucker fa/fa* žurkām bija palielināta par 16%, tikai hipotalāmā Glo2 aktivitāte bija statistiski ticami palielināta (3.7.D. un 3.8.D. attēls).

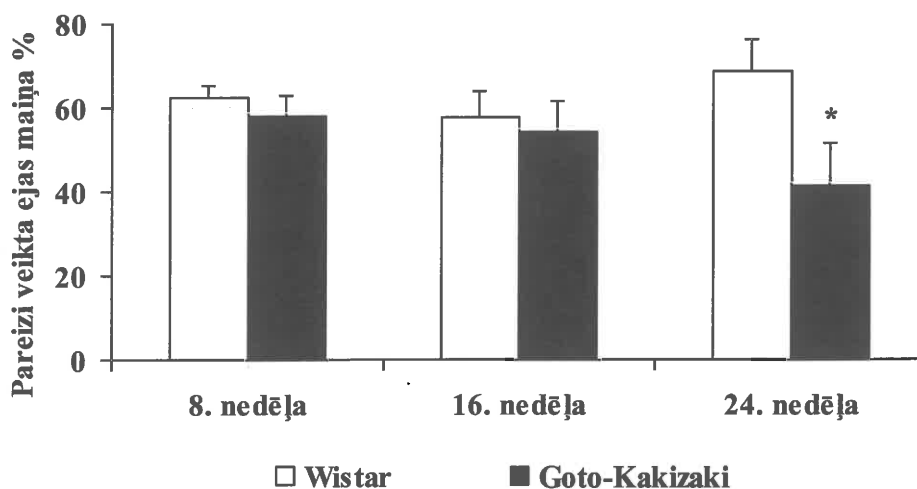
3.1.3.3. Endotēlija funkcionalitātes, perifērās sāpju sajūtas uztveres un īslaicīgās atmiņas darbības traucējumi

Goto-Kakizaki un *Zucker fa/fa* žurku endotēlija-atkarīgā aortu gredzenu atslābšana acetilholīna ietekmē bija statistiski ticami izmainīta, salīdzinot ar kontroles grupu (3.9. attēls). *Goto-Kakizaki* žurkām endotēlija disfunkcija bija vairāk izteikta kā *Zucker fa/fa* žurkām. Maksimālā aortu gredzenu atslābšana *Goto-Kakizaki* un *Zucker fa/fa* žurkām, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem, bija samazināta par attiecīgi 48 un 13% (3.9. attēls).



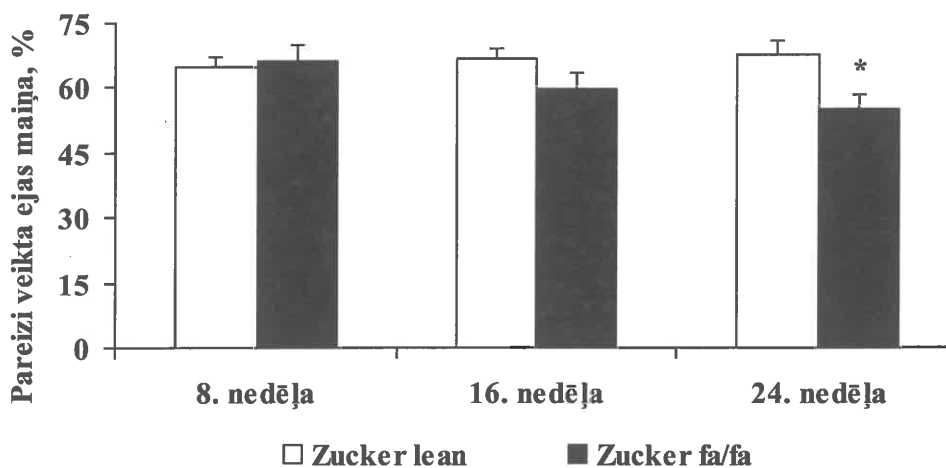
3.9. att. Izolētu aortu endotēlija-atkarīgā atslābšana acetilholīna (10^{-10} – 10^{-5} M) ietekmē *Wistar* un *Goto-Kakizaki* (A), *Zucker lean* un *Zucker fa/fa* (B) žurkām 24. nedēļā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t tests, $p < 0,05$)

Eksperimenta laikā žurkām 8., 16. un 24. nedēļā tika veikti mehāniski un termiski izraisīto sāpju sajūtu un īslaicīgās atmiņas novērtēšanas testi. *Zucker fa/fa* žurkām, kā arī *Goto-Kakizaki* žurkām, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem, nenovēroja atšķirības ne mehāniski, ne termiski izraisīto sāpju sajūtu uztverē.



3.10. att. Īslaicīgās atmiņas darbība *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurkām 8., 16. un 24. nedēļā

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdenta t tests, $p < 0,05$)



3.11. att. Īslaicīgās atmiņas darbība *Zucker lean* un *Zucker fa/fa* žurkām 8., 16. un 24. nedēļā

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdenta t tests, $p < 0,05$)

24. nedēļā Y-veida labirinta testā *Goto-Kakizaki* un *Zucker fa/fa* žurkām, salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem, pareizi veikta eju maiņa bija samazināta attiecīgi par 39 un 19% (3.10. un 3.11. attēls). Izziņas un atmiņas funkcijas *Goto-Kakizaki* un *Zucker fa/fa* žurkām 8 un 16 nedēļu vecumā neatšķirās no kontroles grupas (3.10. un 3.11. attēls).

3.1.3.4. Neironālo audu Glo1 aktivitātes saistība ar bioķīmiskajiem parametriem un vaskulārajām komplikācijām

Lai noteiktu Glo1 aktivitātes saistību galvas, muguras smadzeņu un sēžas nerva audos ar asins bioķīmiskajiem parametriem un vaskulārajām komplikācijām, tika veikta Spīrmena korelāciju analīze. *Goto-Kakizaki* žurku hipotalāma, muguras smadzeņu un sēžas nerva Glo1 aktivitāte negatīvi korelēja ar plazmas glikozes un triglicerīdu koncentrāciju (3.6. tabula).

3.6. tabula

Neironālo audu Glo1 aktivitātes saistība ar bioķīmiskajiem parametriem un vaskulārajām komplikācijām

	Hipotalāma Glo1 aktivitāte, U/g proteīna		Muguras smadzeņu Glo1 aktivitāte, U/g proteīna		Sēžas nerva Glo1 aktivitāte, U/g proteīna	
	<i>r</i>	<i>p</i> vērtība	<i>r</i>	<i>p</i> vērtība	<i>r</i>	<i>p</i> vērtība
Plazmas glikoze, mM	-0.76	0.01	-0.78	0.01	-0.79	0.01
Insulīns, ng/ml	-0.59	0.05	-0.51	ns	-0.47	ns
HbA _{1c} , %	-0.67	0.02	-0.69	0.01	-0.52	ns
Triglicerīdi, mM	-0.63	0.03	-0.81	0.01	-0.81	0.01
Maksimālā endotēlija- atkarīgā relaksācija, %	0.78	0.01	0.74	0.01	0.75	0.01
Īslaicīgās atmiņas darbība, %	0.10	ns	0.27	ns	0.33	ns

Rezultāti attēloti kā Spīrmena korelācijas koeficienti (*r*), ns – dati nav statistiski ticami, $p > 0,05$

Goto-Kakizaki žurku neironālajos audos maksimālā endotēlija relaksācija statistiski ticami korelēja ar augstāku Glo1 aktivitāti (3.6. tabula). Glo1 un Glo2 aktivitāte asinīs nekorelēja ar enzīma aktivitāti audos *Goto-Kakizaki* žurkām, bet *Zucker* žurkām Glo1 un Glo2 aktivitāte asinīs vidēji cieši ($r=0.5$, $p=0.03$) korelēja ar Glo1 aktivitāti galvas smadzeņu garozas audos. Glo1 aktivitāte neironālajos audos nekorelēja ar īslaicīgās atmiņas darbības traucējumiem *Goto-Kakizaki* un *Zucker* žurkām. *Zucker* žurkām nenovēroja Glo1 aktivitātes saistību ar citiem noteiktajiem parametriem.

3.2. Enerģijas metabolismu ietekmējošu savienojumu un to kombināciju lietošanas efektivitāte ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā

3.2.1. Mildronāta un tā kombinācijas ar metformīnu ievadīšanas ietekme aptaukošanās un metabolā sindroma modelī

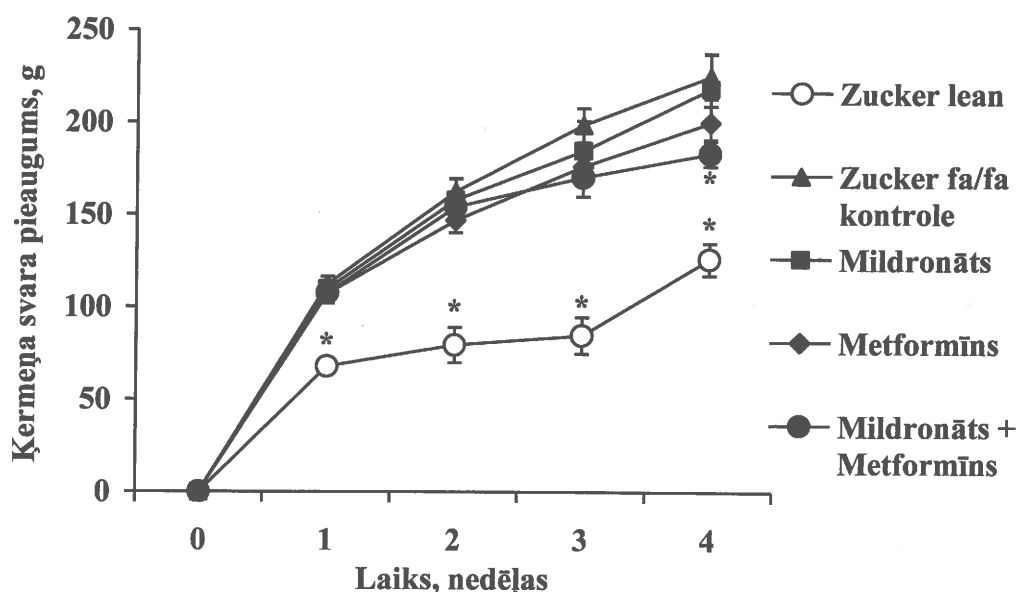
Uzsākot eksperimentu, *Zucker fa/fa* žurkas nejaušināti sadalīja 4 grupās pa 10 žurkām katrā. Vienu reizi dienā p.o. ievadīja atbilstošo zāļu vielu vai ūdeni kontroles grupu dzīvniekiem. Katru otro dienu žurkas nosvēra, lai koriģētu nepieciešamo zāļu devu. Eksperimenta 8. nedēļā žurkas ievietoja metabolisma kamerās un noteica apēstās barības, izdzertā ūdens un izvadītā urīna daudzumu.

Eksperimenta grupas:

- ✓ *Zucker lean* kontrole: *Zucker* līnijas žurkas bez aptaukošanās (vadīts ūdens 4 nedēļas);
- ✓ *Zucker fa/fa* kontrole: *Zucker* līnijas žurkas ar izteiktu aptaukošanos (vadīts ūdens 4 nedēļas);
- ✓ *Zucker fa/fa* + mildronāts: *Zucker fa/fa* žurkas (4 nedēļas vadīts mildronāts 200 mg/kg);
- ✓ *Zucker fa/fa* + metformīns: *Zucker fa/fa* žurkas (4 nedēļas vadīts metformīns 300 mg/kg);
- ✓ *Zucker fa/fa* + mildronāts + metformīns: *Zucker fa/fa* žurkas (4 nedēļas vadīts mildronāts 200 mg/kg un metformīns 300 mg/kg);

3.2.1.1. Svāra pieauguma un fizioloģisko parametru izmaiņas

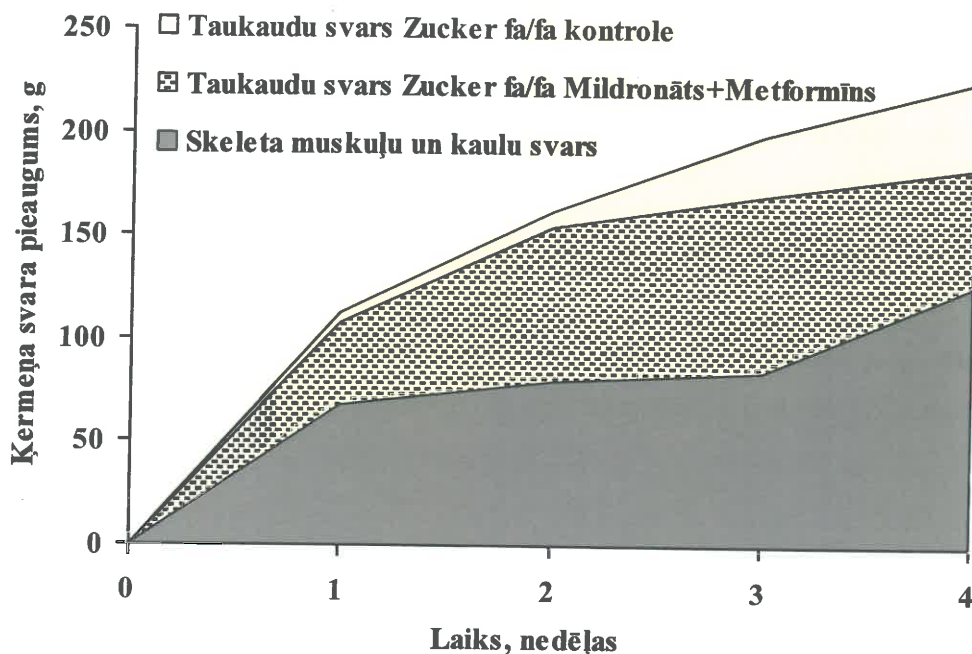
Zucker žurku svārs tika mēģrīts eksperimenta sākumā, kā arī mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadģšanas periodā.



3.12. att. Mildronāta (200 mg/kg), metformģna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformģna) 4 nedēģu ievadģšanas ietekme uz *Zucker fa/fa* žurku svāra izmaiņām

Rezultāti ir vidģjais no mēģrijumiem vismaz 8 dzģvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atģķiras no *Zucker fa/fa* kontrolģ grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

Kā redzams 3.12. attēģā, *Zucker fa/fa* žurkām svāra pieaugums bija aptuveni divas reizes lielāks kā *Zucker lean* kontrolģ grupā. *Zucker* žurku svārs 4 nedēģu laikā pieauga, palielinoties gan skeleta muskuģu un kaulu svāram, gan taukaidu daudzumam (3.13. attēģs). *Zucker lean* žurkām svāra pieaugums tika novģrots, galvenokārt palielinoties skeleta muskuģu un kaulu masai, savukārt *Zucker fa/fa* žurkām ievģrojami pieauga taukaidu daudzums (3.13. attēģs). Atseviģķa mildronāta vai metformģna ievadģšanas neietekmģja svāra pieaugumu, taķu mildronāta un metformģna kombinācijas 4 nedēģu ievadģšanas gadģjumā svāra pieaugums bija par 19% mazāks, salģdzinot ar *Zucker fa/fa* kontrolģ žurkām (3.12. attēģs). Turklāt mildronāta un metformģna kombinācijas ievadģšanas gadģjumā 3. un 4. nedēģā taukaidu masas pieaugums samazināģās attiecģģi par 25 un 42% (3.13. attēģs).



3.13. att. Zucker žurku ķermeņa svara un taukaudu daudzuma izmaiņas

Zucker žurku svara pieaugums atbilstoši skeleta muskulatūras un taukaudu svara izmaiņām un mildronāta (200 mg/kg) kombinācijas ar metformīnu (300 mg/kg) 4 nedēļu lietošanas ietekme uz Zucker fa/fa žurku taukaudu svara izmaiņām. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos

Papildus tam, uzņemtās barības daudzums Zucker fa/fa žurkām bija par 48% lielāks, salīdzinot ar Zucker lean žurkām, taču ne mildronāta, ne metformīna vai to kombinācijas 4 nedēļu ievadīšana neietekmēja uzņemtās barības daudzumu (3.7. tabula).

3.7. tabula

Fizioloģisko parametru izmaiņas pēc 4 nedēļu mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšanas Zucker žurkās

	Zucker fa/fa				
	Zucker lean	Kontrole	Mildronāts	Metformīns	Mildronāts +Metformīns
Žurku svars, g	319±9*	508±16	513±19	489±12	478±11
Uzņemtās barības daudzums, g/dienā	28±2*	41±2	40±3	41±3	38±3
Izdzertā ūdens daudzums, ml/dienā	29±2*	38±3	42±4	51±6*	44±5
Urīna daudzums, g/dienā	13±1*	20±1	20±3	26±5	20±3

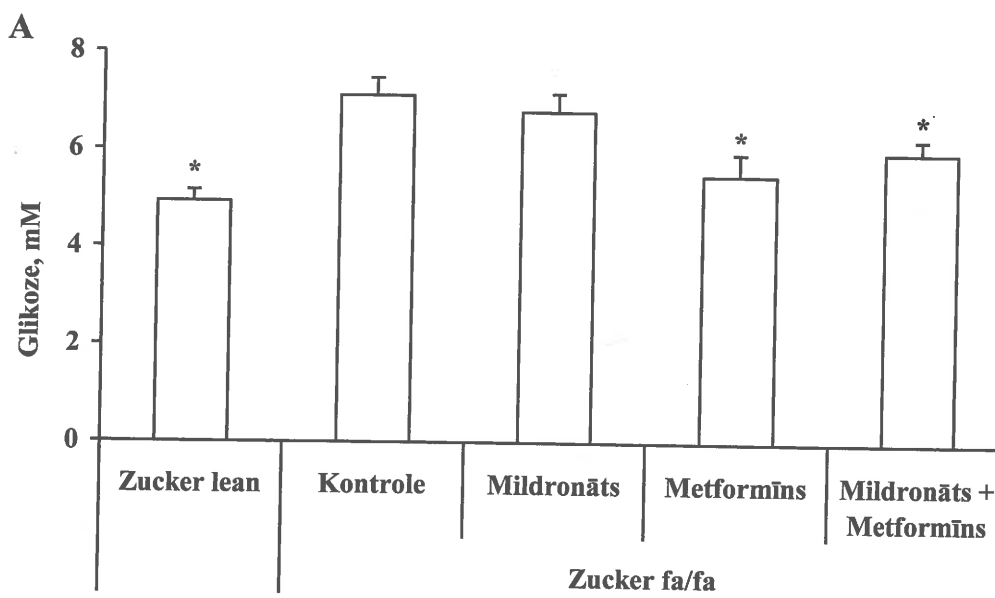
Žurku svars, izdzertā ūdens, uzņemtās barības un urīna daudzums dienā tika noteikts Zucker lean and Zucker fa/fa žurkām pēc 4 nedēļu zāļu ievadīšanas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no Zucker fa/fa kontroles grupas (Dunnetta tests, p<0,05)

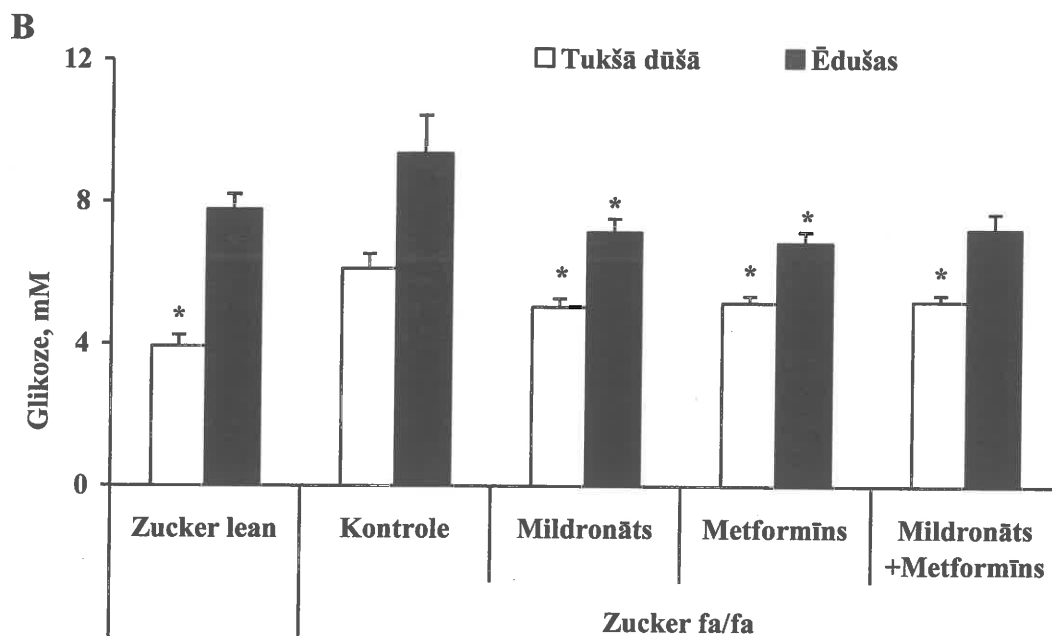
Kā redzams 3.7. tabulā, salīdzinot ar kontroles žurkām, izdzertā ūdens daudzums *Zucker fa/fa* žurkām bija par 32% lielāks. Metformīna ievadīšana palielināja izdzertā ūdens daudzumu *Zucker fa/fa* žurkām vēl par 35%, bet mildronāta un tā kombinācijas ar meformīnu ievadīšana neietekmēja ūdens patēriņu.

Līdzīgi ūdens patēriņam, izvadītā urīna daudzums *Zucker fa/fa* bija par 58% lielāks kā *Zucker lean* žurkām, savukārt mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšana neietekmēja izvadītā urīna daudzumu *Zucker fa/fa* žurkām (3.7. tabula). Mildronāta ievadīšana *Zucker fa/fa* žurkām novērsa metformīna izraisīto izdzertā ūdens daudzuma pieaugumu.

3.2.1.2. Glikozes, insulīna un laktāta daudzumu izmaiņas plazmā

Eksperimenta sākumā glikozes koncentrācija asinīs *Zucker fa/fa* žurkām bija 1,5 reizes augstāka kā *Zucker lean* kontrolei (attiecīgi $7,1 \pm 0,4$ un $4,9 \pm 0,2$ mM). Akūta metformīna un tā kombinācijas ar mildronātu ievadīšana (1h pēc zāļu vielu ievadīšanas) samazināja glikozes koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku asinīs attiecīgi par 22 un 17% (3.14.A. attēls).



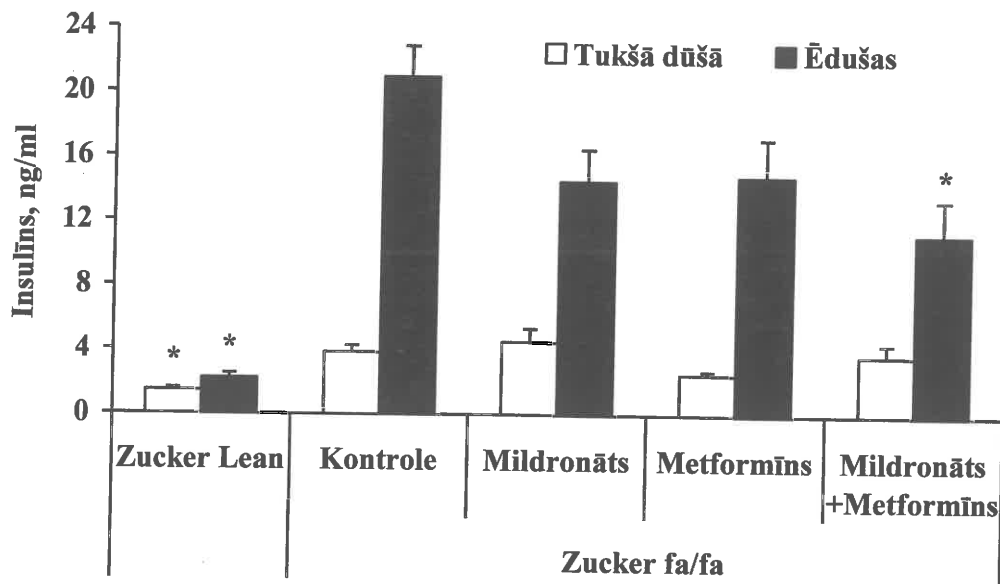


3.14. att. Akūtas (A) un ilgstošas (B) mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) ievadīšanas ietekme uz glikozes koncentrāciju Zucker fa/fa žurku asinīs

Akūtas ievadīšanas ietekme tika noteikta 1 h pēc zāļu ievadīšanas, savukārt ilgstošas ievadīšanas ietekme tika noteikta pēc 4 nedēļu zāļu ievadīšanas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no Zucker fa/fa kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

Akūta mildronāta ievadīšana neizmainīja glikozes koncentrāciju asinīs. Ilgstoša gan atsevišķa mildronāta un metformīna, gan to kombinācijas ievadīšana novērsa diabēta simptomu attīstību un samazināja glikozes koncentrāciju Zucker fa/fa žurkām - ēdušām un tukšā dūšā attiecīgi par 24 un 19% (3.14.B. attēls).

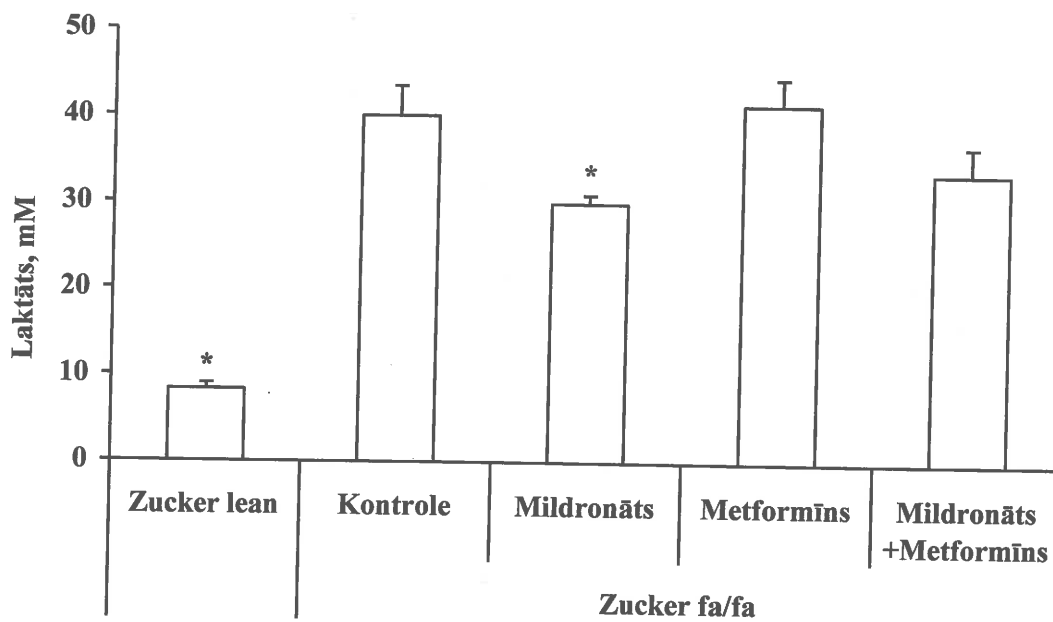
Insulīna koncentrācija Zucker fa/fa žurkām tukšā dūšā bija 2,6 reizes augstāka kā Zucker lean žurkām. Mildronāta ievadīšana nesamazināja plazmas insulīna koncentrāciju žurkām tukšā dūšā (3.15. attēls).



3.15. att. Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadišanas ietekme uz insulīna koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku plazmā
 Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no *Zucker fa/fa* kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

Ēdušām *Zucker fa/fa* žurkām mildronāta vai metformīna ievadišanas gadījumā novēroja tendenci samazināt paaugstināto insulīna koncentrāciju attiecīgi par 31 un 29%, taču vienīgi mildronāta un metformīna kombinācijas ievadīšana statistiski ticami samazināja insulīna koncentrāciju par 47% (3.15. attēls).

Eksperimenta beigās laktāta koncentrācija ēdušu *Zucker fa/fa* žurku plazmā bija 5 reizes augstāka kā kontroles žurkām (3.16. attēls).



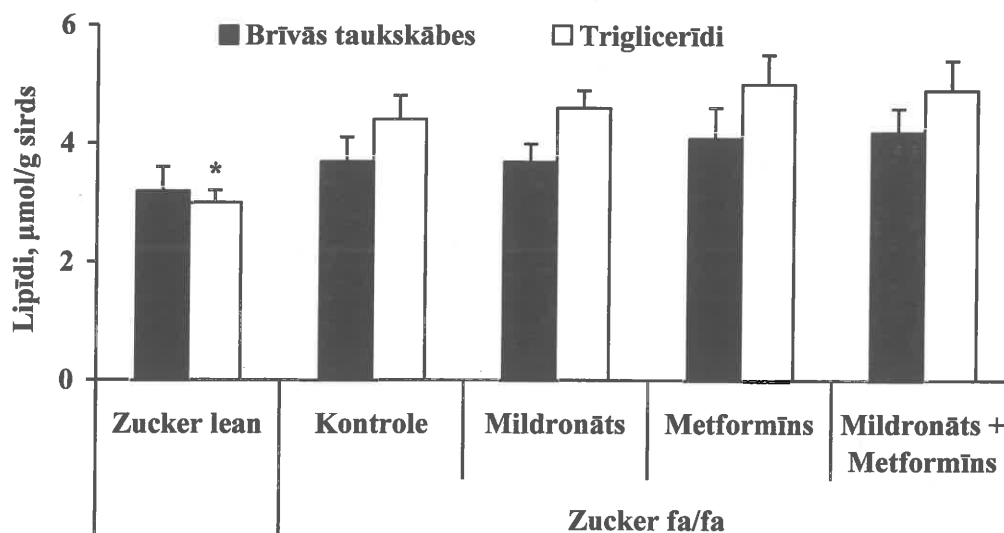
3.16. att. Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz laktāta koncentrāciju Zucker fa/fa žurku plazmā

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no Zucker fa/fa kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

Lai gan mildronāta un metformīna kombinācijas grupā laktāta koncentrācija plazmā bija par 16% zemāka, tikai mildronāta ievadīšana ticami samazināja laktāta koncentrāciju Zucker fa/fa žurku plazmā par 25% (3.16. attēls). Metformīna ievadīšana plazmas laktāta koncentrāciju neietekmēja.

3.2.1.3. Lipīdu daudzuma izmaiņas sirds un aknu audos

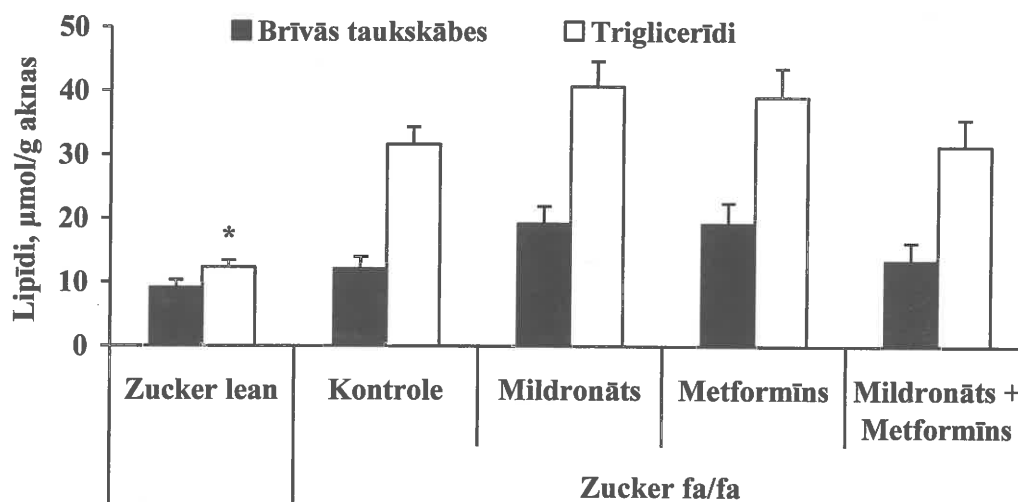
Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrācijas izmaiņām Zucker žurku sirds audos parādīta 3.17. attēlā. Triglicerīdu koncentrācija Zucker lean žurku sirds audos bija 1,5 reizes zemāka kā Zucker fa/fa kontroles žurkām, bet brīvo taukskābju koncentrācija Zucker žurku sirds audos neatšķīrās. Mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšana neietekmēja brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrācijas Zucker fa/fa žurku sirds audos (3.17. attēls).



3.17. att. Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku sirds audos

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no *Zucker fa/fa* kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrācijas izmaiņām *Zucker* žurku aknu audos redzama 3.18. attēlā. Triglicerīdu koncentrācija *Zucker fa/fa* žurku aknu audos bija par 39% lielāka kā *Zucker lean* žurkām, bet brīvo taukskābju koncentrācija *Zucker* žurku sirds audos neatšķīrās.



3.18. att. Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku aknu audos

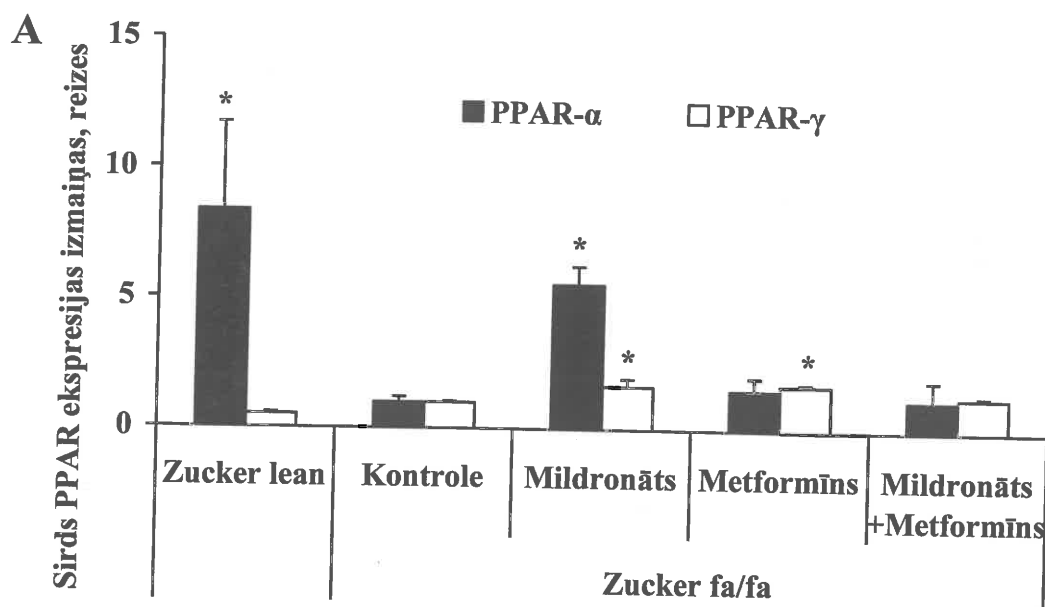
Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no *Zucker fa/fa* kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

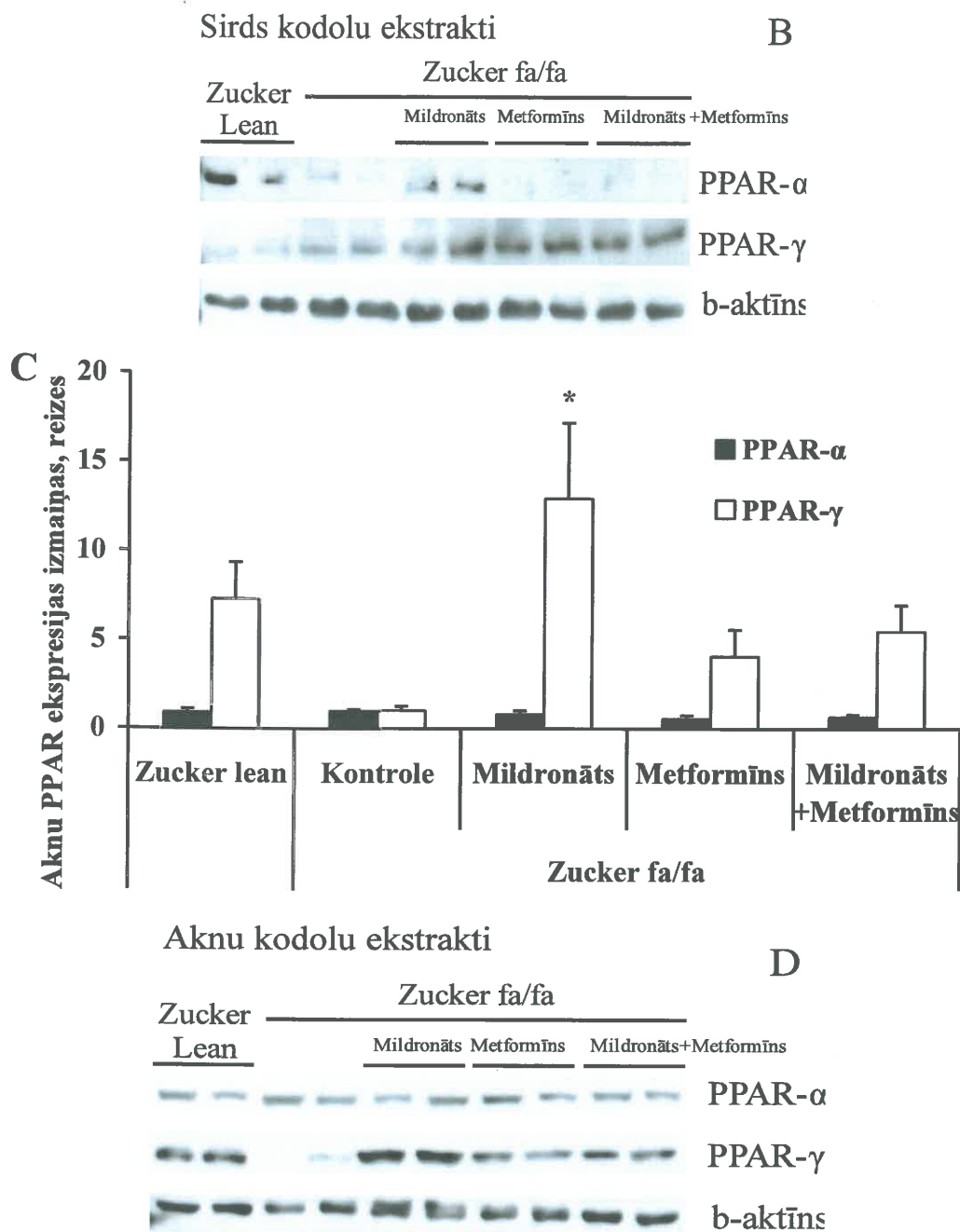
Līdzīgi kā sirds audos, brīvo taukskābju un triglicerīdu koncentrācijas aknu audos neatšķīrās Zucker fa/fa žurku kontroles, mildronāta, metformīna un to kombinācijas grupās (3.18. attēls).

3.2.1.4. PPAR α / γ daudzuma izmaiņas sirds un aknu kodolos

Mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšanas ietekme uz PPAR α un PPAR γ daudzuma izmaiņām sirds un aknu apkopotā 3.19. attēlā. Kodolu PPAR α daudzums Zucker fa/fa žurku sirds audos bija ticami samazināts, salīdzinot ar Zucker lean žurkām. Sirds audos tikai mildronāta lietošana palielināja PPAR α daudzumu kodolos 6 reizes, turpretim zāļu ievadīšana aknu audu kodolu PPAR α daudzumu neietekmēja (3.19.A. un 3.19.C. attēls).

Zucker fa/fa žurku sirds audu kodolu PPAR γ daudzums bija 2 reizes lielāks kā Zucker lean žurkām, taču Zucker fa/fa žurku aknu audu kodolu PPAR γ daudzums bija 7 reizes zemāks. Mildronāta un metformīna ievadīšana ticami palielināja PPAR γ daudzumu sirds audu kodolos 1,7 reizes.





3.19. att. Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadišanas ietekme uz PPAR α un PPAR γ daudzumu *Zucker fa/fa* žurku sirds (A, B) un aknu (C, D) audu kodolu frakcijā
 Rezultāti attēloti kā raksturīgs imunoblota attēls un aprēķināts vidējais no mērījumiem vismaz 4 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

Aknu audos mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadišana palielināja kodolu PPAR γ daudzumu attiecīgi 13, 4 un 5 reizes, salīdzinot ar *Zucker fa/fa* kontroli (3.19.C. attēls).

3.2.1.5. PPAR α/γ mērķgēnu mRNS daudzuma izmaiņas

Pēc 4 nedēļu mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšanas tika noteikts glikozes un taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu mRNS daudzums sirds un aknu audos, izmantojot kvantitatīvo RT-PĶR analīzes metodi. Kā redzams 3.8. tabulā, HK II un insulīna receptora ekspresija sirds audos nebija izmainīta, taču GLUT4 mRNS daudzums *Zucker fa/fa* žurku sirds audos bija samazināts 1,8 reizes.

3.8. tabula

Gēnu ekspresijas izmaiņas pēc 4. nedēļu mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšanas *Zucker* žurku sirds audos

	<i>Zucker lean</i>	<i>Zucker fa/fa</i>			
		Kontrole	Mildronāts	Metformīns	Mildronāts +Metformīns
GLUT1	0.3±0.1*	1.0±0.1	0.7±0.2	1.1±0.4	1.1±0.4
GLUT4	1.8±0.5*	1.0±0.1	1.4±0.4	0.8±0.2	3.9±2.1*
HK II	1.1±0.2	1.0±0.2	0.8±0.1	1.3±0.4	1.4±0.3
InsR	0.8±0.1	1.0±0.2	1.0±0.1	1.1±0.2	1.0±0.2
LPL	1.6±0.1*	1.0±0.1	1.5±0.2*	1.0±0.1	1.8±0.3*
mCPT I	1.3±0.1	1.0±0.1	3.1±2.0	0.9±0.2	1.4±0.2*
LOX1	0.9±0.2	1.0±0.2	1.4±0.3	1.0±0.2	2.1±0.6*
ACOX	1.3±0.2*	1.0±0.1	1.6±0.3*	1.0±0.1	2.2±0.6*
ACSL	1.9±0.2*	1.0±0.1	1.6±0.4	1.0±0.1	2.1±0.5*
PEX13	1.4±0.1*	1.0±0.1	1.8±0.4*	1.1±0.1	2.1±0.5*

Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz glikozes un taukskābju gēnu (GLUT1 (glikozes transportproteīns 1), GLUT4 (glikozes transportproteīns 4), HK II (heksokināze II), InsR (insulīna receptors), mCPT I (karnitīns palmitoiltransferāzes 1 muskuļu izoforma), ACOX (acil-CoA oksidāze 1), ACSL (garķēžu acil-CoA sintēze), LOX1 (lektīnam-līdzīgais oksidētais ZBL receptors 1), LPL (lipoproteīna lipāze), PEX13 (peroksisomālais membrānas proteīns 13)) ekspresijas mRNS izmaiņām sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 4 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Dunnetta tests, p<0,05)

Mildronāta un tā kombinācijas ar metformīnu ievadīšana izraisīja GLUT4 mRNS daudzuma palielināšanos attiecīgi 1,4 un 4 reizes. GLUT1, insulīna neatkarīgā glikozes transportproteīna, ekspresija *Zucker fa/fa* žurku sirds audos bija 3 reizes lielāka kā *Zucker Lean* žurkām, tomēr zāļu ievadīšana proteīna ekspresiju neietekmēja. Taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu (LPL, mCPT I, ACOX, ACSL un PEX13) ekspresija *Zucker fa/fa* žurku sirds audos bija samazināta, salīdzinot ar *Zucker lean* žurkām. Mildronāta un īpaši tā kombinācijas ar metformīnu ievadīšana palielināja taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju, turpretim metformīna lietošana neietekmēja PPAR α mērķgēnu ekspresiju sirds audos (3.8. tabula). Zāļu ievadīšana *Zucker fa/fa* žurku aknu audos noteikto gēnu ekspresija neizmainīja.

3.2.2. Mildronāta ievadīšanas ietekme hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī

Eksperimenta sākumā *Wistar* žurkas nejaušināti sadalīja 3 grupās (pa 12 žurkām katrā grupā).

Eksperimenta grupas:

- ✓ *Wistar* kontrole: *Wistar* līnijas žurkām 8 nedēļas tika dots dzeramais ūdens;
- ✓ 10% fruktozes kontrole: *Wistar* līnijas žurkām 8 nedēļas tika dots 10% fruktozes šķīdums;
- ✓ 10% fruktoze + mildronāts: *Wistar* līnijas žurkām 4 nedēļas tika dots 10% fruktozes šķīdums, tad 4 nedēļas tika dots 10% fruktozes šķīdums un p.o. ievadīts mildronāts 200 mg/kg;

Eksperimenta 8. nedēļā žurkas ievietoja metabolisma kamerās un noteica apēstās barības, izdzertā ūdens un izvadītā urīna daudzumu.

3.2.2.1. Svara pieauguma un fizioloģisko parametru izmaiņas

Fizioloģisko parametru izmaiņas pēc 8 nedēļu fruktozes lietošanas un 4 nedēļu mildronāta ievadīšanas *Wistar* žurkām apkopotas 3.9. tabulā. Fruktozes šķīduma lietošana neietekmēja *Wistar* žurku svaru un svara pieaugumu, bet samazināja uzņemtās barības daudzumu 1,8 reizes (3.9. tabula). Fruktozes šķīduma ievadīšana *Wistar* žurkām palielināja izdzertā ūdens, kā arī izvadītā urīna daudzumu attiecīgi 3 un 7 reizes. Kā redzams 3.9. tabulā, 4 nedēļu mildronāta (200 mg/kg) ievadīšana neietekmēja *Wistar*

žurku svaru vai svara pieaugumu, kā arī fruktozes šķīduma lietošanas izraisīto uzņemtās barības daudzuma samazināšanos. Mildronāta ievadīšana statistiski ticami samazināja fruktozes šķīduma lietošanas izraisīto izdzertā ūdens un izvadītā urīna daudzuma palielināšanos attiecīgi par 36 un 31% (3.9. tabula).

3.9. tabula

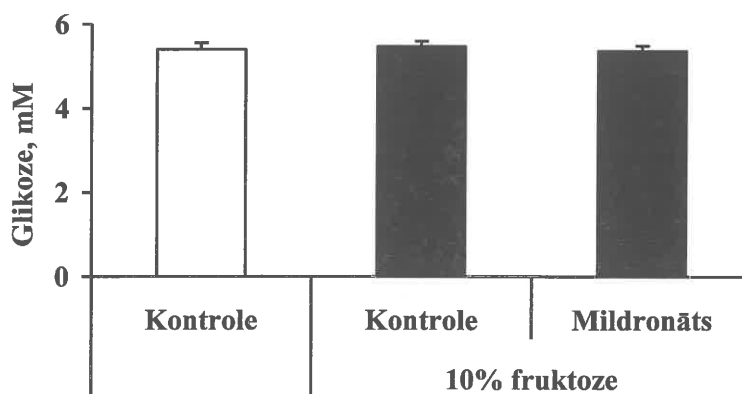
Fizioloģisko parametru izmaiņas pēc 4 nedēļu mildronāta ievadīšanas *Wistar* žurkām hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī

	Kontrole	10% fruktoze, kontrole	10% fruktoze + mildronāts
Žurku svars, g	370±13	365±10	356±13
Žurku svara pieaugums, g	150±11	143±9	134±14
Uzņemtās barības daudzums, g/dienā	25±2*	14±1	17±2
Izdzertā ūdens daudzums, ml/dienā	33±3*	88±12	61±8*
Urīna daudzums, g/dienā	9±1*	59±9	37±6*

Žurku svars, svara pieaugums, izdzertā ūdens, uzņemtās barības un urīna daudzums dienā tika noteikts *Wistar* žurkām pēc 8 nedēļu 10% fruktozes šķīduma lietošanas. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11-12 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no 10% fruktozes kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$).

3.2.2.2. Glikozes, insulīna un laktāta koncentrācijas izmaiņas plazmā

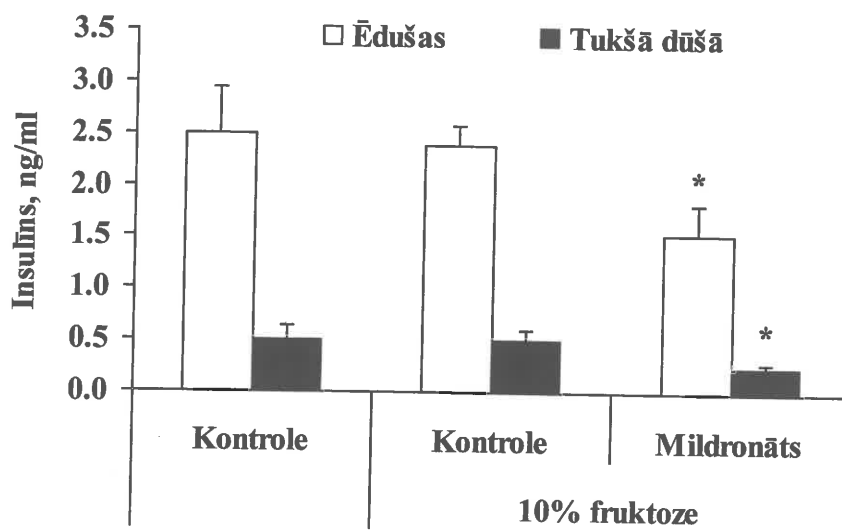
Eksperimenta beigās plazmas glikozes koncentrācija kontroles žurkām bija $5,4 \pm 0,1$ mM un neatšķīrās no fruktozes kontroles grupas žurkām. Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšana plazmas glikozes koncentrāciju žurkām neietekmēja (3.20. attēls).



3.20. att. Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz glikozes koncentrāciju ēdušu *Wistar* žurku asinīs hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11-12 dzīvniekos ± SEM

Fruktozes šķīduma lietošana 8 nedēļas neietekmēja insulīna koncentrācijas ne ēdušām *Wistar* žurkām, ne žurkām tukšā dūšā (3.21. attēls).



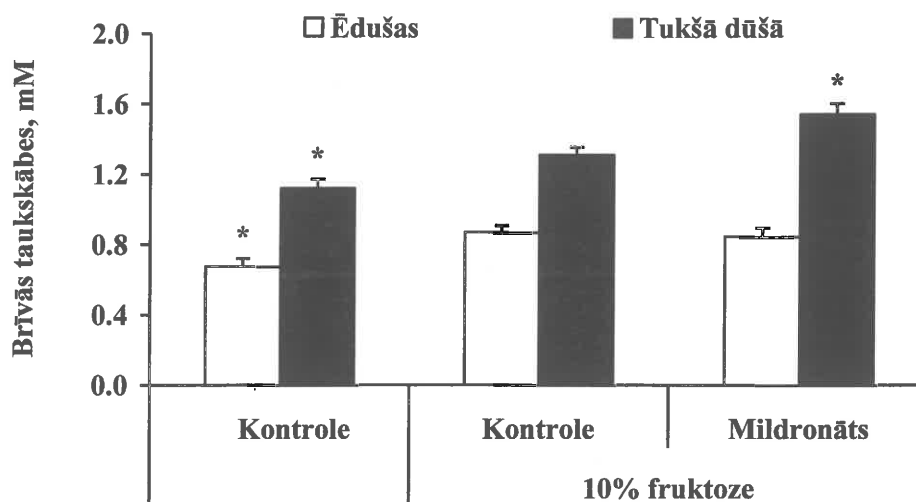
3.21. att. Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz plazmas insulīna koncentrāciju tukšā dūšā un ēdušām žurkām hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11-12 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no fruktozes kontroles grupas (Stjūdenta *t* tests, $p < 0,05$)

Mildronāta 4 nedēļu ievadīšana statistiski ticami samazināja plazmas insulīna koncentrāciju gan tukšā dūšā, gan ēdušām žurkām par attiecīgi 48 un 35% (3.21. attēls).

3.2.2.3. Lipīdu daudzuma izmaiņas plazmā

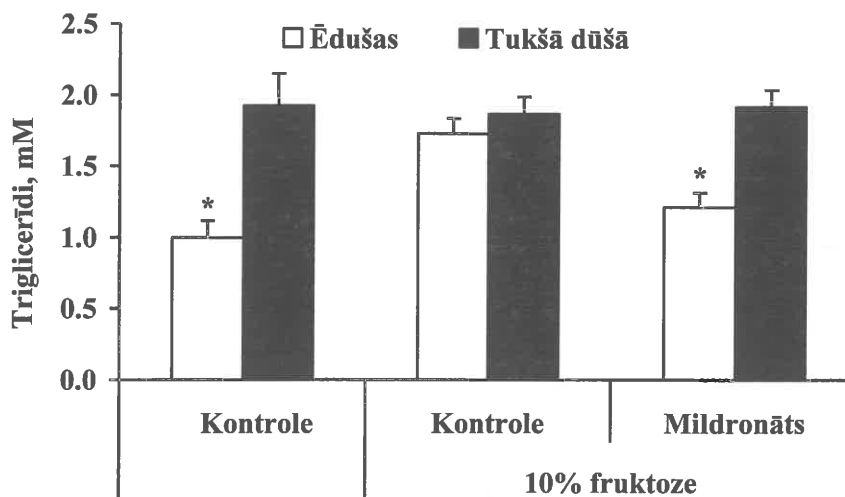
Brīvo taukskābju koncentrācijas izmaiņas žurku plazmā pēc 8 nedēļu 10% fruktozes šķīduma lietošanas attēlotas 3.22. attēlā. Fruktozes lietošana statistiski ticami palielināja brīvo taukskābju koncentrāciju žurkām tukšā dūšā par 17%, bet ēdušām par 29% (3.22. attēls). Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšana plazmas brīvo taukskābju koncentrāciju ēdušām žurkām neietekmēja, taču žurkām tukšā dūšā palielināja par 18%, salīdzinot ar fruktozes kontroles žurkām.



3.22. att. Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz brīvo taukskābju koncentrāciju tukšā dūšā un ēdušām žurkām hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11-12 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no fruktozes kontroles grupas (Stjūdenta *t* tests, $p < 0,05$)

Kā redzams 3.23. attēlā, triglicerīdu koncentrācija fruktozes kontroles žurku plazmā bija palielināta 1,7 reizes tikai ēdušām žurkām.



3.23. att. Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz triglicerīdu koncentrāciju tukšā dūšā un ēdušām žurkām hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11-12 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no fruktozes kontroles grupas (Stjūdenta *t* tests, $p < 0,05$)

Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšana plazmas triglicerīdu koncentrāciju ēdušām žurkām statistiski ticami samazināja par 29%. Wistar žurkām tukšā dūšā, salīdzinot ar kontroles žurkām, ne 8 nedēļu fruktozes šķīduma lietošana, ne 4 nedēļu mildronāta ievadīšana plazmas triglicerīdu koncentrāciju neietekmēja (3.23. attēls).

3.2.2.4. Lipīdu un glikogēna daudzuma izmaiņas aknu audos

Lipīdu un glikogēna koncentrācijas *Wistar* žurku aknu audos apkopotas 4. tabulā. Fruktozes šķīduma lietošana neizmainīja brīvo taukskābju, triglicerīdu un glikogēna daudzumu, kā arī 4 nedēļu mildronāta (200 mg/kg) ievadīšana brīvo taukskābju, triglicerīdu un glikogēna daudzumu aknu audos neietekmēja (3.10. tabula).

3.10. tabula

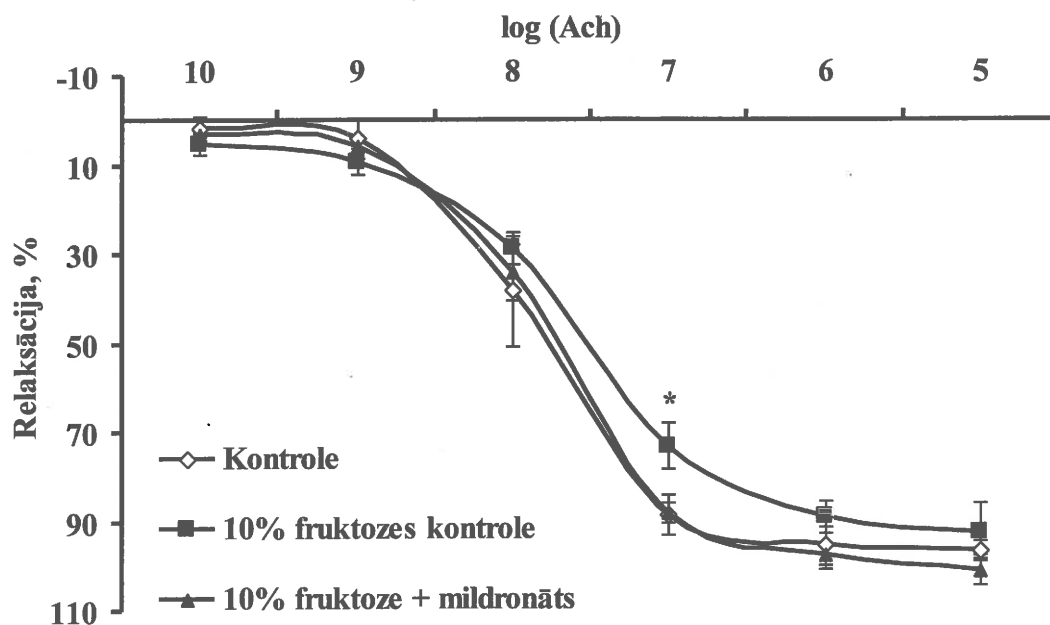
Brīvo taukskābju, triglicerīdu un glikogēna daudzuma izmaiņas aknu audos

Aknu audi			
	Brīvās taukskābes, $\mu\text{mol/g}$ audu	Triglicerīdi, $\mu\text{mol/g}$ audu	Glikogēns, mg/g audu
Kontrole	18.5±0.5	15.3±0.7	23±2.2
10% fruktoze, kontrole	17.0±0.7	16.7±1.0	27±3.5
10% fruktoze + mildronāts	16.9±0.6	14.9±0.6	28±2.9

Mildronāta (200 mg/kg) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz lipīdu un glikogēna koncentrācijas izmaiņām aknu audos hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modeli. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 11-12 dzīvniekos ± SEM

3.2.2.5. Endotēliālās funkcijas noteikšana izolētās aortas modelī

Endotēlija-atkarīgā aortu gredzenu atslābšana acetilholīna ietekmē fruktozes kontroles žurkām nebija izmainīta, salīdzinot ar kontroles grupu (3.24. attēls).



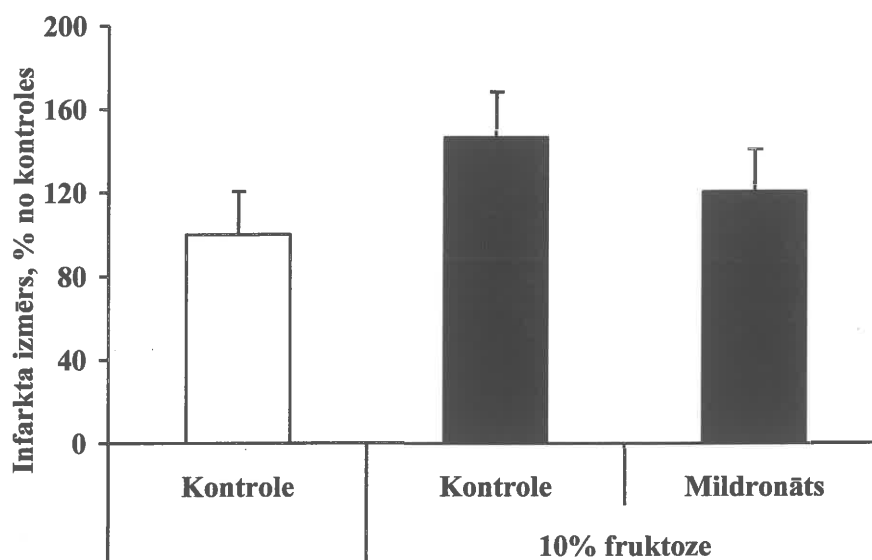
3.24. att. Izolētu aortu endotēlija-atkarīgā atslābšana acetilholīna (10^{-10} – 10^{-5} M) ietekmē hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 4–6 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$)

Mildronāta ievadīšana neietekmēja endotēlija funkcionalitāti. Maksimālā endotēlija relaksācija kontroles žurkām, kā arī hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī pēc 4 nedēļu mildronāta ievadīšanas statistiski ticami atšķīrās par 17% tikai 10^{-7} M acetilholīna ietekmē, salīdzinot ar fruktozes kontroles grupu (3.24. attēls).

3.2.2.6. Infarkta izmēru izmaiņas izolētās sirds infarkta modelī

Mildronāta (200 mg/kg) ievadīšanas ietekme uz sirds infarkta izmēru hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modelī parādīta 3.25. attēlā.



3.25. att. Mildronāta 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz sirds infarkta izmēru *Wistar* žurkām hiperlipidēmijas un insulīna rezistences modeli

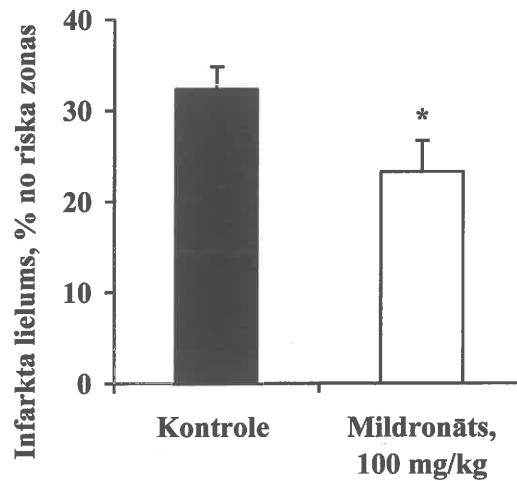
Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 9-12 dzīvniekos \pm SEM

Lai gan 8 nedēļu fruktozes šķīduma lietošanas rezultātā infarkta lielums bija palielināts par 47%, salīdzinot ar kontroles grupu, tomēr efekts nebija statistiski ticams. Mildronāta ievadīšana samazināja infarkta lielumu par 18%, salīdzinot ar fruktozes kontroles grupu, tomēr arī šis efekts nebija statistiski ticams.

3.2.3. Mildronāta kardioprotektīvā efekta molekulāro mehānismu izpēte

3.2.3.1. Izolētas žurkas sirds infarkta modelis

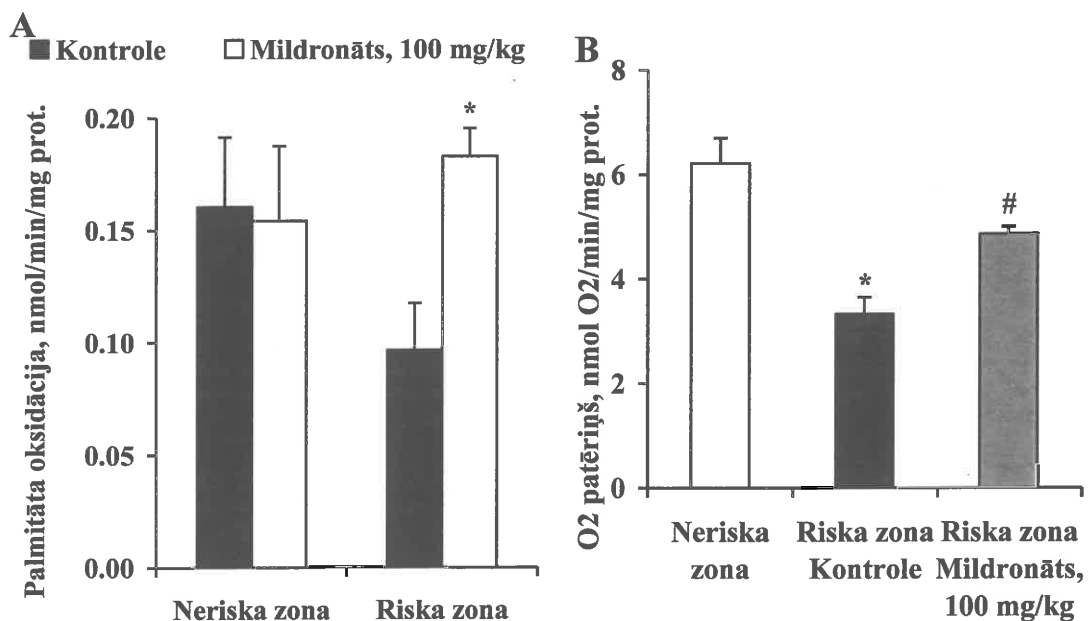
Tā kā mildronāta kardioprotektīvais un enerģijas metabolismu regulējošais efekts ir saistīts ar samazinātu L-karnitīna daudzumu (Kuka, 2012), tika noteikts, vai mildronāta ievadīšanas gadījumā, samazinot L-karnitīna daudzumu, ne tikai tiek samazināts infarkta lielums, bet arī saglabāta peroksisomu funkcija išēmiskajā miokardā pēc sirds infarkta. Kontroles un mildronāta grupām neatšķīrās sirds ritms, sirds kreisā kambara saraušanās spēks, kontrakcijas un atslābšanas ātrums, kas norāda, ka mildronāta lietošanas infarkta izmēra samazinošais efekts nav saistīts ar izmaiņām sirds veiktajā darbā. Riska zonas lielums gan kontroles, gan mildronāta grupās arī bija vienāds. Infarkta zonas lielums kontroles žurku sirdīs bija 32.5% no riska zonas, bet mildronāta ievadīšana ticami samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirds audos un infarkta izmēru par 28% (3.26. attēls).



3.26. att. Mildronāta 2 nedēļu ievadīšanas ietekme uz sirds infarkta izmēru

Rezultāti ir vidējais no 9-10 mērījumiem ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta *t* tests, $p < 0,05$)

Taukskābju oksidācijas ātrums peroksisomās, kas izolētas no sirds audu neriska zonas, kontroles un mildronāta grupās bija vienāds. Turpretī sirds audu riska zonā peroksisomu funkcija un palmitāta oksidācijas ātrums išēmijas laikā bija samazināti, bet mildronāta ievadīšana saglabāja peroksisomālo taukskābju oksidācijas ātrumu (3.27.A. attēls).



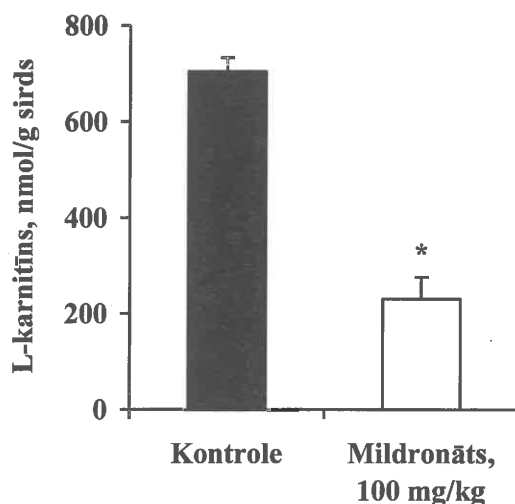
3.27. att. Mildronāta 2 nedēļu ievadīšanas ietekme uz palmitāta oksidācijas ātrumu izolētās peroksisomās (A) un sirds šķiedru ADF-stimulēto mitohondriālo elpošanu ar piruvātu/malātu un sukcinātu (B).

Rezultāti ir vidējais no 4-6 mērījumiem ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas. #Statistiski ticami atšķiras no attiecīgās išēmijas kontroles grupas (Stjudenta *t* tests vai Kruskal-Wallis tests, $p < 0,05$).

Līdzīgi permeabilizētās sirds šķiedrās, kas izolētas no sirds audu riska zonas, novēroja samazinātu ADF stimulēto skābekļa patēriņa ātrumu. Mildronāta ievadīšana saglabāja mitohondriju funkcionalitāti, daļēji saglabājot skābekļa patēriņu išēmijas laikā (3.27.B. attēls). Šie rezultāti liecina, ka samazinot L-karnitīna koncentrāciju, saglabājas peroksisomu un mitohondriju funkcionalitāte sirds išēmijas gadījumā.

3.2.3.2. L-karnitīna un taukskābju daudzums sirds audos

Iepriekš veiktajos pētījumos tika noskaidrots, ka nozīmīgu enerģijas metabolisma izmaiņu izraisīšanai, L-karnitīna daudzums sirds audos jāsamazina vismaz par 60%. Kā redzams 3.28. attēlā, L-karnitīna daudzums kontroles žurku sirdīs bija 705 ± 39 nmol/g audu, bet mildronāta ievadīšana 2 nedēļas devā 100 mg/kg statistiski ticami samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirdī 3 reizes (par 67%).

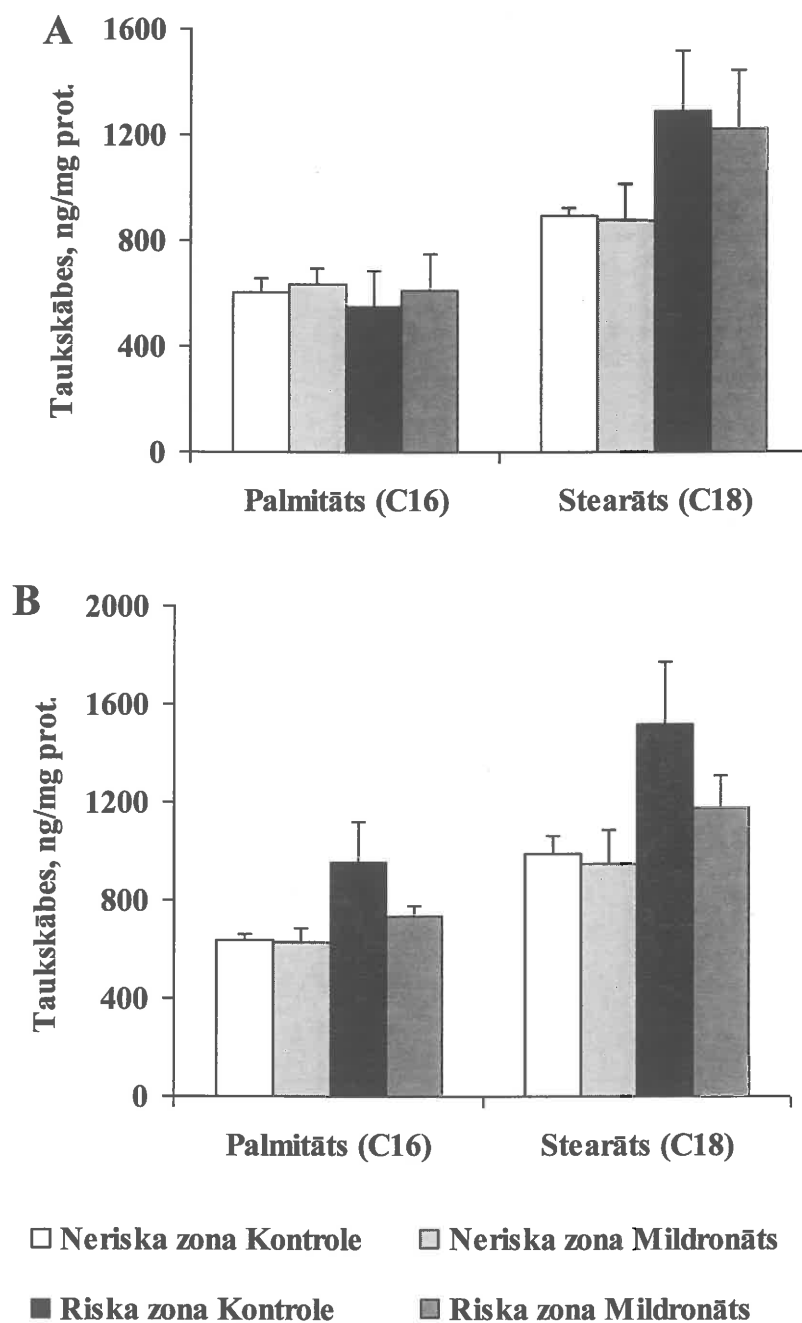


3.28. att. Mildronāta (100 mg/kg) 2 nedēļu ievadīšanas ietekme uz L-karnitīna koncentrāciju Wistar žurku sirds audos

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 10 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Student's *t* tests, $p < 0,05$)

Tā kā iepriekš veiktajos pētījumos mildronāts samazināja garķēžu taukskābju oksidāciju mitohondrijos, sirds audos bija sagaidāms palielināts garķēžu taukskābju daudzums. Lai gan L-karnitīna koncentrācija bija samazināta, ne palmitīnskābes (C16), ne stearīnskābes (C18) daudzums sirds audu neriska zonā nebija palielināts (3.29. attēls). Lai noteiktu taukskābju profila izmaiņas išēmijas un reperfūzijas laikā, tika veikta 30 min ilga sirds kreisās koronārās artērijas oklūzija un atdalītas sirds audu riska un neriska zonas. Līdzīgi sagatavoja paraugus taukskābju noteikšanai sirds audu riska un neriska zonās pēc 30 min ilgas išēmijas un sekojošas 60 min ilgas reperfūzijas. Riska

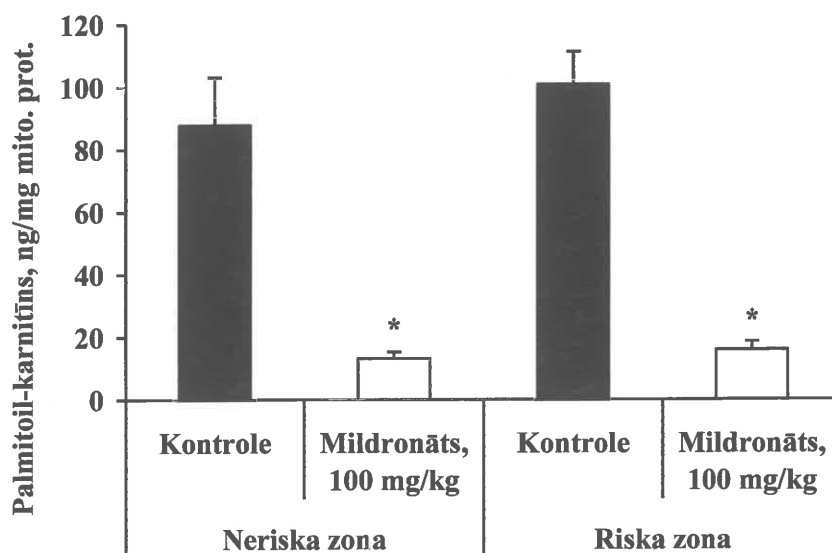
zonā išēmijas laikā novēroja garķēžu taukskābju (C16 un C18) uzkrāšanos (3.29. attēls), un mildronāta ievadīšana neietekmēja garķēžu taukskābju daudzumu sirds audos išēmijas laikā.



3.29. att. Mildronāta (100 mg/kg) 2 nedēļu ievadīšanas ietekme uz palmitāta (C16) un stearāta (C18) daudzumu neriska un riska zonā pēc 30 min išēmijas (A) un 60 min reperfūzijas (B) sirds audos.

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 4 dzīvniekos \pm SEM.

Pēc 60 min ilgas reperfūzijas kontroles žurku sirdīs riska zonā garķēžu taukskābju daudzums joprojām bija palielināts par 50% (3.29.B. attēls). Salīdzinot ar kontroles grupu, ilgstoša mildronāta ievadīšana samazināja garķēžu taukskābju daudzumu riska zonā, kas liecina par saglabātu mitohondriālo funkcionētspēju un atjaunotu taukskābju metabolismu reperfūzijas laikā.



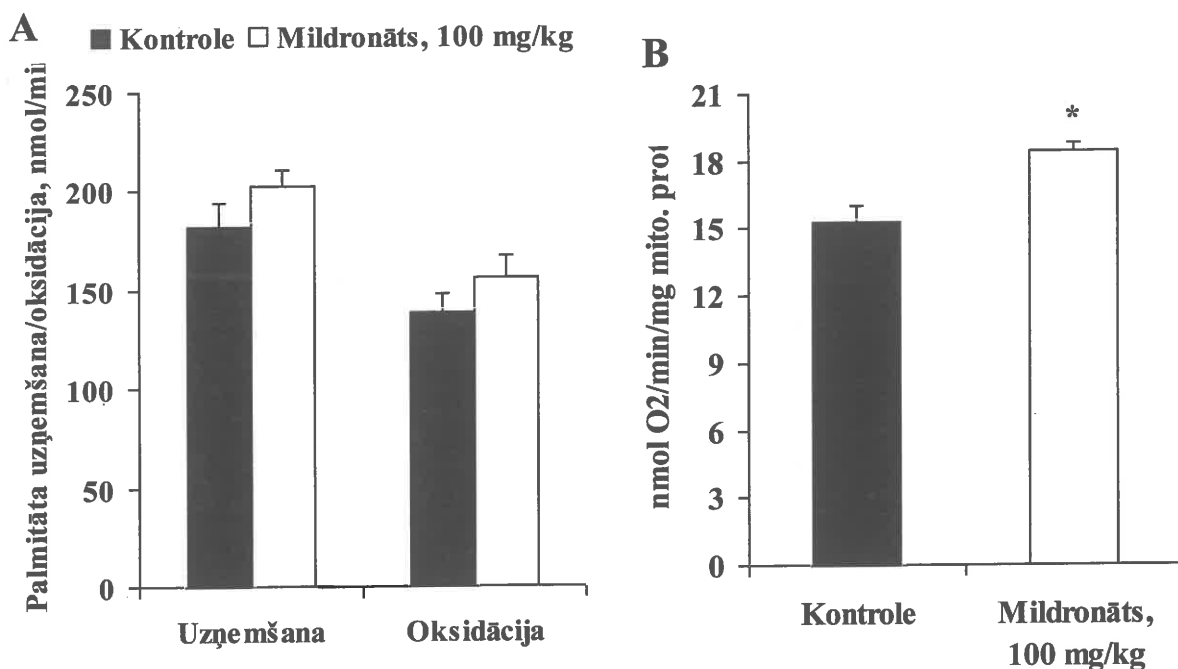
3.30. att. Mildronāta (100 mg/kg) 2 nedēļu ievadīšanas ietekme uz palmitoil-karnitīna daudzumu mitohondrijos, kas izolēti no sirds audu neriska un riska zonas pēc 30 min išēmijas.

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6-8 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta *t* tests, $p < 0,05$)

Mildronāta ievadīšana samazināja palmitoil-karnitīna daudzumu mitohondrijos gan sirds audu neriska, gan riska zonā (3.30. attēls).

3.2.3.3. Taukskābju oksidācija izolētas sirds audos un mitohondrijos

Lai noteiktu izmaiņas mitohondrijos samazināta L-karnitīna daudzuma apstākļos, tika noteikta taukskābju oksidācija sirdī un tās organellās. Nosakot garķēžu taukskābju uzņemšanu un oksidāciju izolētā sirdī, neskatoties uz L-karnitīna daudzuma samazinājumu 3 reizes, garķēžu taukskābju uzņemšana un oksidācija sirds audos normoksijā nebija izmainīta. Turklāt mildronāta ievadīšana sirds audos statistiski ticami paaugstināja mitohondriju elpošanas ātrumu ar palmitoil-karnitīnu par 20% (3.31. attēls).

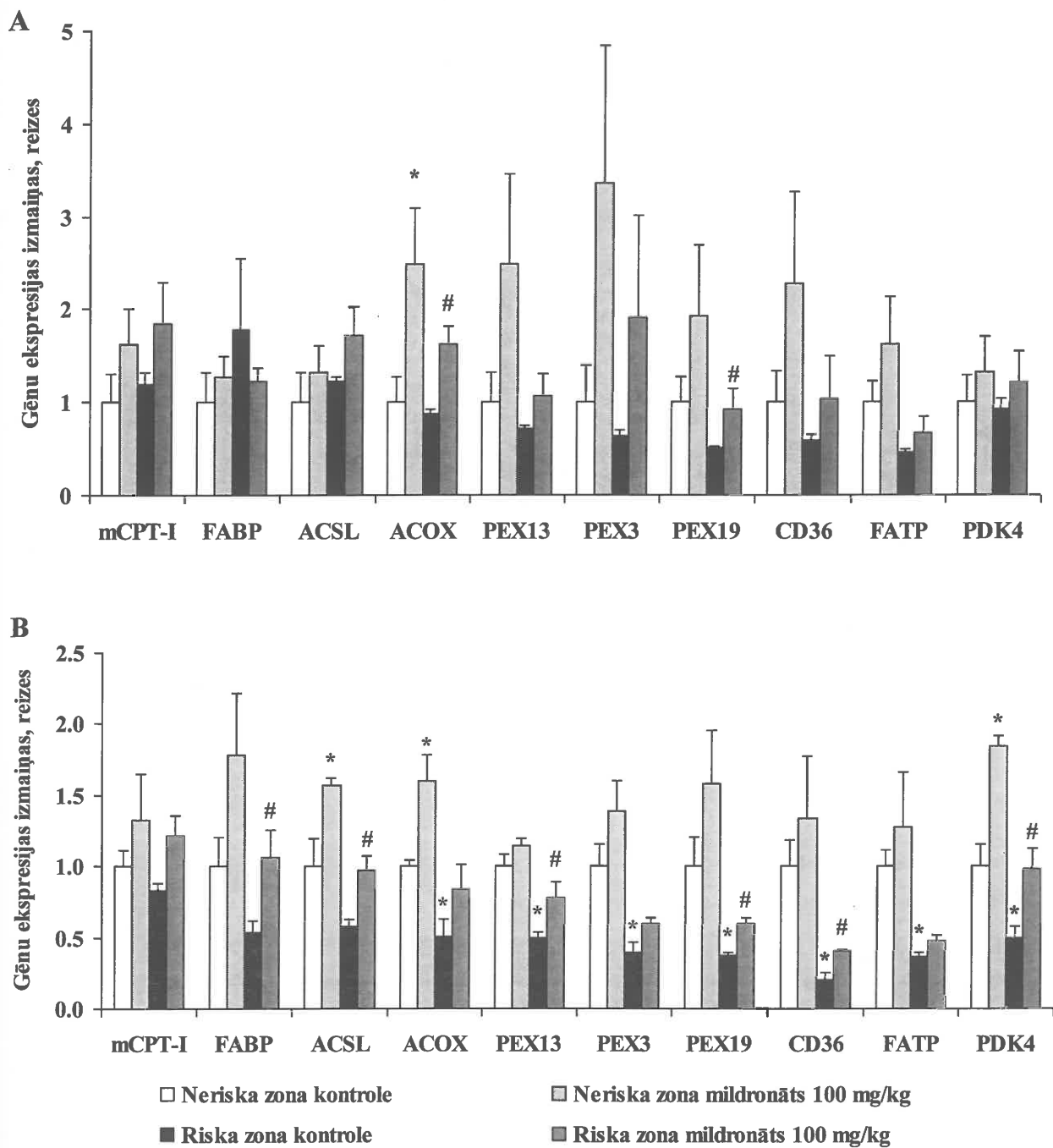


3.31. att. Mildronāta 2.nedēļu ievadīšanas ietekme uz iezīmēta palmitāta uzņemšanu un oksidāciju izolētā sirdī (A) un mitohondriālo elpošanu ar 36 μ M palmitolīkarnīnu (B)

Rezultāti ir vidējais no 5-6 mērījumiem \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontrolē grupas (Stjūdenta *t* tests, $p < 0,05$)

3.2.3.4. Taukskābju oksidācijā iesaistīto gēnu ekspresijas izmaiņas

Pēc 2 nedēļu mildronāta ievadīšanas tika noteikts glikozes un taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu mRNS daudzums sirds audos, kas izolēti no riska un neriska zonas pēc 30 min ilgas išēmijas vai sekojošas 60 min ilgas reperfūzijas. Lai gan iepriekšējos pētījumos pēc ilgstošas mildronāta ievadīšanas tika novērota stimulēta taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresija sirds audos, šajā pētījumā tikai peroksisomālajā β -oksidācijā iesaistītās ACOX mRNS daudzums bija statistiski ticami palielināts sirds audu riska un neriska zonā išēmijas laikā (3.32.A. attēls).



3.32. att. Mildronāta 2 nedēļu ievadīšanas ietekme uz taukskābju un glikozes metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju sirds audu neriska un riska zonās pēc 30 min išēmijas (A) un 30 min išēmijas/60 min reperfūzijas (B)

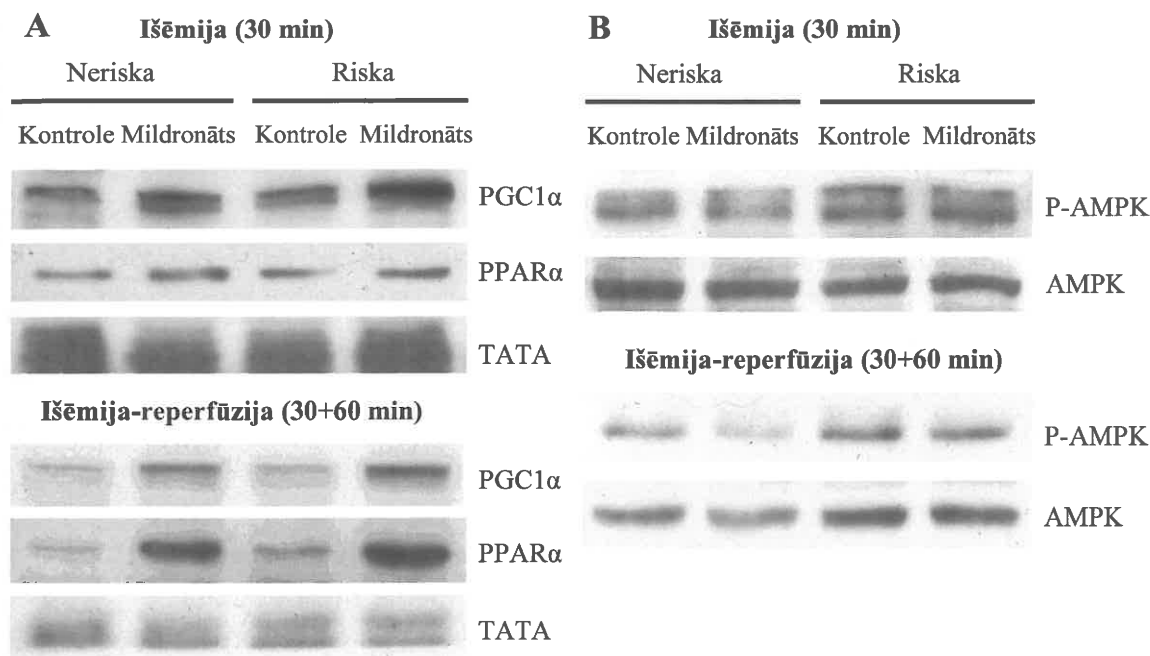
Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 4 dzīvniekos \pm SEM. *Statistiski ticami atšķiras no neriska zonas kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$). #Statistiski ticami atšķiras no riska zonas kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$)

Pēc 60 min ilgas reperfūzijas taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresija riska zonā bija statistiski ticami samazināta, bet mildronāta ievadīšana novērsa taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresijas samazināšanos (3.32.B. attēls).

3.2.3.5. PPAR α , PGC1 α , AMPK un NF- κ B daudzuma izmaiņas sirds audos

Ņemot vērā taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresijas palielināšanos, bija nepieciešams precizēt mildronāta ievadīšanas izraisīto metabolisma izmaiņu stimulētos kodolu faktoros, kas iesaistīti taukskābju metabolisma regulācijā un to signālceļos.

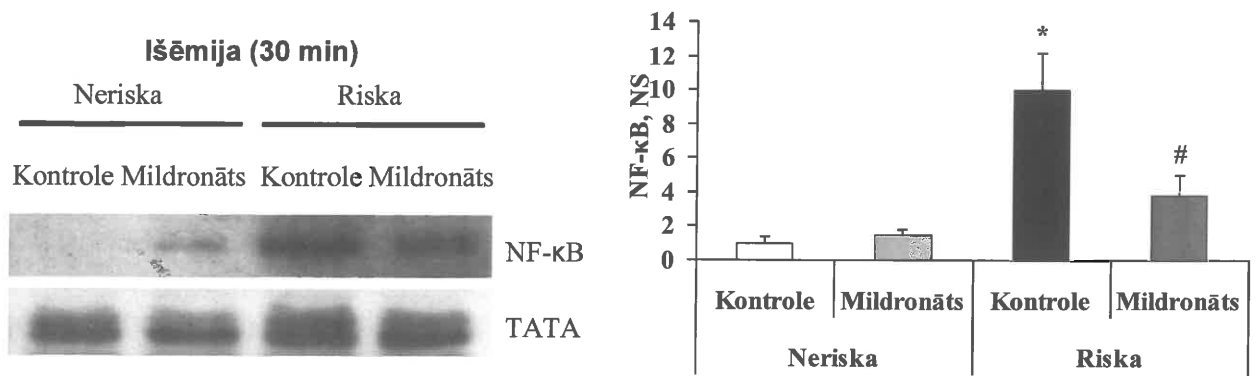
Mildronāta ievadīšana stimulēja PPAR α un PGC1 α daudzumu kodolos Wistar žurku sirds neriska un riska zonā (3.33.A. attēls).



3.33. att. Mildronāta 2 nedēļu ievadīšanas ietekme uz PPAR α , PGC1 α (A) daudzumu sirds audu kodolos un P-AMPK daudzumu citosolā (B) neriska un riska zonās pēc 30 min išēmijas un sekojošas 60 min reperfūzijas
Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 4 dzīvniekos \pm SEM

Lai noskaidrotu PPAR/PGC1 α signālceļa aktivācijas iemeslu, tika pārbaudīts fosforilētās AMPK daudzums. Riska zonā pēc 30 min išēmijas un sekojošas 60 min reperfūzijas aktivētās P-AMPK daudzums sirds audu citosolā bija palielināts 4 reizes (3.33.B. attēls). Mildronāta ievadīšanas gadījumā fosforilētās AMPK daudzums išēmijas un reperfūzijas laikā sirds audu neriska un riska zonā nemainījās vai pat bija samazināts, tāpēc PPAR/PGC1 α signālceļu aktivāciju nevar izskaidrot ar AMPK aktivitātes izmaiņām.

Metabolisma regulācija un iekaisuma procesi vai apoptoze ir saistīti ar kodolu faktoru PPAR un NF- κ B savstarpējo mijiedarbību, tāpēc tika pētīts, vai mildronāta ievadīšanas izraisīta PPAR α aktivācija ietekmē NF- κ B daudzumu kodolos.



3.34. att. Mildronāta 2 nedēļu ievadišanas ietekme uz NF-κB daudzumu sirds audu kodolos neriska un riska zonās pēc 30 min išēmijas

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 4 dzīvniekos \pm SEM. Nosacītās vienības (NS) tika aprēķinātas, standartizējot proteīna ekspresijas intensitātes rādītājus pret TATA gēna ekspresiju un neriska zonas kontroles grupu. *Statistiski ticami atšķiras no neriska zonas kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$). #Statistiski ticami atšķiras no riska zonas kontroles grupas (Manna-Vitnija tests, $p < 0,05$)

Išēmijas laikā NF-κB daudzums kodolos riska zonā palielinājās aptuveni 10 reizes (3.34. attēls), savukārt mildronāta ievadīšana, palielinot PPAR α un PGC1 α daudzumu kodolos, novērsa NF-κB pastiprināto aktivāciju. Iekaisuma gēnu ekspresija ne išēmijas, ne reperfūzijas laikā nemainījās.

3.2.4. Asins L-karnitīna koncentrācijas saistība ar cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības pakāpi 1. un 2. tipa CD pacientiem

Ņemot vērā to, ka L-karnitīns iesaistās ne vien taukskābju metabolismā, bet spēj arī ietekmēt ogļhidrātu vielmaiņu, veselu indivīdu, kā arī 1. un 2. tipa cukura diabēta pacientu asins paraugos tika mērīta brīvā L-karnitīna koncentrācija, lai noteiktu tās saistību ar asins bioķīmiskajiem rādītājiem un vēlīno komplikāciju attīstības pakāpi.

3.2.4.1. Pētījuma dalībnieku demogrāfiskie un klīniskie rādītāji

Vidējais pētījuma dalībnieku vecums kontroles un cukura diabēta slimnieku grupā bija attiecīgi 42 un 47 gadi. 43% pētījuma dalībnieku bija vīrieši. 2. tipa cukura diabēta pacienti, salīdzinot ar 1. tipa cukura diabēta pacientiem, bija vecāki, tiem bija statistiski ticami augstāks KMI , triglicerīdu, C-peptīda un kopējā holesterīna koncentrācija.

Kontroles un cukura diabēta pacientu grupu demogrāfiskie un klīniskie rādītāji

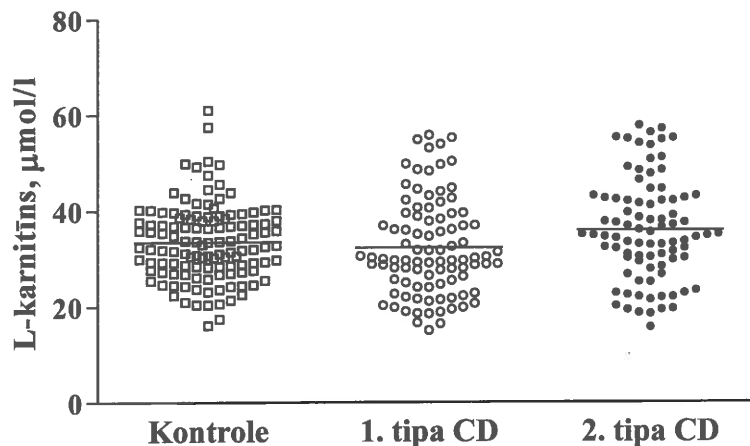
	Kontrole	1. tipa CD	2. tipa CD
Dalībnieku skaits	122	93	87
Vecums, gadi	43 ±14	39 ±14	56 ±10*
Vīriešu skaits (%)	46 (38)	45 (48)	38 (44)
CD stāžs, gadi	-	14 ±10	9 ±7
Tukšās dūšas plazmas glikoze, mM	5,0 ±0,5	9,3 ±3,6*	8,2 ±2,3*
HbA1c, %	5,1 ±0,4	9,1 ±2,0*	8,7 ±2,0*
ĶMI, kg/m ²	25,7 ±4,1	25,1 ±4,0	32,5 ±5,9*
hs-CRP, mg/l	1,5 ±1,7	2,6 ±2,2*	2,7 ±2,1*
Kopējais holesterīns, mM	5,4 ±1,0	5,6 ±1,1	6,0 ±1,2*
Triglicerīdi, mM	1,3 ±0,7	1,4 ±0,7	2,8 ±2,4*
ABL holesterīns, mM	1,5 ±0,5	1,7 ±0,5	1,3 ±0,3
ZBL holesterīns, mM	3,7 ±0,9	3,4 ±1,0	3,7 ±1,2
C-peptīds, ng/ml	2,4 ±1,1	0,4 ±0,3*	3,1 ±1,8*
Smēķētāju skaits (%)	24 (20)	41 (44)	23 (26)
Alkohola lietotāju (≥ 1 reize/nedēļā) skaits (%)	24 (20)	11 (12)*	6 (7)*
Neiropātija, n (%)	-	82 (88)	73 (84)
Retinopātija, n (%)	-	43 (46)	17 (20)
Nefropātija, n (%)	-	45 (48)	29 (33)
Hipertensija, n (%)	-	47 (50)	66 (76)

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem ± SD vai skaits (% no kopējā skaita). *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Tukey vai Kruskal-Wallis tests, p<0,05)

Cukura diabēta pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, bija statistiski ticami augstāka plazmas glikozes koncentrācija tukšā dūšā, kā arī paaugstināta asins HbA1c un hs-CRP koncentrācija (3.11. tabula).

3.2.4.2. L-karnitīna koncentrācija asins paraugos

Brīvā L-karnitīna koncentrācija kontroles grupas dalībniekiem vidēji bija 33 ±8 μmol/l. L-karnitīna koncentrācija 1. un 2. tipa cukura diabēta pacientu asins paraugos bija attiecīgi 32 ±10 un 36 ±11 μmol/l, un tā neatšķīrās no kontroles grupas (3.35. attēls). Zema L-karnitīna koncentrācija (zem 20 μmol/l) bija 9% cukura diabēta pacientu.



3.35. att. Brīvā L-karnitīna koncentrācija kontroles grupas, 1. un 2. tipa cukura diabēta pacientu asins paraugos

Rezultāti ir attēloti kā vidējais no individuāliem mērījumiem

Tā kā pētījumā tika iekļauti CD pacienti, kas ārstējās klīniskās slimnīcas "Gaiļezers" endokrinoloģijas nodaļā, CD vēlino komplikāciju sastopamības biežums bija salīdzinoši augsts - 88%. 159 no 180 pētījumā iesaistītajiem CD pacientiem bija attīstījusies kāda no slimības komplikācijām.

3.12. tabula

Vidējā L-karnitīna koncentrācija pacientiem ar vai bez komplikācijām

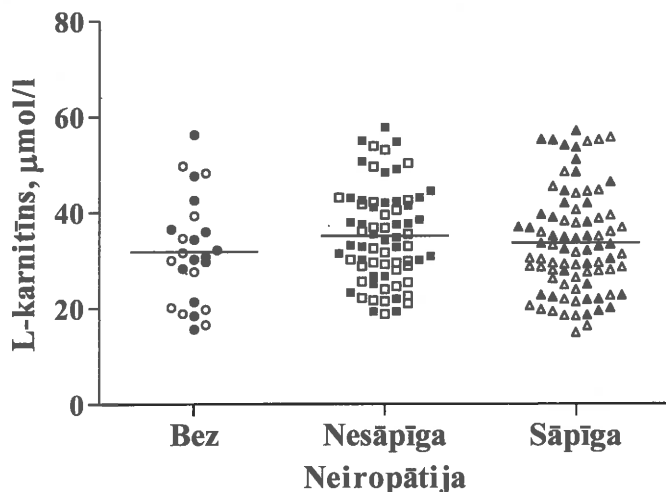
		L-karnitīns, µmol/l
Neiropātija		
Nav (n=25)		32±11
Sāpīga (n=71)		35±10
Nesāpīga (84)		34±11
Retinopātija		
Nav (n=120)		34±11
Neproliferatīva (n=40)		31±9
Preproliferatīva (n=16)		36±11
Proliferatīva ar makulas tūsku (n=4)		42±8
Nefropātija		
Nav (n=105)		32±10
Mikroalbuminūrija (n=66)		36±11
Makroalbuminūrija (n=8)		33±8
Hipertensija		
Nav (n=66)		32±11
Ir (n=113)		35±10*

*Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdentā *t* tests, $p < 0,05$)

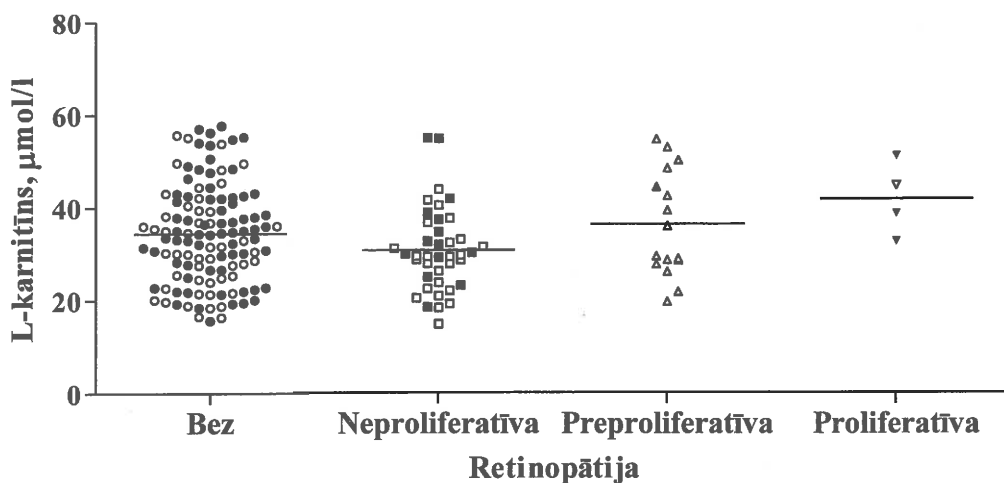
Palielinoties cukura diabēta stāžam, palielinājās arī CD komplikāciju sastopamības biežums gan 1., gan 2. tipa CD pacientu grupās. Neiropātiju diagnosticēja 86%

(155 no 180), retinopātiju 33% (60 no 180), nefropātiju 41% (74 no 180), bet hipertensiju diagnosticēja 63% (113 no 180) CD pacientu (3.12. tabula).

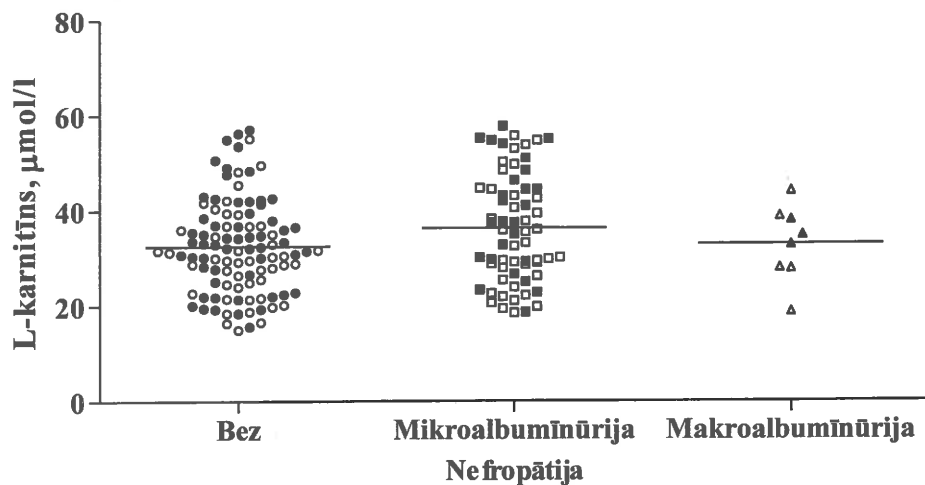
Izvērtējot vidējās brīvā L-karnitīna koncentrācijas 1. un 2. tipa cukura diabēta pacientiem ar vēlīnām komplikācijām, pacientiem ar neiropātiju, retinopātiju un nefropātiju L-karnitīna koncentrācija neatšķīrās no CD pacientiem, kuriem vēlīnā komplikācija netika diagnosticēta (3.12. tabula, 3.36., 3.37., 3.38. attēls).



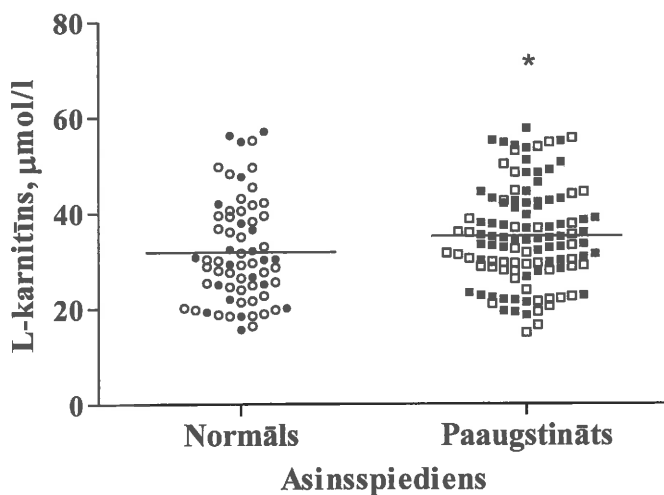
3.36. att. Brīvā L-karnitīna koncentrācija 1. (balti simboli) un 2. tipa (melni simboli) cukura diabēta pacientu asins lizātos neiropātijas gadījumā
Rezultāti ir attēloti kā vidējais no individuāliem mērījumiem



3.37. att. Brīvā L-karnitīna koncentrācija 1. (balti simboli) un 2. tipa (melni simboli) cukura diabēta pacientu asins lizātos retinopātijas gadījumā
Rezultāti ir attēloti kā vidējais no individuāliem mērījumiem



3.38. att. Brīvā L-karnitīna koncentrācija 1. (balti simboli) un 2. tipa (melni simboli) cukura diabēta pacientu asins lizātos nefropātijas gadījumā
 Rezultāti ir attēloti kā vidējais no individuāliem mērījumiem

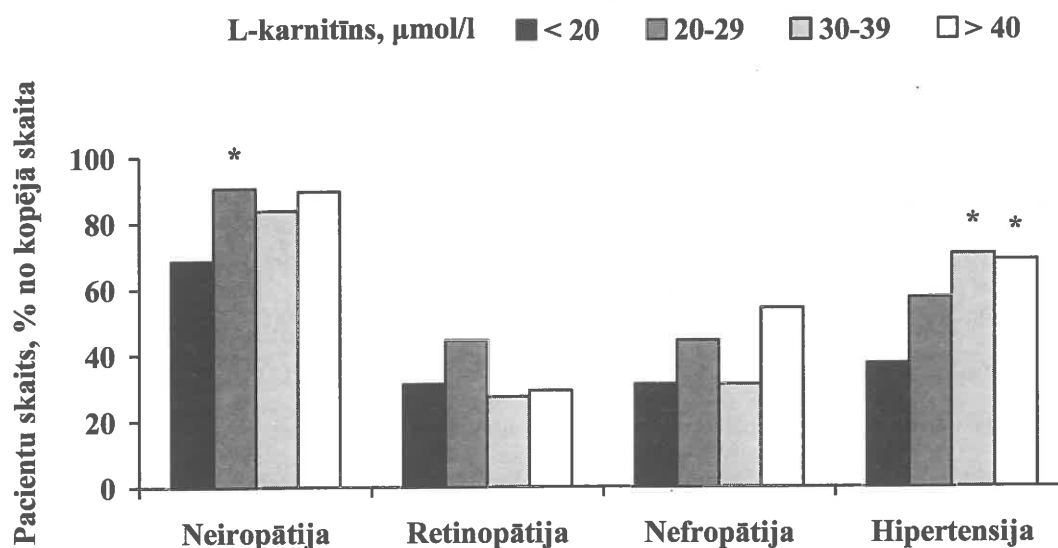


3.39. att. Brīvā L-karnitīna koncentrācija 1. (balti simboli) un 2. tipa (melni simboli) cukura diabēta pacientu asins lizātos hipertensijas gadījumā
 Rezultāti ir attēloti kā vidējais no individuāliem mērījumiem. *Statistiski ticami atšķiras no pacientu grupas bez vēlīnās komplikācijas (Stjūdenta t tests, $p < 0,05$)

Savukārt pacientiem ar hipertensiju L-karnitīna koncentrācija asinīs bija statistiski ticami lielāka, salīdzinot ar CD pacientiem bez hipertensijas (3.12. tabula, 3.39. attēls).

3.2.4.3. Cukura diabēta komplikāciju sastopamības biežums dažādās L-karnitīna koncentrācijas grupās

Nosakot komplikāciju sastopamības biežumu, pacientiem ar zemu L-karnitīna koncentrāciju (<20 μmol/l) neiropātiju diagnosticēja 69% gadījumu, savukārt pacientiem ar augstāku L-karnitīna koncentrāciju neiropātija bija 88% pacientu (3.40. attēls). L-karnitīna koncentrācija nekorelēja ar neiropātiskās simptomu un neiropātiskās deficīta skalas datiem. Pacientiem ar zemu L-karnitīna koncentrāciju retinopātija bija 31% gadījumu, kas atbilst retinopātijas gadījumu skaitam CD pacientu grupā ar augstāku L-karnitīna koncentrāciju (3.40. attēls).



3.40. att. 1. un 2. tipa cukura diabēta pacientu skaits dažādās L-karnitīna koncentrācijas grupās neiropātijas, retinopātijas, nefropātijas un hipertensijas gadījumā

Pacienti tika sadalīti grupās pēc brīvā L-karnitīna koncentrācijām asins lizātos: zemāk par 20, 20-29, 30-39 un virs 40 μmol/l. Rezultāti ir pacientu skaits procentos no kopējā pacientu skaita ar vēlīno komplikāciju. *Statistiski ticami atšķiras pacientu grupas ar zemu (<20 μmol/l) L-karnitīna koncentrāciju (Fišera tests, p<0,05)

Nefropātija pacientu grupā ar zemu L-karnitīna koncentrāciju bija 31% gadījumu, kas bija mazāk nekā pacientu grupā ar augstāku L-karnitīna koncentrāciju (42%), bet šī atšķirība nebija statistiski ticama (3.40. attēls). CD pacientiem ar zemu L-karnitīna koncentrāciju hipertensiju diagnosticēja 38% pacientu. Savukārt pacientiem ar L-karnitīna koncentrāciju virs 20 μmol/l hipertensija bija sastopama 69% pacientu, un šis rādītājs statistiski ticami atšķīrās no pacientu grupas ar zemu L-karnitīna koncentrāciju (<20 μmol/l) (3.40. attēls).

4. DISKUSIJA

Promocijas darbs veltīts jaunu enerģijas metabolisma molekulāro mehānismu noskaidrošanai, to regulēšanas iespējām un marķieru izpētei ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā. Pētījuma mērķis bija noskaidrot, vai, izmantojot glioksalāžu enzīmu aktivitātes kompleksu noteikšanu, ir iespējama diabēta vēlīno komplikāciju agrīna diagnostika un perifērās diabētiskās neiropatijas fenotipa attīstības prognozēšana, kā arī izpētīt enerģijas metabolisma regulācijas iespējas un molekulāros darbības mehānismus ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā.

4.1. Glioksalāžu aktivitātes noteikšanas metožu un uzglabāšanas apstākļu standartizēšana

Glioksalāžu sistēmas pētījumiem tika optimizēta Glo2 aktivitātes noteikšanas metode izmantošanai 96-lauciņu platītēs un izpētīta glabāšanas temperatūras ietekme uz Glo2 aktivitāti asins paraugos, lai standartizētu to uzglabāšanas apstākļus. Literatūrā visplašāk lietotās Glo1 un Glo2 aktivitātes noteikšanas metodes, nosakot absorbcijas izmaiņas 240 nm ultravioletās gaismas spektrā S-D-laktoilglutaciona veidošanās vai hidrolīzes rezultātā, paredzētas enzīmu aktivitātes mērījumiem kivetēs (Thornalley, 1988). Tā kā laboratorijas apstākļos vairāku paraugu vienlaicīgai mērīšanai piemērotāka ir spektrofotometriskā noteikšana 96-lauciņu platītēs, Glo1 un Glo2 aktivitātes noteikšanas metodes glioksalāžu sistēmas pētījumiem tika pielāgotas izmantošanai 96-lauciņu platītēs. Glo1 aktivitātes mērījumiem izmantoja iepriekš izstrādātu metodi (Konrade, 2007). Glo2 aktivitātes noteikšanas metodes standartizēšanai tika noteikta enzīma K_m un atbilstošākā substrāta koncentrācija reakcijas maisījumā. Pētījumā noteiktā Glo2 K_m vērtība cilvēku asinīs ($137 \pm 7 \mu\text{M}$) ir līdzīga no cilvēku eritrocītiem izolēta un attīrīta enzīma K_m vērtībai ($146 \pm 9 \mu\text{M}$) (Allen, 1993). Kā optimālā S-D-laktoilglutaciona koncentrācija tika izvēlēta $500 \mu\text{M}$, jo pie šādas substrāta koncentrācijas enzīma katalizētās reakcijas ātrums bija tuvu maksimālajam. Iegūtie rezultāti liecina par to, ka izstrādātā metode Glo2 enzīma aktivitātes noteikšanai 96-lauciņu platītē ir tehniski pareiza un precīza, tādēļ izmantojama paraugu mērīšanai turpmākajos eksperimentos.

Tā kā eksperimentālie un klīniskie pētījumi glioksalāžu sistēmas aktivitātes saistības novērtēšanai ar vēlīno komplikāciju attīstību ilgst vairākus mēnešus, bija

nepieciešams standartizēt un noteikt optimālus asins paraugu savākšanas un uzglabāšanas apstākļus. Uzglabājot paraugus 28 dienas -20°C un -80°C temperatūrā, tika konstatētas tikai nenožīmīgas enzīma aktivitātes izmaiņas. Interesanti, ka, uzglabājot paraugus $+4^{\circ}\text{C}$, tika novērots Glo2 aktivitātes pieaugums līdz pat 61%, taču eksperimenta beigās enzīma aktivitāte samazinājās līdz sākotnējam līmenim. Mūsu pētījumā konstatētās Glo2 aktivitātes izmaiņas noteiktajos uzglabāšanas apstākļos sakrīt ar iepriekš veikta pētījuma rezultātiem (McLellan, 1992). Glo2 aktivitātes izmaiņas, uzglabājot paraugus $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūrā, varētu skaidrot ar enzīma aktīvo centru telpiskās konformācijas maiņu un vēlāku degradāciju (Limphong, 2010), tomēr precīzai šī procesa mehānismu noskaidrošanai nepieciešami papildus pētījumi. Pārbaudot Glo2 aktivitātes stabilitāti -80°C , kas ir tradicionāla bioloģisko paraugu ilgstošas uzglabāšanas metode, tika novērots neliels aktivitātes samazinājums. Līdzšinējā pētījumā par glioksalāžu enzīmu glabāšanas apstākļiem uzglabāšana -80°C netika pārbaudīta (McLellan, 1992), savukārt pētījumā noteiktā uzglabāšana -196°C klīnikas apstākļos nav piemērota. Savukārt iepriekš veiktā pētījumā par Glo1 aktivitātes noteikšanas un uzglabāšanas apstākļiem tika novērots, ka, asins paraugus sasaldējot, enzīma aktivitāte samazinājās pat par 30-50% (Konrade, 2007). Asins paraugi turpmākajiem pētījumiem pēc savākšanas īslaicīgi tika uzglabāti $+4^{\circ}\text{C}$, Glo1 un Glo2 aktivitāte tika noteikta neilgi pēc paraugu savākšanas, bet ilgstošai paraugu uzglabāšanai izmantoja paraugu sasaldēšanu -80°C temperatūrā.

Papildus glioksalāžu enzīmu aktivitātes noteikšanas metodēm pētījumā tika izstrādāta plūsmas citometrijas analīzes metode GLO1 proteīna ekspresijas noteikšanai leukocītos. Lai gan eritrocīti ir galvenais glioksalāžu aktivitātes avots asinīs, arī leukocītos ir atrasta glioksalāžu enzīmu sistēma (Ratliff, 1996, Thornalley, 1987). Tā kā leukocītu izolēšanai ir nepieciešams lielāks asins parauga daudzums un īpašas izolēšanas metodes, glioksalāžu sistēma leukocītos ir mazāk pētīta. Plūsmas citometrijas analīze ir jutīga metode iekššūnu proteīnu noteikšanai, kad šūnas to ekspresē ļoti mazos daudzumos (Basu, 2010, Pandzic, 2010). Mūsu pētījumā tika konstatēts nedaudz paaugstināts GLO1 proteīna ekspresijas indekss visās leukocītu populācijās 1. un 2. tipa CD pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu. Paaugstināta Glo1 aktivitāte mononukleārajās un polimorfonukleārajās šūnās 1. tipa CD pacientiem ar komplikācijām tika novērota arī iepriekš (Ratliff, 1996). Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka plūsmas citometrijas analīzes metode ir piemērota GLO1 proteīna ekspresijas noteikšanai cilvēku leukocītos, kas ļaus padziļināti izpētīt glioksalāžu enzīmu ekspresijas saistību ar neenzimātiskas glikēšanas stresa izraisītiem šūnu bojājumiem.

4.2. Glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņas diabēta gadījumā

Izvērtējot glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņas līdz šim lielākajam pacientu un kontroles indivīdu skaitam, novērojām, ka Glo1 aktivitāte asins lizātos 1. un 2. tipa CD pacientiem ir palielināta par 10%, salīdzinot ar cilvēkiem bez CD. Savukārt Glo2 aktivitāte asins lizātos cilvēkiem bez CD un CD pacientiem neatšķīrās, taču jāņem vērā fakts, ka Glo2 aktivitāte noteikta tikai nelielam skaitam pētījuma dalībnieku. Literatūrā atrodama pretrunīga informācija par glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņām CD gadījumā. Pētījumos in vitro apstākļos, īslaicīgi inkubējot cilvēku eritrocītus vidē ar augstu glikozes koncentrāciju, enzīmu substrātu, metilglioksāla un S-D-laktoilglutaciona, koncentrācijas šūnās palielinājās 2-3 reizes, tomēr Glo1 un Glo2 aktivitāte, līdzīgi kā mūsu pētījumā, būtiski nemainījās (Thornalley, 1988). Arī vienā no pirmajiem klīniskajiem pētījumiem par glioksalāžu enzīmu aktivitāti CD pacientiem, neskatoties uz paaugstinātām enzīmu substrātu koncentrācijām, Glo1 un Glo2 aktivitāte eritrocītos neatšķīrās no kontroles grupas (Thornalley, 1989). Savukārt citā klīniskajā pētījumā 1. un 2. tipa CD pacientiem gan glioksalāžu sistēmas metabolītu - metilglioksāla, S-D-laktoilglutaciona un D-laktāta - koncentrācijas, gan enzīmu aktivitātes bija palielinātas (McLellan, 1994). 1. un 2. tipa CD pacientiem eritrocītu Glo1 aktivitāte bija paaugstināta par 30-40%, bet Glo2 aktivitāte bija augstāka par 11% tikai 2. tipa CD pacientiem, salīdzinot ar veselīgiem indivīdiem (McLellan, 1994). Paaugstinātas glioksalāžu sistēmas metabolītu koncentrācijas diabēta gadījumā liecina par metilglioksāla metabolisma stimulāciju hiperglikēmijas apstākļos (Thornalley, 1988), kas varētu veicināt aizsardzības sistēmas aktivāciju un glioksalāžu enzīmu aktivitātes palielināšanos. Tomēr neatkarīgi no asins glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņām, enzīmu sistēmas darbība tomēr nespēj kompensēt pieaugošo metilglioksāla daudzumu šūnās (Thornalley, 1995).

Izvērtējot Glo1 aktivitāti ietekmējošus faktorus, interesanti, ka 1. tipa CD pacientiem ar sliktu glikēmijas kontroli augstāka Glo1 aktivitāte ir saistīta ar mikrovaskulāro komplikāciju attīstību (McLellan, 1994, Ratliff, 1996). Tā kā HbA1C koncentrācijas CD pacientiem nekorelēja ar glioksalāžu enzīmu aktivitātēm leikocītos, pētījuma autori secināja, ka glikozes koncentrācijas izmaiņas neietekmē Glo1 un Glo2 aktivitāti (Ratliff, 1996), kas ir saskaņā ar mūsu pētījuma rezultātiem, jo netika novērota izmainīta Glo1 aktivitātes saistība ar glikozes, HbA1C vai lipīdu koncentrācijām. Glo1 aktivitāte asins lizātos nekorelēja ar noteiktajiem klīniskajiem parametriem ne kontroles

grupā, ne 2. tipa CD pacientiem. Lai gan iepriekš aprakstītas ar novecošanos un palielinātu oksidatīvo stresu saistītas Glo1 aktivitātes izmaiņas (Sharma-Luthra, 1994), šajā pētījumā ticama saistība starp Glo1 aktivitāti un vecumu ne kontroles, ne CD pacientu grupās netika novērota. Mūsu pētījumā 1. tipa CD pacientiem samazināta Glo1 aktivitāte korelēja ar lielāku CD stāžu, tomēr 2. tipa CD pacientiem šāda saistība netika novērota. Interesanti, ka iepriekš veiktajā klīniskajā pētījumā tikai 1. tipa CD pacientiem novēroja paaugstinātas metilglioksāla koncentrācijas saistību ar CD stāžu (McLellan, 1994).

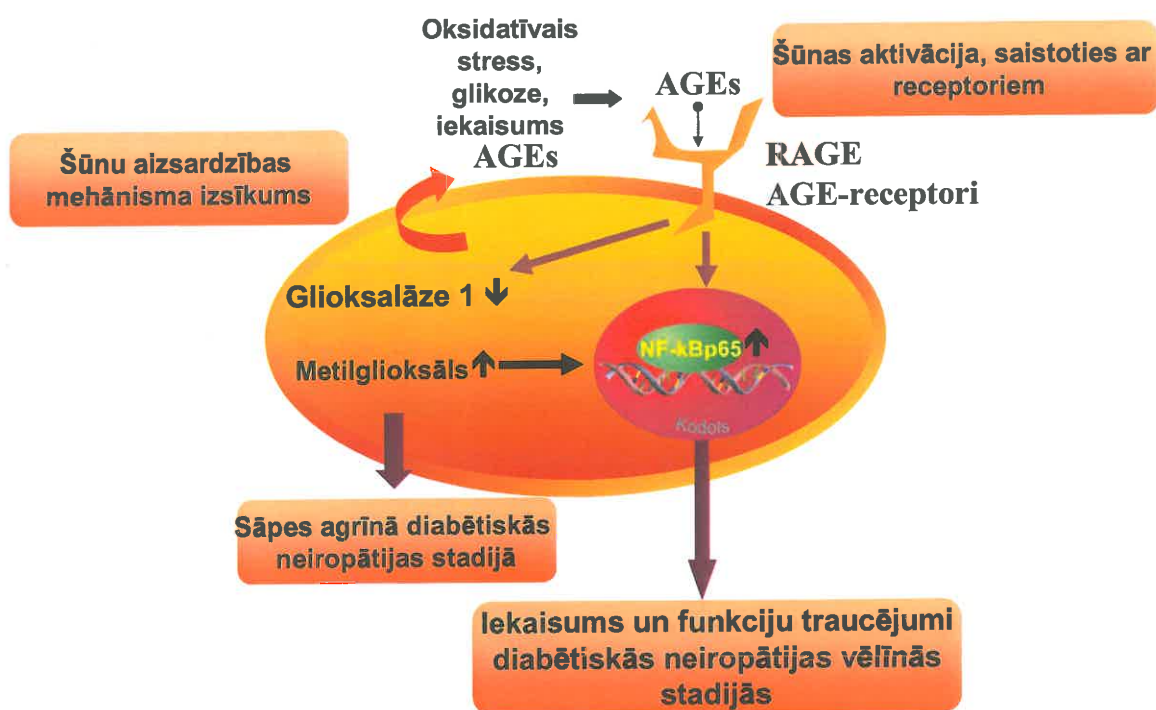
Eksperimentālajā pētījumā 24 nedēļu vecām *Goto-Kakizaki* žurkām ar mērenu hiperglikēmiju un izteiktiem glikozes tolerances traucējumiem nenovēroja nozīmīgas Glo1 un Glo2 aktivitātes izmaiņas asins lizātos, savukārt neironālajos audos Glo1 un Glo2 aktivitāte bija ticami samazināta. *Zucker fa/fa* žurkām attīstījās izteikta hipertrigliceridēmija, aptaukošanās un paaugstinātu lipīdu izraisīta insulīna rezistence, savukārt Glo1 aktivitāte *Zucker fa/fa* žurku asins un audu paraugos neatšķīrās no kontroles grupas. Glo2 aktivitātes izmaiņas kopumā bija līdzīgas Glo1, kas ir vissvarīgākais metilglioksālu detoksificējošais enzīms, aktivitātes izmaiņām. Papildus tam mūsu rezultāti liecina, ka Glo1 aktivitāte *Goto-Kakizaki* un *Zucker* žurku asinīs un neironālajos audos bija 3-4 reizes augstāka, salīdzinot ar Glo2 aktivitāti. Glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņas *Goto-Kakizaki* žurku asins lizātos ir saskaņā ar iepriekš veiktiem eksperimentālajiem pētījumiem, kas parāda, ka Glo1 un Glo2 aktivitātes streptozotocīna izraisīta diabēta žurku eritrocītos nebija izmainītas (Nagaraj, 2002, Phillips, 1993). Tomēr streptozotocīna izraisīta diabēta žurkām Glo1 aktivitāte sēžas nerva un smadzeņu audos neatšķīrās no kontroles dzīvniekiem (Brouwers, 2011, Phillips, 1993), kas bija salīdzinoši jaunāki kā mūsu pētījumā izmantotie dzīvnieki. Līdz šim vienīgajā glioksalāžu enzīmu sistēmas pētījumā eksperimentālajā aptaukošanās modelī Glo2 aktivitāte bija palielināta ob/ob peļu eritrocītos (Atkins, 1989), līdzīgi mūsu pētījumā novērotajām Glo2 aktivitātes izmaiņām *Zucker fa/fa* žurkām. Lai gan Glo1 aktivitāte *Zucker fa/fa* žurku asinīs neatšķīrās no kontroles *Zucker lean* žurkām, asins Glo1 aktivitāte līdzīga vecuma ob/ob pelēm bija samazināta (Atkins, 1989). Līdzšinējos pētījumos Glo1 un Glo2 aktivitātes izmaiņas eksperimentālajos diabēta dzīvniekos atšķiras atkarībā no eksperimentālā modeļa, dzīvnieku vecuma un CD stāža. Glo1 aktivitāte *Goto-Kakizaki* žurku hipotalāmā, muguras smadzenēs un sēžas nervā negatīvi korelēja ar plazmas glikozes un triglicerīdu koncentrāciju. Aptaukošanās un hipertrigliceridēmijas modelī nenovēro ne asins, ne audu Glo1 aktivitātes izmaiņas,

savukārt Glo2 aktivitāte ir izmainīta tikai Zucker fa/fa žurku asinīs. Kopumā iegūtie rezultāti apliecina, ka eksperimentālajā 2. tipa CD modelī hiperglikēmijas apstākļos neironālo audu Glo1 ir jutīgāka kā asins Glo1 pret diabēta izraisīto bioķīmisko parametru izmaiņām.

Mūsu pētījumā 24 nedēļu vecām *Goto-Kakizaki* žurkām pirms neironālo audu funkcionālo traucējumu attīstības, Glo1 aktivitāte ir samazināta galvas, muguras smadzeņu un sēžas nerva audos. Lai gan audos iespējama RAGE receptoru aktivēšanas izraisīta iekaisuma signālceļu regulēta Glo1 enzīma ekspresijas samazināšanās (Rabbani, 2011, 4.1. attēls), mūsu pētījumā GLO1 gēnu ekspresija nebija izmainīta. Tādējādi Glo1 aktivitātes izmaiņas mūsu pētījumā nevar izskaidrot ar iekaisumu veicinošās signālsistēmas aktivitātes palielināšanos ekspresijas līmenī, bet drīzāk tās atspoguļo glikozes toksicitātes izraisītās pārmaiņas glioksalāžu sistēmā, piemēram, samazinoties reducētā glutationa iekššūnu koncentrācijai (Thornalley, 2003). Jāatzīmē, ka eksperimentālajam *Goto-Kakizaki* žurku modelim raksturīga lipo- un glikotoksicitāte un neironālo audu Glo1 aktivitāte korelē ar minētajiem parametriem. Tā kā Glo1 aktivitāte būtiski nemainās *Zucker fa/fa* žurkām, jāsecina, ka paaugstināta lipīdu koncentrācija nav noteicošais faktors Glo1 aktivitātes regulācijā.

4.3. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar vēlino komplikāciju attīstību

Mūsu pētījuma rezultāti apliecina, ka samazināta Glo1 aktivitāte asins lizātos ir saistīta ar sāpīgas neiropātijas attīstību gan 1., gan 2. tipa cukura diabēta pacientiem. Turklāt dažādos eksperimentālajos peļu modeļos izpētīts, ka atšķirīga GLO1 ekspresija peptīderģiskajos sensorajos neironos nosaka ievērojamas atšķirības mehāniski izraisītā sāpju sajūtas iztverē, kas liecina par Glo1 lomu neiropātijas fenotipa attīstībā (Jack, 2011). Nesen noskaidrots, ka metilglioksāla koncentrācija asins plazmā virs 600 nM nosaka sāpīgas neiropātijas simptomus 2. tipa CD pacientiem, un līdzīga metilglioksāla izraisīta hiperalgēzija novērota arī eksperimentālajos GLO+/- un diabēta peļu modeļos (Bierhaus, 2012). Lai gan iepriekšējo pētījumu rezultāti liecina, ka CD pacientiem ar vēlīnām komplikācijām bija augstāka Glo1 aktivitāte (McLellan, 1994, Ratliff, 1996, Thornalley, 1989), tomēr līdzšinējos klīniskajos pētījumos Glo1 aktivitātes saistība ar perifērās neiropātijas fenotipa attīstību nebija pētīta.



4.1. att. AGE un Glo1 loma CD vēlīno komplikāciju attīstībā

Mūsu pētījumā noteicām gan NSS, gan NDS kā subjektīvus sāpju uztveres un objektīvus neiropatiskā deficīta mērījumus, izmantojot iepriekš aprakstītas metodes (Doupis, 2009, McIntosh, 2003). Glo1 aktivitāte bija ievērojami samazināta pacientiem ar izteiktiem sāpīgas neiropatijas simptomiem gan 1., gan 2. tipa CD diabēta gadījumā, bet neatšķīrās dažādās NDS grupās. Iepriekšējos pētījumos pacientiem ar sāpīgu neiropatiju novērotas paaugstinātas CRP koncentrācijas, kas liecina, ka iekaisuma process un endotēlija disfunkcija ir saistīti ar perifēro sensibilizāciju, attīstoties sāpju sajūtai un diabētiskai neiropatijai (Doupis, 2009, Herder, 2009). Mūsu pētījuma rezultāti tomēr neapstiprina CRP saistību ar sāpīgas neiropatijas attīstību, ko varētu skaidrot ar pētījumā iekļauto pacientu sliktu metabolo kontroli, kas saistīta ar paaugstinātu CRP daudzumu 1. (Jenkins, 2008) un 2. tipa (Arnalich, 2000) CD gadījumā. ADA rekomendācijās CD pacientiem vēlāmā HbA1c koncentrācija nedrīkst pārsniegt 7.0%, savukārt EASD vadlīnijās HbA1c koncentrācijai CD pacientiem jābūt mazākai par 6.5%. CD pacienti Latvijas populācijā kopumā raksturojas ar sliktu metabolo kontroli, ko nosaka vidējās HbA1c koncentrācijas. Arī mūsos pētījuma Rīgas Austrumu klīniskās universitātes slimnīcas „Gaiļezers” Endokrinoloģijas nodaļas pacientiem HbA1c koncentrācija 1. tipa CD gadījumā ir 8.6%, bet 2. tipa CD gadījumā - 7.9%, kas atbilst sliktai metabolai kompensācijai un nesasniedz vadlīniju mērķa rādītājus. Līdz ar to

paaugstināta CRP koncentrācija tika konstatēta gan pacientiem ar diabētisko neiropātiju bez sāpēm, gan sāpīgas diabētiskās neiropātijas gadījumā. Jāņem vērā, ka 2. tipa CD patoģenēze ir ļoti heterogēna, līdz ar to gan glikēšanās stress, gan ar iekaisumu saistītie procesi varētu sinerģiski veicināt CD vēlīno komplikāciju attīstību, atšķirīgi izpaūzoties dažādās CD pacientu grupās.

Tā kā CD pacientu grupām ar sāpīgu un nesāpīgu perifēro neiropātiju bija atšķirīgs vecums un CD stāžs, tika veikta multivariantā regresijas analīze, lai novērtētu neatkarīgu Glo1 aktivitātes izmaiņu saistību ar sāpīgas perifērās neiropātijas attīstību. Multivariantā analīze liecina, ka, Glo1 aktivitātei palielinoties par 1 vienību, sāpīgas neiropātijas risks samazinās vidēji par 10%, neatkarīgi no vecuma, diabēta ilguma un KMI. Lai gan iegūtie rezultāti liecina, ka vecums un CD stāžs nav saistīti ar sāpīgas perifērās neiropātijas risku 1. un 2. tipa CD gadījumā, tomēr izslēgt šo faktoru iespējamo ietekmi uz Glo1 aktivitāti pilnībā nav iespējams. Nelielais pacientu skaits CD pacientu grupā bez neiropātijas neļāva veikt atbilstošu Glo1 aktivitātes salīdzinājumu ar CD pacientiem, kam bija diagnosticēta neiropātija. Lai gan novēroto Glo1 aktivitātes izmaiņu regulatorie molekulārie mehānismi nav skaidri, mūsu pētījuma rezultāti apliecina, ka samazināta Glo1 aktivitāte ir saistīta ar palielinātu sāpju sajūtu. Kopumā pētījums pirmo reizi parāda, ka 1. un 2. tipa CD pacientiem ar sāpīgu perifēro neiropātiju ir samazināta Glo1 aktivitāte, kā arī 1. tipa CD pacientiem Glo1 aktivitāte negatīvi korelē ar CD ilgumu. Iegūtie rezultāti apliecina Glo1 aktivitātes izmaiņu nozīmi perifērās neiropātijas fenotipa attīstībā.

Glo1 aktivitāte *Goto-Kakizaki* žurku neironālajos audos ir samazināta par 10-36%, tomēr ne *Goto-Kakizaki*, ne *Zucker fa/fa* žurkām nenovēro izmaiņas ne mehāniski, ne termiski izraisīto sāpju sajūtu uztverē, salīdzinot ar kontroles grupu. Tas varētu liecināt par neironālās Glo1 aktivitātes saistību ar agrīniem bojājumiem diabēta un aptaukošanās procesu attīstībā, jo abos eksperimentālajos modeļos 24 nedēļās jau bija attīstījusies, piemēram, endotēlija disfunkcija. Arī iepriekš veiktos pētījumos parādīts, ka izmaiņas acetilholīna-izraisītā asinsvadu reaktivitātē *Zucker fa/fa* žurkām attīstās pirms neirālās funkcijas traucējumiem (Oltman, 2005), *Zucker* žurkām ar aptaukošanos un normālu glikozes koncentrāciju vaskulārā un neirālā disfunkcija attīstās 32-40 nedēļu vecumā (Oltman, 2005, Oltman, 2008). Endotēlija-atkarīgie asinsvadu relaksācijas traucējumi aprakstīti gan *Zucker fa/fa* (Serpillon, 2009, Walker, 1999), gan *Goto-Kakizaki* (Cheng, 2005, Gupte, 2010) žurkām. Brouwers ar līdzstrādniekiem 2010. gadā parādīja, ka palielināta GLO1 ekspresija aizkavē oksidatīvā stresa un endotēlija-atkarīgā

apzarņa artēriju relaksācijas traucējumus diabēta žurkām, norādot paaugstināta metilglioksāla nozīmi oksidatīvā stresa un vaskulārās disfunkcijas attīstībā diabēta gadījumā (Brouwers, 2010). Mūsu pētījuma rezultāti apliecina, ka *Goto-Kakizaki* žurkām ar augstāku neironālo audu Glo1 aktivitāti ir labāk saglabāta endotēlija funkcija. Neironālo audu Glo1 aktivitāte pozitīvi korelē ar aortu endotēlija-atkarīgo reaktivitātes funkciju *Goto-Kakizaki* žurkām, bet ne ar acetilholīna-izraisītu aortu maksimālo relaksāciju *Zucker* žurkām. Turklāt asins Glo1 aktivitāte nekorelē ar endotēlija funkciju ne *Goto-Kakizaki*, ne *Zucker* žurku eksperimentālajā modelī. Kopumā var secināt, ka asins Glo1 aktivitāte neatspoguļo asinsvadu endotēlija funkcionālo stāvokli 2. tipa CD un metabolā sindroma eksperimentālajos modeļos. Mūsu eksperimentālā pētījuma rezultāti liecina, ka asins lizātu Glo1 aktivitāte nav izmainīta, attīstoties agrīniem vaskulāriem bojājumiem, tomēr Glo1 aktivitātes mērījumi varētu būt noderīgi vēlīno komplikāciju attīstības pētījumiem CD vēlīnās stadijās.

Nesen noskaidrots, ka 2. tipa CD ir viens no izzīņas funkcijas traucējumu attīstības riska faktoriem (Reijmer, 2010). Mūsu pētījumā *Zucker falfa* un *Goto-Kakizaki* žurkām eksperimenta beigās tika novēroti darbības atmiņas traucējumi. Izzīņas funkciju traucējumu patoģenēze ir izprasta tikai daļēji, tomēr daudzi pētījumi liecina, ka smadzeņu struktūru un funkciju defekti saistīti ar hiperglikēmijas izraisītiem bojājumiem, ko veicina poliolu signālceļa un proteīnkināzes C aktivēšana, kā arī AGE uzkrāšanās. Arī makrovaskulārās komplikācijas un insulīna rezistence veicina atmiņas traucējumu attīstību 2. tipa CD un aptaukošanās gadījumā (Abdul-Rahman, 2012, de la Monte, 2010, Vijayakumar, 2012). Mūsu pētījuma rezultāti liecina par samazinātu Glo1 aktivitāti hiperglikēmijas, traucētas endotēlija-atkarīgās asinsvadu relaksācijas un smadzeņu izzīņas darbības apstākļos, vēl pirms nosakāmām sāpju sajūtas izmaiņām. Papildus tam tomēr jāsecina, ka asins Glo1 un Glo2 aktivitātes nav izmantojamas kā agrīni marķieri CD vēlīno komplikāciju attīstības raksturošanai eksperimentālajos 2. tipa CD un metabolā sindroma modeļos.

4.4. Enerģijas metabolisma regulācija eksperimentālajos ogļhidrātu un lipīdu vielmaiņas patoloģiju modeļos

Eksperimentālajā aptaukošanās un metabolā sindroma modelī (Zucker žurkās) tika pārbaudīta mildronāta lietošanas ietekme, hiperlipidēmijas un insulīna rezistences izraisītu bojājumu samazināšanas iespējas, kā arī izraisītās izmaiņas tika salīdzinātas ar pirmās izvēles medikamenta diabēta ārstēšanai – metformīna lietošanas izraisītiem efektiem. Noskaidrojām, ka ilgstoša mildronāta un metformīna ievadīšana Zucker žurkās vienādā mērā samazināja glikozes un insulīna koncentrāciju asinīs, turklāt mildronāta ievadīšana kombinācijā ar metformīnu samazināja svara pieaugumu un uzlaboja insulīna jutību. Aptaukošanās un metabolā sindroma galvenā iezīme ir insulīna rezistence, ko raksturo samazināta glikozes uzņemšana un oksidācija insulīna-jutīgajos audos (Shulman, 2000). Insulīna rezistence veicina enerģijas metabolisma traucējumu attīstību, kas izpaužas kā samazināta šūnu pielāgošanās spēja enerģijas substrātu izmantošanā (Larsen, 2008). Metabolā sindroma gadījumā ir ievērojami paaugstināts risks gan 2. tipa CD, gan kardiovaskulāro slimību attīstībai, turklāt vielmaiņas traucējumi un lipotoksicitāte saistīti ar palielinātu taukskābju uzkrāšanos šūnu organellās, galvenokārt mitohondrijos (Koves, 2008b, McGarry, 1983, Wang, 2007), tādējādi insulīna jutības palielināšana un taukskābju metabolisma regulācija varētu uzlabot rādītājus ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā. Mildronāta lietošana, samazinot L-karnitīna pieejamību, daļēji samazina KPT I atkarīgo taukskābju transportu un novērš taukskābju uzkrāšanos mitohondrijos (Asaka, 1998, Kirimoto, 1996, Spaniol, 2003). Iepriekš parādīts, ka mildronāta ievadīšana samazina KPT I aktivitāti un no KPT I atkarīgo garķēžu taukskābju β -oksidāciju mitohondrijos (Kuka, 2012, Simkhovich, 1988). Metformīns, inhibējot glikoneoģenēzi un aizkavējot glikozes uzsūkšanos kuņģa-zarnu traktā, veicina glikozes metabolismu un samazina postprandiālās glikozes koncentrāciju (Bailey, 1996, Wiernsperger, 1999). Akūta mildronāta ievadīšana, pretēji metformīnam, nesamazināja glikozes koncentrāciju ēdušām *Zucker fa/fa* žurkām, kas varētu liecināt par to, ka mildronāta ievadīšana tieši neietekmē glikozes absorbciju zarnās. Arī izolētās peļu sirdīs mildronāta pievienošana perfūzijas buferšķīdumam, kā arī akūta mildronāta ievadīšana pelēm neietekmēja glikozes koncentrāciju asinīs un uzņemšanu sirds audos, savukārt ilgstoša mildronāta ievadīšana (20 dienas) veicināja insulīna atkarīgo glikozes uzņemšanu un metabolismā iesaistīto proteīnu (GLUT4, HK II un InsR) ekspresijas palielināšanos sirds audos (Liepinsh, 2008). Līdzīgi novērots, ka

mildronāta 6 - 8 nedēļu lietošana samazina glikozes koncentrāciju asinīs un aizkavē vēlīno komplikāciju attīstību 1. tipa CD (Sokolovska, 2011a, Sokolovska, 2011b) un 2. tipa CD eksperimentālajos modeļos (Liepinsh, 2009a). Mildronāta lietošana, īpaši kombinācijā ar metformīnu, palielināja ar taukskābju uzņemšanu un oksidāciju saistīto gēnu ekspresiju aptaukošanās un metabolā sindroma modelī. Pētījumu rezultāti norāda, ka ilgstoša mildronāta lietošana ir nepieciešama, lai sasniegtu enerģijas metabolismā iesaistīto gēnu un proteīnu ekspresijas izmaiņas, kā rezultātā, samazinot garķēžu taukskābju transportu un oksidāciju, tiek veicināta glikozes uzņemšana un oksidācija.

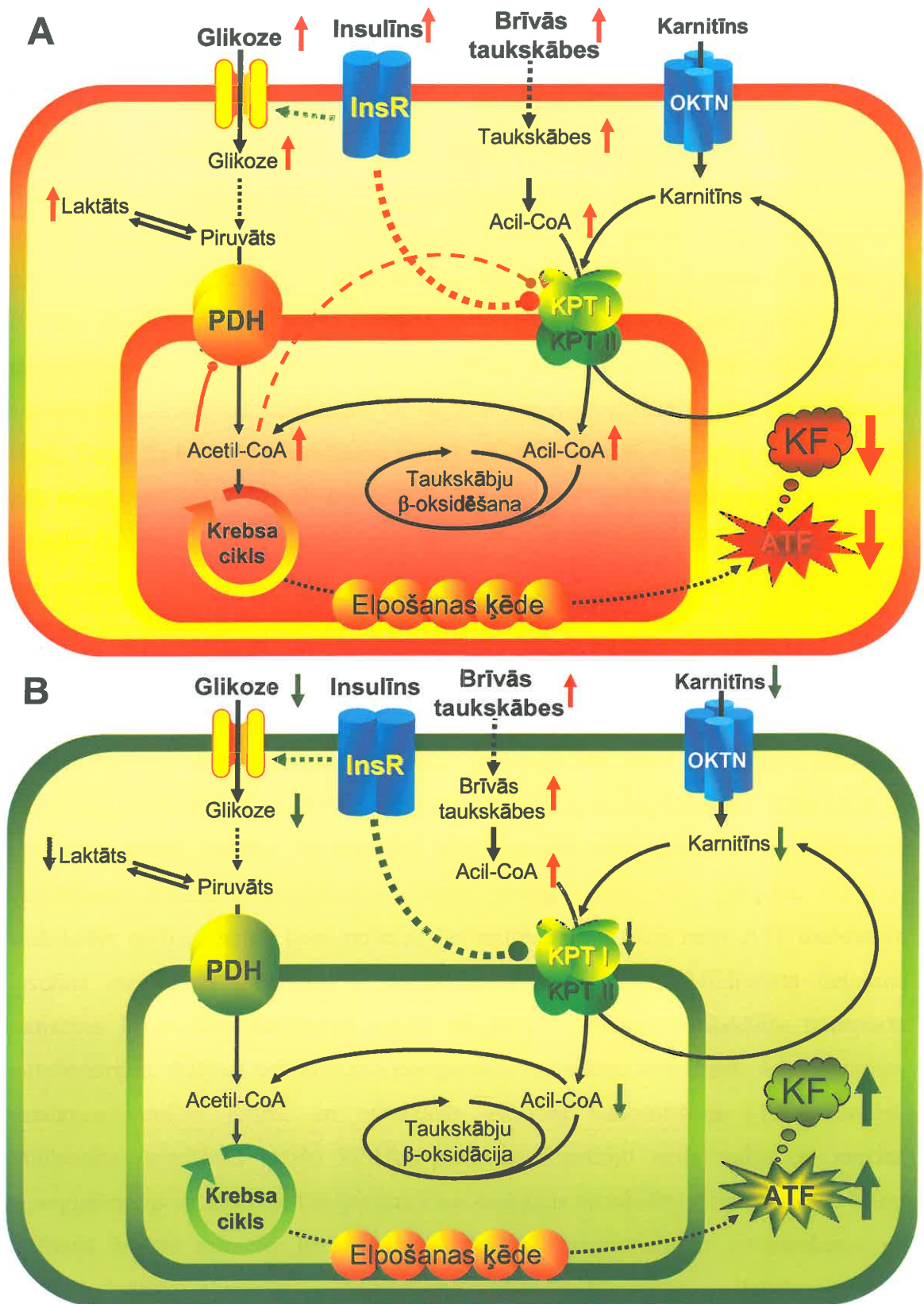
Mūsu pētījumā mildronāta un metformīna kombinācijas ievadīšanas izraisītās metabolisma izmaiņas atšķīrās no efektiem, kas novēroti, ievadot katru no medikamentiem atsevišķi. Lai gan mildronātam un metformīnam ir atšķirīgi darbības mehānismi, to kombinācijas lietošana neizraisīja sinerģisku vai papildus glikozes koncentrāciju samazinošu efektu. Tomēr abu zāļu kombinācijas lietošana vairāk samazināja insulīna koncentrāciju ēdušām žurkām un stimulēja GLUT4 gēna ekspresiju. Tādējādi palielināta GLUT4 gēna ekspresija un insulīna jutība liecina par kombinācijas lietošanas lietderību un, iespējams, ir pamatā izteiktākam kardioprotektīvajam efektam kombinētas terapijas gadījumā. Viens no metformīna labi zināmiem blakusefektiem ir laktacidoze, kas raksturojas ar palielinātu laktāta koncentrāciju plazmā (Bailey, 1996). Mildronāta un tā kombinācijas ar metformīnu ievadīšana, stimulējot glikozes metabolismu, samazināja laktāta koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku plazmā. Arī iepriekš novērots, ka mildronāta lietošana samazina laktāta koncentrāciju sirds audos išēmijas laikā (Asaka, 1998, Hayashi, 2000). Rezultāti liecina, ka mildronāta lietošana veicina ne tikai glikozes uzņemšanu un glikolīzi, bet arī glikozes oksidāciju audos, un mildronāts varētu mazināt metformīna izraisīto laktāta uzkrāšanos.

Mūsu pētījumā mildronāta un metformīna atsevišķa ievadīšana neietekmēja *Zucker fa/fa* žurku svara pieaugumu. Iepriekš veiktajos pētījumos, mildronāta svaru samazinošais efekts žurkās netika novērots (Liepinsh, 2009b), turklāt dati par metformīna ietekmi uz svaru nav viennozīmīgi (Yasuda, 2004). Klīniskie pētījumi parādījuši, ka sulfonurīnvielas atvasinājumu un insulīna-jutību atjaunojošu medikamentu lietošana 2. tipa CD pacientu ārstēšanā veicina nevēlamu svara palielināšanos (UKPDS, 1998, Khan, 2002). Pretēji monoterapijai, mildronāta ievadīšana kombinācijā ar metformīnu ticami samazināja svara pieaugumu, kavējot taukaudu daudzuma pieaugumu. Tā kā zāļu ievadīšana neietekmēja uzņemtās barības daudzumu, domājams, ka mildronāta un metformīna kombinācijas ievadīšana varētu

ietekmēt glikozes absorbciju pēc barības uzņemšanas. Svāra pieauguma samazinājums varētu būt skaidrojams arī ar AMPK aktivāciju un palielinātu enerģijas patēriņu. Iegūtie rezultāti apliecina, ka mildronāta ievadīšana, ietekmējot glikozes un taukskābju vielmaiņas procesus šūnās un mitohondrijos, mazina šūnu enerģijas metabolisma traucējumus hiperglikēmijas un hiperlipidēmijas apstākļos.

Mildronāta ievadīšana samazināja asins plazmas insulīna daudzumu, neietekmējot glikozes koncentrāciju fruktozes izraisītas hiperlipidēmijas modelī. Fruktozes lietošanas izraisīto metabolisma izmaiņu un bojājumu attīstības pakāpe atkarīga gan no dzīvnieku sugas, gan fruktozes devas, ievadīšanas veida un ilgumu (Abdulla, 2011). Kaut arī iepriekš veiktajos pētījumos novērota ar fruktozes lietošanu saistīta hipertensijas un kardiovaskulāro saslimšanu riska faktoru palielināšanās (Abdulla, 2011), fruktozes šķīduma lietošana mūsu pētījumā neizraisīja aortas endotēlija funkcionālos traucējumus un izteiktākus audu bojājumus žurku izolētās sirds infarkta modelī. Mildronāta lietošana, kavējot garķēžu taukskābju oksidāciju, palielināja brīvo taukskābju koncentrāciju plazmā žurkām tukšā dūšā, bet neietekmēja lipīdu un glikogēna daudzumu aknu audos. Mildronāta ievadīšana būtiski neietekmēja endotēlija funkcionalitāti un infarkta lielumu sirds audos, kas varētu būt skaidrojams ar nepietiekamu fruktozes lietošanas izraisītu bojājumu attīstību, kā arī ievadīto mildronāta devu, jo iepriekš veiktajos pētījumos, vadot mildronātu 200 mg/kg 2. tipa CD Goto-Kakizaki žurkām, kardioprotektīvais efekts bija mazāk izteikts kā ievadot mildronātu devā 100 mg/kg (Liepinsh, 2009a).

Palielinoties lipīdu daudzumam organismā, garķēžu taukskābes un to metabolīti aktivē PPAR, kam ir nozīmīga loma enerģijas homeostāzes uzturēšanā (Grimaldi, 2007, Sugden, 2009). Lai gan zināms, ka mildronāts, samazinot L-karnitīna koncentrāciju audos, stimulē glikozes un taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu un proteīnu ekspresiju (Degrace, 2007, Liepinsh, 2008), precīzi molekulārie mehānismi un kodola faktori, kas saistīti ar mildronāta lietošanas izraisītām metabolisma izmaiņām, līdz šim nebija noskaidroti. Iepriekš novērotās mildronāta lietošanas izraisītās gēnu ekspresijas izmaiņas rosināja pārbaudīt PPAR kā iespējamus kodolu faktorus, kas saistīti ar taukskābju metabolisma izmaiņām. Lai pētītu mildronāta darbības molekulāros mehānismus, tika noteikts PPAR α un PPAR γ daudzums sirds un aknu audu kodolos, kā arī glikozes un taukskābju vielmaiņā iesaistīto gēnu ekspresijas izmaiņas. PPAR α ir nozīmīgs kodolu receptors un transkripcijas faktors, kas iesaistīts taukskābju metabolismā un aktivējas, palielinoties sistēmiskai lipīdu pieejamībai (Duncan, 2011).



4.2. att. Aptaukošanās un metabolā sindroma izraisīti vielmaiņas traucējumi (A) un uzlabojumi pēc mildronāta lietošanas (B)

Nepārtrauktas līnijas norāda tiešos efektus, raustītas līnijas – netiešos efektus. Zaļas līnijas un bultas norāda stimulējošu efektu vai koncentrācijas palielināšanos, savukārt sarkanās līnijas un bultas – inhibējošu ietekmi un koncentrācijas samazināšanos

Savukārt PPAR γ aktivēšana veicina lipīdu uzņemšanu un uzglabāšanu taukaudos, kā arī regulē glikozes metabolismu un uzlabo insulīna jutību (Sugden, 2009). Jau iepriekš aprakstīta PPAR α signālceļu aktivācijas daļēja rezistence *Zucker fa/fa* žurku aknu audos (Satapati, 2008). Mūsu pētījumā, neskatoties uz palielinātu triglicerīdu koncentrāciju sirds un aknu audos, novērojām samazinātu PPAR α proteīna un tā mērķgēnu ekspresiju *Zucker fa/fa* žurku sirds audos. Pretēji metformīna monoterapijai, mildronāta un tā kombinācijas ar metformīnu ievadīšana palielināja PPAR α daudzumu sirds audu kodolos un taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju. Palielināta taukskābju metabolisma gēnu ekspresija tādējādi kompensē samazināto L-karnitīna daudzumu un saglabā kopējo taukskābju oksidācijas ātrumu sirdī. Turpretī aknās zāļu ievadīšana neietekmē PPAR α un tā mērķgēnu ekspresiju. Lai gan mildronāta un metformīna ievadīšana *Zucker fa/fa* žurkām atjaunoja samazināto PPAR γ daudzumu, PPAR γ mērķgēnu ekspresija aknu audos nebija izmainīta. Kopumā var secināt, ka mildronāta izraisītās gēnu ekspresijas izmaiņas sirdī ir saistītas ar PPAR α , bet ne PPAR γ aktivāciju.

Kopumā aptaukošanās un metabolā sindroma *Zucker fa/fa* žurkām cirkulējošo lipīdu koncentrācijas palielināšanās plazmā stimulē taukskābju iekļūšanu mitohondrijos. Taukskābju metabolisma starpproduktu, galvenokārt acetil-CoA, koncentrācijas palielināšanās kavē PDK un KPT I aktivitāti. Papildus tam tiek traucēta Krebsa cikla un elpošanas ķēdes darbība, tā rezultātā šīs izmaiņas rada glikozes un taukskābju oksidēšanās ātruma samazināšanos. Tāpēc pieaug cirkulējošās glikozes, insulīna, taukskābju un triglicerīdu koncentrācija, bet mitohondriju spēja ražot ATF diabēta un insulīna rezistences gadījumā ir samazināta (4.2.A. attēls). Mildronāta lietošana samazina L-karnitīna daudzumu audos un KPT I atkarīgo taukskābju transportu mitohondrijos, tādējādi tiek novērsta pastiprināta taukskābju uzkrāšanās mitohondrijos, uzlabojas insulīna jutība, un samazinās glikozes koncentrācija (4.2.B. attēls). Mildronāta ievadīšana aktivē PPAR α proteīna ekspresiju sirds audos un mazina hiperglikēmijas un hiperlipidēmijas izraisītos enerģijas metabolisma traucējumus. Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka 2. tipa CD pacientiem ar aptaukošanos un kardiovaskulārām slimībām mildronāta un metformīna kombinācijas lietošanai varētu būt potenciāla terapeitiska vērtība.

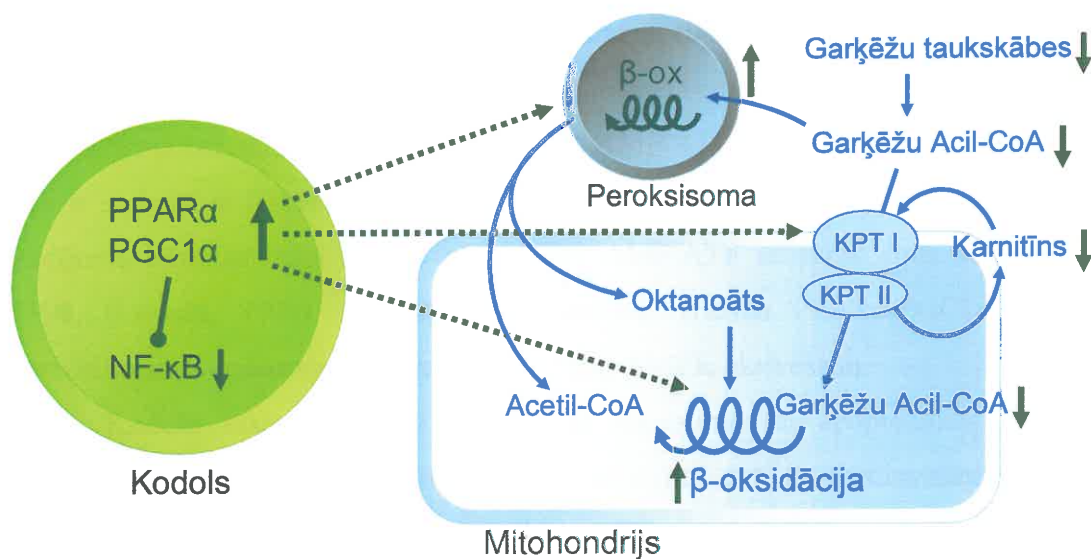
4.5. Mildronāta molekulārie darbības mehānismi

Nesen veiktā pētījumā pierādīts, ka mildronāta izraisītais L-karnitīna samazinājums sirds audos ir pamatā mehānismiem, kas nodrošina mildronāta kardio-protektīvo efektu išēmijas apstākļos (Dambrova, 2002, Kuka, 2012). Savukārt mūsu pētījumā aptaukošanās un hiperglikēmijas modelī (Zucker žurkās) tika noskaidrots, ka mildronāta izraisītais karnitīna samazinājums palielina PPAR α daudzumu un taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju. Tomēr precīzi molekulārie mehānismi, kas saistīti ar mildronāta lietošanas izraisītajām metabolisma izmaiņām un PPAR α aktivēšanu išēmijas reperfūzijas laikā joprojām nebija noskaidroti. Tāpēc veicām pētījumu, kurā noteicām samazinātas L-karnitīna koncentrācijas ietekmi uz taukskābju oksidāciju sirds audos un šūnu organellās, kā arī kodolu faktoru daudzumu un mērķgēnu ekspresiju sirds audos išēmijas un reperfūzijas laikā. Šī darba ietvaros pirmo reizi pētītas mildronāta izraisītās kompensējošās gēnu ekspresijas izmaiņas un taukskābju plūsmas pārvirzīšana, kas ļauj saglabāt peroksisomu un mitohondriju funkcionalitāti un nodrošina sirds enerģijas metabolisma atjaunošanos sirds audos pēc išēmijas.

Lai gan joprojām tiek uzskatīts, ka KPT I ir ātrumu-noteicošs enzīms garķēžu taukskābju oksidācijā mitohondrijos, tomēr nesen veiktā pētījumā konstatēts, ka garķēžu taukskābju uzņemšana un oksidācija sirds audos nav atkarīga no KPT I aktivitātes (Luiken, 2009). Turklāt, arī ievērojami samazinot L-karnitīna koncentrāciju, taukskābju oksidācija sirdī netiek ietekmēta (Degrace, 2004). Līdzīgi arī mūsu pētījumā iegūtie rezultāti pierāda, ka lietojot mildronātu, ilgstoša L-karnitīna koncentrācijas un KPT I aktivitātes samazināšana būtiski neizmaina kopējo garķēžu taukskābju metabolismu sirds audos. Lai gan mildronāta ievadīšana samazina KPT I aktivitāti un no KPT I atkarīgo garķēžu taukskābju oksidāciju mitohondrijos (Kuka, 2012, Simkhovich, 1988), mildronāta ievadīšana vienlaicīgi palielina peroksisomālajā β -oksidācijā iesaistīto gēnu ekspresiju un tādējādi palīdz saglabāt peroksisomu un mitohondriju funkcionalitāti išēmijas bojājumu gadījumā.

Išēmijas laikā sirds audos skābekļa pieejamība ir būtiski samazināta, un taukskābju oksidācija praktiski nenotiek. Tas izraisa taukskābju uzkrāšanos un ar to saistītos mitohondriju bojājumus, kā arī sekojošus enerģijas metabolisma traucējumus. Išēmijas laikā enerģijas metabolisma modulācijas iespējas ir samērā ierobežotas, turpretim pēc skābekļa piegādes atjaunošanās reperfūzijā, stimulējot glikozes oksidāciju, tika panākta labāka funkcionāla atjaunošanās (Doenst, 1999, Ussher, 2012).

Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka arī taukskābju metabolisma regulācija var samazināt lipīdu uzkrāšanos mitohondrijos un tās izraisītu lipotoksicitāti. Taukskābju uzkrāšanos mitohondrijos var novērst, vienlaicīgi izmainot gan garķēžu taukskābju transportu, gan oksidāciju. Mildronāta lietošanas izraisītā mitohondriju garķēžu taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu, galvenokārt KPT I, ekspresijas palielināšana pilnībā nekompensē L-karnitīna daudzuma samazināšanos, un no KPT I atkarīgais garķēžu taukskābju transports un oksidācijas ātrums sirds audu mitohondrijos ir ticami samazināts (Kuka, 2012). Tāpēc peroksisomālais taukskābju β -oksidācijas ātrums palielinās, lai kompensētu samazināto mitohondriālo taukskābju oksidāciju un garķēžu taukskābes lielā apjomā sašķeltu līdz acetil-KoA un oktanoil-KoA. Šie taukskābju oksidācijas produkti ir izmantojami ATF sintēzei, bet nav kaitīgi mitohondrijiem (Korge, 2003). Tādējādi vienlaicīga garķēžu taukskābju transporta samazināšana mitohondrijos, un peroksisomālās taukskābju oksidācijas aktivācija pasargā mitohondrijus no garķēžu taukskābju uzkrāšanās sirds audos išēmijas laikā. Papildus tam mūsu pētījumā novērojām, ka mildronāta lietošana izraisa ievērojamu no KPT I neatkarīgā β -oksidācijas ātruma palielināšanos mitohondrijos. Līdz ar to β -oksidācijas stimulēšana mitohondrijos varētu būt vēl viens mehānisms, kas tieši pasargā mitohondrijus no garķēžu taukskābju uzkrāšanās izraisītiem bojājumiem. Tādējādi mildronāts išēmijas laikā samazina lipīdu uzkrāšanos un garķēžu taukskābju radītus bojājumus sirds audos, gan palielinot peroksisomu skaitu, gan β -oksidācijas ātrumu mitohondrijos (4.3. attēls).



4.3. att. Ilgstošas mildronāta lietošanas izraisītās PPAR α /PGC1 α aktivitātes, gēnu ekspresijas un taukskābju plūsmas izmaiņas
Pārtrauktās līnijas attēlo PPAR α /PGC1 α signālceļus

PPAR aktivējas, piesaistoties ligandiem un transkripcijas koaktivatoriem (Duncan, 2011). PGC1 α ir visvairāk pētītais PPAR koaktivators. PGC1 α un PPAR α signālceļu mijiedarbībai sirds audos ir nozīmīga loma taukskābju metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresijas regulācijā, kā arī PGC1 α /PPAR α aktivācija varētu būt iesaistīta mitohondriju biogēnēzes regulācijā (Duncan, 2011). Mūsu pētījumā novērojām, ka mildronāta ievadīšana palielināja gan PPAR α un PGC1 α daudzumu kodolos, gan taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju, tomēr nav zināmi precīzi molekulārie mehānismi, kas izraisa PPAR α un PGC1 α daudzuma izmaiņas. Šajā pētījumā novērojām, ka PPAR α /PGC1 α signālceļu nestimulēja palielināta garķēžu taukskābju koncentrācija kontroles grupas sirds audu riska zonā gan išēmijā, gan reperfūzijā. Turklāt kontroles grupā no PPAR α atkarīgo gēnu ekspresija reperfūzijas laikā sirds audos riska zonā bija ticami samazināta. Turpretim, mildronāta lietošana palielina PPAR α daudzumu, neietekmējot garķēžu taukskābju daudzumu sirds audos. Iegūtie rezultāti liecina, ka, samazinot L-karnitīna koncentrāciju sirds audos, tiek aktivēts PPAR α neatkarīgi no garķēžu taukskābju daudzuma.

Samazināta L-karnitīna daudzuma izraisīta PPAR α aktivācija un attiecīga taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresijas stimulācija sirds audos išēmijas-reperfūzijas laikā varētu būt saistītas ar AMPK signālceļu aktivāciju. AMPK piedalās glikozes un īpaši taukskābju metabolisma stimulācijā sirdī un tiek aktivēts, palielinoties AMF/ATF attiecībai (Beauloye, 2011). Turklāt AMPK aktivācija ir būtiska išēmijas laikā miokardā, kad ir samazināts ATF daudzums (Kim, 2011). Tomēr mildronāta lietošanas gadījumā fosforilētā AMPK daudzums sirds audos bija samazināts. Iegūtie rezultāti liecina, ka mildronāta ievadīšana, samazinot L-karnitīnu, izraisa enerģijas metabolisma izmaiņas, kas saglabā optimālu AMF/ATF attiecību pat išēmijas laikā. Šie dati ir saskaņā ar iepriekš veiktajiem pētījumiem, kas norāda, ka mildronāta lietošanas gadījumā išēmijas laikā novēro samazinātu AMF/ATF attiecību sirds audos (Asaka, 1998, Hayashi, 2000). Līdz ar to mildronāta izraisīta PPAR α /PGC1 α signālceļu aktivācija sirds audos visticamāk nav saistīta ar AMPK aktivēšanu.

Kodolu faktors- κ B (NF- κ B) regulē iekaisuma un apoptotiskos signālceļus transkripcijas līmenī, un NF- κ B aktivācija iesaistīta dažādu kardiovaskulāro slimību attīstībā (Gupta, 2008). Iepriekš veiktos pētījumos parādīta PPAR α un PGC1 α signālceļu mijiedarbība ar NF- κ B un ar to saistītā apoptozes un išēmijas-reperfūzijas radīto iekaisuma signālceļu aktivācija (Alvarez-Guardia, 2010, Kono, 2009). Mūsu pētījuma rezultāti liecina, ka mildronāta ievadīšana, samazinot L-karnitīna koncen-

trāciju un palielinot PPAR α un PGC1 α daudzumu sirds audu kodolos, bija saistīta ar NF- κ B proteīna daudzuma samazināšanos sirds audu riska zonā išēmijas laikā. Išēmijas izraisītā NF- κ B patoloģiski paaugstinātā daudzuma samazināšana, veicinot PPAR α /PGC1 α signālceļu aktivāciju, varētu būt viens no mildronāta pretiekaisuma un kardioprotektīvās darbības mehānismiem.

Kopumā mildronāta ilgstošas lietošanas laikā samazināto L-karnitīna koncentrāciju un KPT I aktivitāti kompensē peroksisomālajā un mitohondriālajā taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresijas palielināšanās, kā rezultātā kopējais taukskābju oksidācijas ātrums nav samazināts. Mildronāta izraisītais L-karnitīna samazinājums aktivē PPAR α /PGC1 α signālceļu un izraisa taukskābju metabolisma izmaiņas, kas pasargā mitohondrijus no garķēžu taukskābju pārslodzes.

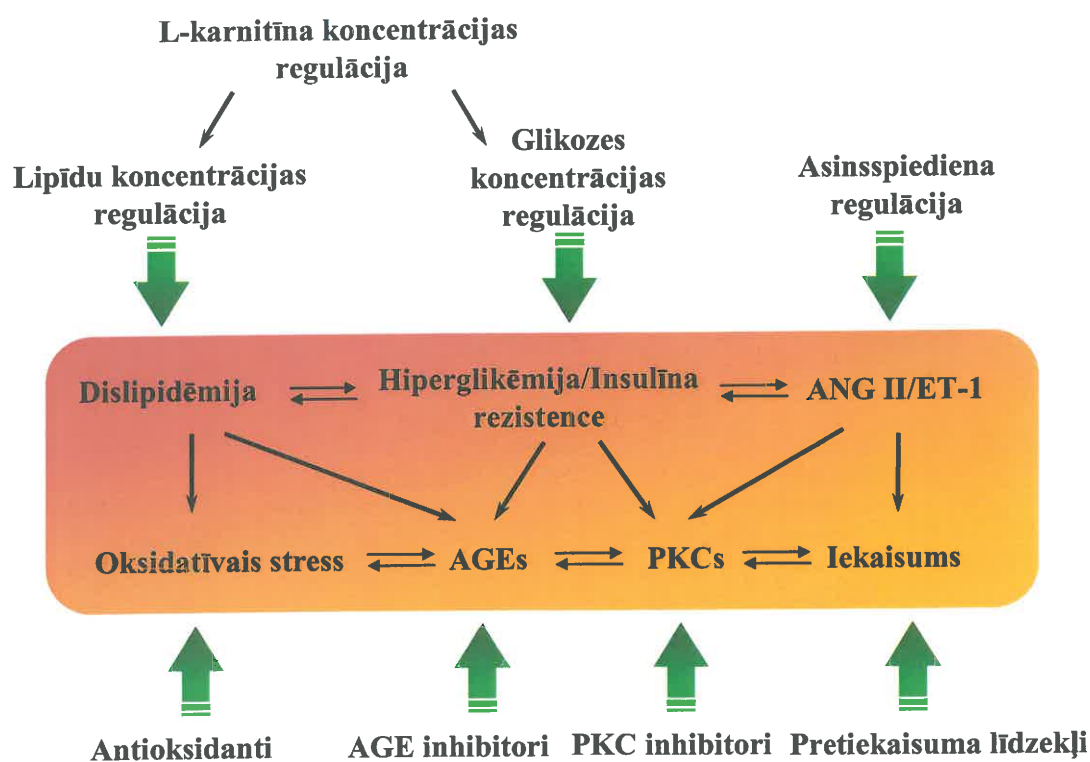
4.6. L-karnitīna koncentrācijas saistība ar cukura diabēta vēlino komplikāciju attīstības pakāpi CD pacientos

Fizioloģiskos apstākļos L-karnitīns piedalās garķēžu taukskābju transportā mitohondrijos. Bez tam parādīts, ka lietojot L-karnitīnu kā farmakoloģisku līdzekli, tas, palielinot PDH aktivitāti un glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresiju, stimulē glikolīzi (Foster, 2004, Mingrone, 2004, Stephens, 2007, Uziel, 1988). Literatūrā atrodama pretrunīga informācija par L-karnitīna koncentrācijas izmaiņām CD gadījumā (Okuda, 1987, Poorabbas, 2007, Pregant, 1991, Pregant, 1993). Dažos pētījumos CD pacientiem izmērīta samazināta L-karnitīna koncentrācija asinīs, tāpēc ieteikta papildus L-karnitīna lietošana CD gadījumā (Capaldo, 1991, Mingrone, 2004). Turpretim citos pētījumos noskaidrots, ka L-karnitīna daudzuma samazināšana novērš CD vēlino komplikāciju attīstību eksperimentālajos diabēta un metabolā sindroma modeļos (Liepinsh, 2009a, Statsenko, 2008). Lai noskaidrotu L-karnitīna daudzuma saistību ar vēlīnām komplikācijām CD pacientiem, tika noteiktas L-karnitīna koncentrācijas kontroles indivīdos un 1. un 2. tipa CD pacientos ar vēlīnām komplikācijām. Šajā pētījumā vidējās L-karnitīna koncentrācijas CD pacientiem ar un bez CD vēlīnām komplikācijām bija līdzīgas un iegūtie rezultāti apliecina, ka augstākas L-karnitīna koncentrācijas nav saistītas ar zemāku CD vēlino komplikāciju sastopamības biežumu vai smaguma pakāpi, tādēļ var secināt, ka papildus L-karnitīna lietošana CD gadījumā un CD vēlino komplikāciju novēršanai nav pamatota.

Vidējā L-karnitīna koncentrācija asins paraugos kontroles un CD pacientu grupas ietvaros atšķīrās līdz pat 3 reizēm. Samazināta L-karnitīna koncentrācija asins plazmā CD pacientiem, kas novērota iepriekš (Poorabbas, 2007, Pregant, 1991, Soltesz, 1983, Tamamogullari, 1999, Winter, 1989), varētu būt izskaidrojama ar mazāku L-karnitīna daudzuma uzņemšanu ar pārtiku. Turklāt iepriekš veiktajos pētījumos ar mazu pacientu skaitu ir liela iespējamība, ka pētījumam izvēlētas grupas, kas neraksturo kopējo populāciju. Pētījumos noskaidrots, ka vidēji ne-veģetāra diēta pieaugušam indivīdam nodrošina apmēram 75-100% no nepieciešamās L-karnitīna dienas devas (Liepinsh, 2009a, Longo, 2006). No pārtikas produktiem galvenais L-karnitīna avots ir liellopu gaļa (Demarquoy, 2004), tomēr ārsti un uztura speciālisti CD pacientiem iesaka ierobežot sarkanās gaļas lietošanu uzturā, lai samazinātu piesātināto tauku un holesterīna uzņemšanu (ADA, 2011, Hodge, 2011). Literatūrā ir atrodami pierādījumi apgalvojumam, ka sarkanās gaļas aizvietošana uzturā ar putnu gaļu, pākšaugiem vai riekstiem ir lietderīga kardiovaskulāro slimību profilaksē, un sarkanās gaļas nelietošana uzturā būtiski samazina 2. tipa CD saslimšanu risku (Aune, 2009, Craig, 2010, Psaltopoulou, 2010). Ja CD pacienti ievēro šos norādījumus un būtiski samazina sarkanās gaļas patēriņu, samazinās arī uzņemtais L-karnitīna daudzums, tādējādi samazinoties L-karnitīna koncentrācijai asins plazmā. Nesenā pētījumā, 2. tipa CD pacientēm bija samazināta brīvā L-karnitīna koncentrācija serumā un olbaltumvielu daudzuma uzņemšana ar pārtiku, salīdzinot ar kontroles grupu (Poorabbas, 2007). Pētījumā novēroja arī brīvā L-karnitīna koncentrācijas pozitīvu korelāciju ar olbaltumvielu uzņemšanas daudzumu (Poorabbas, 2007). Tā kā gaļas produkti ir nozīmīgākais olbaltumvielu avots uzturā, CD pacienti, iespējams, uzņem uzturu ar samazinātu L-karnitīna saturu, kas izskaidro iepriekšējos pētījumos novērotās samazinātās L-karnitīna koncentrācijas CD pacientiem. Mūsu pētījuma dalībniekiem pirms paraugu savākšanas netika noteikti ilgtermiņa uztura paradumi, tāpēc pētījumā nevar noteikt tiešu saistību ar uzturu uzņemtās gaļas daudzumu un L-karnitīna koncentrāciju. Tomēr īstermiņa diētas svārstības nozīmīgi neietekmē noteiktās L-karnitīna koncentrācijas asins paraugos un atspoguļo L-karnitīna daudzumu organismā ilgstošā laika periodā (Bain, 2006).

L-karnitīna homeostāzi organismā nodrošina absorbcija no pārtikas, biosintēze, kā arī intensīva reabsorbcija no glomerulu filtrāta nieru proksimālajos kanāliņos (Rebouche, 2004). Mūsu pētījumā CD pacientiem ar mikro- un makroalbuminūriju L-karnitīna koncentrācijas plazmā neatšķīrās no indivīdiem bez CD, arī nefropātijas

sastopamība nebija saistīta ar zemāku L-karnitīna koncentrāciju. Pacienti ar ilgstošu dialīzi, zemāka asins plazmas L-karnitīna koncentrācija ir saistīta ar palielinātu L-karnitīna izvadīšanu no organisma (Vernez, 2006, Verrina, 2007). Klīniskajos pētījumos L-karnitīna papildus lietošanas lietderīguma noteikšanai pieaugušiem pacientiem ar urēmiju iegūti pretrunīgi rezultāti, kā arī nav pierādīta L-karnitīna koncentrācijas saistība ar asins bioķīmisko parametru vai lipīdu profila izmaiņām (Hurot, 2002, Verrina, 2007). Klīniskajos pētījumos CD pacientiem L-karnitīna izvadīšanas ātruma izmaiņas netika noteiktas. Šajā pētījumā pacientiem ar zemu L-karnitīna koncentrāciju asinīs CD vēlīno komplikāciju sastopamības biežums un attīstības smaguma pakāpe neatšķīrās vai dažos gadījumos pat bija mazāka kā pacientiem ar augstākām L-karnitīna koncentrācijām. Līdzīgi novērots, ka veģetāriešiem L-karnitīna koncentrācijas serumā ir par 20-30% zemākas kā indivīdiem, kas uzturā lieto gaļu (Delanghe, 1989), un līdz ar to ir zemāks 2. tipa CD sastopamības biežums (Craig, 2010). Turklāt veģetāra diēta ar ierobežotu kaloriju daudzumu diabēta pacientiem lielākā mērā uzlabo insulīna jutību, salīdzinot ar tradicionālu diētu (Barnard, 2009, Kahleova, 2011). Mūsu pētījumā netika iekļauti veģetārieši un dalībnieki, kas papildus lietoja L-karnitīnu. Līdz ar to var secināt, ka samazināta L-karnitīna koncentrācija asinīs nenorāda L-karnitīna trūkumu organismā, bet drīzāk liecina par samazinātu sarkanās gaļas lietošanu uzturā.



4.4. att. Eksperimentālie līdzekļi un zāļu mērķi enerģijas metabolisma modulācijai

Kopumā iegūtie rezultāti apliecina, ka zema L-karnitīna koncentrācija CD pacientiem nav saistīta ar paaugstinātu CD vēlino komplikāciju (perifērās neiropātijas, nefropātijas, retinopātijas un hipertensijas) sastopamības biežumu vai smaguma pakāpi. Pacientiem ar augstāku L-karnitīna koncentrāciju asinīs CD vēlino komplikāciju sastopamības biežums nav samazināts. Pētījuma rezultāti apliecina, ka samazinot L-karnitīna koncentrāciju CD gadījumā iespējams aizkavēt CD vēlino komplikāciju attīstību.

Ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju ārstēšanai tiek lietoti zāļu līdzekļi gan enerģijas metabolisma līdzsvara atjaunošanai, gan CD attīstību veicinošu faktoru, piemēram, iekaisuma, paaugstināta asinsspiediena un neenzimātiskas glikēšanās samazināšanai (4.4. attēls). Pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā L-karnitīna koncentrācijas samazināšana var kavēt dislipidēmijas un hiperglikēmijas traucējumu attīstību, turklāt samazinātas Glo1 aktivitātes atjaunošana varētu būt lietderīga AGE daudzuma samazināšanai un vēlino komplikāciju attīstības aizkavēšanai.

5. SECINĀJUMI

1. Zemāka Glo1 aktivitāte saistīta ar sāpīgas perifērās diabētiskās neiropātijas attīstību 1. un 2. tipa CD pacientiem. Pētījumā iegūtie rezultāti apliecina izmainītas Glo1 nozīmi sāpīgas diabētiskās neiropātijas attīstībā.
2. Asins lizātu Glo1 aktivitāte nav izmainīta, attīstoties agrīniem vaskulāriem bojājumiem, tomēr Glo1 aktivitātes mērījumi varētu būt noderīgi vēlīno komplikāciju attīstības pētījumiem CD vēlīnās stadijās.
3. Mildronāta izraisītais L-karnitīna samazinājums aktivē PPAR α /PGC1 α signālceļu un izsauc taukskābju plūsmas pārvirzīšanu, pasargājot mitohondrijus no garķēžu taukskābju uzkrāšanās išēmijas apstākļos un ogļhidrātu metabolisma patoloģiju gadījumā.
4. Samazināta L-karnitīna koncentrācija asinīs CD pacientiem ir saistīta ar samazinātu diabētiskās neiropātijas un hipertensijas sastopamības biežumu.

6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Publikācijas (zinātniskie raksti) par pētījuma tēmu starptautiski recenzētos izdevumos

1. Skapare E, Riekstina U, Liepinsh E, Konrade I, Makrecka M, Maurina B, Dambrova M, Flow cytometric analysis of glyoxalase-1 expression in human leukocytes, *Cell Biochemistry and Function*, 2011, 29(2):171-174.
2. Liepinsh E, Skapare E, Svalbe B, Makrecka M, Cirule H, Dambrova M, Anti-diabetic effects of mildronate alone or in combination with metformin in obese Zucker rats, *European Journal of Pharmacology*, 2011, 658(2-3):277-283.
3. Liepinsh E, Skapare E, Vavers E, Konrade I, Strele I, Grinberga S, Pugovics O, Dambrova M, High l-carnitine concentrations do not prevent late diabetic complications in type 1 and 2 diabetic patients, *Nutrition Research*, 2012, 32(5):320-327.
4. Skapare E, Konrade I, Liepinsh E, Makrecka M, Zvejniece L, Svalbe B, Vilskersts R, Dambrova M, Glyoxalase 1 and glyoxalase 2 activities in blood and neuronal tissue samples from experimental animal models of obesity and type 2 diabetes mellitus, *The Journal of Physiological Sciences*, 2012, 62(6):469-478.
5. Skapare E, Konrade I, Liepinsh E, Strele I, Makrecka M, Bierhaus A, Lejnieks A, Pirags V, Dambrova M, Association of reduced glyoxalase 1 activity and painful peripheral diabetic neuropathy in type 1 and 2 diabetes mellitus patients, pieņemts publicēšanai žurnālā *Journal of Diabetes and Its Complications*, 2012.

Sagatavots un iesniegts manuskripts starptautiski citētā zinātniskā izdevumā

1. Liepinsh E, Skapare E, Kuka J, Makrecka M, Cirule H, Vavers E, Grinberga S, Pugovics O, Dambrova M, Activated peroxisomal fatty acid metabolism improves cardiac recovery in ischemia-reperfusion, iesniegts izskatīšanai žurnālā.

Publikācijas par pētījuma tēmu Latvijas recenzētos zinātniskos izdevumos

1. Konrāde I, Škapare E, Makrecka M, Gulbe L, Liepiņš E, Lejnieks A, Dambrova M, Glioksalāzes II aktivitātes metodes izstrāde cukura diabēta komplikāciju molekulāro mehānismu pētījumiem, *RSU Zinātniskie raksti, 2010. gada medicīnas nozares pētnieciskā darba publikācijas*, 2011, 1.sējums, 70.-76. lpp.
2. Konrāde I, Škapare E, Liepiņš E, Kūka J, Pētersone I, Lejnieks A, Bierhaus A, Dambrova M. Microplate assay of glyoxalase I activity in blood samples, *Proc. Latvian Acad. Sci.*, 2007, 61(5), P.149-154.

Publikācijas populārzinātniskos Latvijas izdevumos

1. Konrāde I., Škapare E., Lejnieks A., Makrecka M., Dambrova M., Neenzimātiska glikēšanās: problēma ne tikai cukura diabēta pacientiem, *Latvijas Ārsts*, 2010(11), 34.-37. lpp.
2. Tirzīte D, Konrāde I, Segliņa D, Škapare E, Dambrova M, Āboli, florizīns un cukura diabēts, *Latvijas ārsts*, 2011(10), 59-61.

Konferenču tēzes par pētījuma tēmu

1. **Skapare E**, Kuka J, Makrecka M, Dambrova M, Liepinsh E, The lower L-carnitine availability is cardioprotective through the compensatory activation of PPAR/PGC-1 pathway and redirection of fatty acid metabolism, *6. EPHAR Congress*, Granada, Spain, July 17-20, **2012**, Final Programme, P. 56.
2. Svalbe B, **Skapare E**, Liepinsh E, Vilskersts R, Vavers E, Zvejniece L, Dambrova M. Investigation of macro- and microvascular complications in animal models of obesity and type 2 diabetes mellitus, *8th FENS forum of Neuroscience*, Barcelona, Spain, July 14-18, **2012**. Abstract, Nr.2295.
3. Kuka J, **Skapare E**, Makrecka M, Dambrova M, Liepinsh E, Lowered L-carnitine availability is cardioprotective through redirection of fatty acid metabolism, *SHVM 2012 Tenth annual scientific sessions - Cardiac metabolism in hypertrophy and failure*, Oxford, June 24-27, **2012**, Programme & Abstracts, P.102
4. **Skapare E**, Liepinsh E, Kuka J, Cirule H, Dambrova M, Crosstalk between PPARs and NF- κ B, *International Conference in Pharmacology*, Riga, Latvia, April 20-21, **2012**, Abstract book, P.56.
5. Vāvers E, **Škapare E**, Glioksalāzes I aktivitāte metabolā sindroma un 2. tipa cukura diabēta dzīvnieku asins un neironālo audu paraugos, *RSU 61. studentu zinātniskā konference, Bāzes priekšmetu sekcija*, Rīga, Latvija, 28. marts, **2012**, Tēzes, 14.lpp.
6. Konrade I, **Skapare E**, Makrecka M, Pirags V, Lejnieks A, Liepinsh E, Dambrova M, The alterations of glyoxalase enzyme activities are earlier detected in neuronal tissues than in blood samples, *The World Diabetes Congress*, Dubai, United Arab Emirates, December 4-8, **2011**.
7. **Skapare E**, Konrade I, Makrecka M, Liepins E, Dambrova M, Measurements of the glyoxalase-1 expression and activity in blood samples of diabetic patients, *36th FEBS Congress - Biochemistry for tomorrow's medicine*, Torino, Italy, June 25-30, **2011**, Abstract book, P. 188.
8. **Škapare E**, Konrāde I, Liepiņš E, Lejnieks A, Makrecka M, Gulbe L, Medne R, Dambrova M, Plūsmas citometrijas analīze glioksalāzes-1 noteikšanai cilvēku leukocītos, *RSU 2011. gada zinātniskā konference, Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte*, Rīga, Latvija, 14.-15. aprīlis, **2011**, Tēzes, 180.lpp
9. Liepinsh E, **Skapare E**, Konrade I, Dambrova M, The effects of mildronate and metformin on energy metabolism pathways in experimental model of obesity, *46th EASD Annual Meeting*, Stockholm, Sweden, September 20-24, **2010**.
10. **Skapare E**, Liepinsh E, Svalbe B, Dambrova M, Cardioprotective drug mildronate enhances the anti-diabetic activity of metformin in obese Zucker rats, *16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology*, Copenhagen, Denmark, July 17 – 23, **2010**, Abstracts, P.583-584.
11. Makrecka M, **Skapare E**, Liepinsh E, Dambrova M, The cardioprotective drug mildronate enhances anti-diabetic activity of metformin in experimental model of obesity, *17th International Student Congress of Medical Sciences*, Groningen, the Netherlands, June 8-11, **2010**, Abstract book, P.194.
12. Konrade I, **Skapare E**, Klovins J, Liepins E, Lejnieks A, Makrecka M, Gulbe L, Bierhaus A, Dambrova M, Association between reduced glyoxalase-1 activity and

painful peripheral neuropathy in diabetes mellitus patients, The 9th European Society of Endocrinology (ESE) Postgraduate Course in Clinical Endocrinology, 1st session of the 5th Baltic Congress of Endocrinology: Diabetes and Metabolic syndrome, Tartu, Estonia, May 27-29, **2010**, Abstract book, P. 66.

13. Makrecka M, **Škapare E**, Measurements of glyoxalase enzymes: possible markers of late complications of diabetes mellitus, 5th Baltic Sea Region Conference in Medical Sciences, Vilnius, Lithuania, May 14-16, **2010**, Abstract book, P.54-55.

Ziņojumi kongresos un konferencēs

1. **Škapare E**, Molecular mechanisms of carbohydrate metabolism-related disorders: investigations in experimental models and clinical samples, 17th Young Scientists Training Course, Heidelberg, Vācija, **2010**.
2. **Škapare E**, Mildronāta efekti cukura diabēta komplikāciju attīstības aizkavēšanā eksperimentālajos modeļos, Augstākās farmaceutiskās izglītības 90 gadu jubilejai veltīti lasījumi, Referāts, Rīga, Latvija, 26.februāris, **2010**.
3. **Škapare E**, Konrāde I, Liepiņš E, Medne R, Dambrova M, Glioksalāžu enzīmu loma cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstībā, *RSU 2012. gada zinātniskā konference, Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte*, Rīga, Latvija, 29.-30. marts, **2012**, Tēzes, 84.lpp.

7. PATEICĪBAS

Vislielāko pateicību vēlos izteikt savai izcilajai zinātniskā darba vadītājai Dr.pharm. *Maijai Dambrovai* par iedvesmu, nenovērtējamu atbalstu un vērtīgiem padomiem promocijas darba izstrādes laikā.

Paldies RSU Farmācijas ķīmijas katedras un promocijas darba vadītājai Dr.chem. *Renātei Mednei* par atsaucību un uzticību.

Liels paldies Dr.pharm. *Edgaram Liepiņam* par pacietību un ieguldīto laiku, kas bija nepieciešams praktisko iemaņu apgūšanai laboratorijā, palīdzību eksperimentālā darba plānošanas un veikšanas procesā, kā arī par nerimstošu zinātniskā optimisma veicināšanu. Vēlos pateikties kolēģiem, bez kuriem darba praktiskā izstrāde nebūtu iespējama – dzīvnieku uzvedības lietpratējām *Baibai Švalbei* un *Līgai Zvejniecei*, mitohondriju elpinātājai *Marinai Makreckai*, bioķīmisko reakciju ekspertam *Edijam Vāveram*, dzīvnieku eksperimentu koordinatorei *Helēnai Cīrulei*, sirds-cilvēkiem *Jānim Kūkam* un *Reinim Vilšķērstam*, izpalīdzīgiem asistentiem *Ligitai Kariņai*, *Rūdolfam Mežapuķem*, *Olgai Žarkovai-Malkovai* un lietu kārtotājai *Raitai Brikmanei*, kā arī analītikas speciālistiem *Solveigai Grīnbergai* un *Osvaldam Pugovičam*.

Liels paldies glioksalāžu pētījumu iniciatorei *Ilzei Konrādei* par rūpīgo klīnisko paraugu savākšanu, kā arī par atbalstu cīņā pret „glioksalāzes lāstu”. Paldies brīvprātīgajiem pētījuma dalībniekiem, kas kopumā ziedojuši 2208 ml asins. Paldies *Ievai Strēlei* par profesionālu un vērtīgu palīdzību datu statistiskajā apstrādē. Pateicos Latvijas Universitātes Bioanalītisko metožu laboratorijas pētniekiem *Unai Riekstiņai* un *Vadimam Parfejevam* par palīdzību plūsmas citometrijas analīzes veikšanā.

Pateicos Latvijas Organiskās sintēzes institūta vadībai, īpaši direktoram *Ivaram Kalviņam* par iespēju izstrādāt disertāciju.

Miļš paldies maniem vecākiem un vecvecākiem par audzināšanu, ģimenei par atbalstu un īpaši *Oļegam* par pacietību.

Paldies L'Oreal stipendijai "Sievietēm zinātnē", UNESCO Latvijas Nacionālās komisijai un Latvijas Zinātņu akadēmijai par finansiālu atbalstu pētījuma veikšanai. Materiālu iegāde veikta Valsts pētījumu programmas BIOMEDICINE apakšprojekta „Diabēta komplikāciju izpēte un kardiovaskulāro preparātu bioloģiskā aktivitāte” un RSU doktorantu pētījumu projekta finansējuma granta ietvaros.

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

8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Peppa M, Vlassara H Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens)*, 2005; 4:28-37
2. Rabbani N, Thornalley PJ Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 2011; 22:309-317
3. Carvajal K, Moreno-Sanchez R Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res*, 2003; 34:89-99
4. Kamalesh M Heart failure in diabetes and related conditions. *J Card Fail*, 2007; 13:861-873
5. Larsen TS, Aasum E Metabolic (in)flexibility of the diabetic heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2008; 22:91-95
6. Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D, Kirjanova O, Pugovichs O, Kalvinsh I, Dambrova M Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006; 48:314-319
7. Liepinsh E, Vilskersts R, Skapare E, Svalbe B, Kuka J, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*, 2008; 83:613-619
8. Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuke RJ, Molodchina TN, Kalvins IJ, Lukevics E 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 1988; 37:195-202
9. Rebouche CJ Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J*, 1992; 6:3379-3386
10. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med*, 2002; 12:275-279
11. Centers for Disease Control and Prevention: National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States. Atlanta, Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011.
12. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*, 1999; 42:1395-1403
13. Marshall SM, Flyvbjerg A Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. *BMJ*, 2006; 333:475-480
14. Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu' MR, Montagnani M Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem*, 2009; 16:94-112
15. Giacco F, Brownlee M Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 2010; 107:1058-1070
16. Brownlee M The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 2005; 54:1615-1625
17. Villeneuve LM, Natarajan R The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010; 299:14-25
18. Mooradian AD Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2009; 5:150-159
19. King GL The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*, 2008; 79:1527-1534

20. Miyazawa T, Nakagawa K, Shimasaki S, Nagai R Lipid glycation and protein glycation in diabetes and atherosclerosis. *Amino Acids*, 2012; 42:1163-1170
21. Thornalley PJ Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*, 2008; 23:125-150
22. Nass N, Bartling B, Navarrete SA, Scheubel RJ, Borgermann J, Silber RE, Simm A Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr*, 2007; 40:349-356
23. Maillard, LC Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique . *Compt Rend Hebd Seances Acad Sci*, 1912; 154:66-68
24. Ulrich P, Cerami A Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*, 2001; 56:1-21
25. Stitt AW Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br J Ophthalmol*, 2001; 85:746-753
26. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 2009; 32:1327-1334
27. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1976; 295:417-420
28. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*, 1998; 44:1139-1145
29. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*, 1999; 344 Pt 1:109-116
30. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 2001; 44:129-146
31. Thornalley PJ Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci*, 2005; 1043:111-117
32. Thornalley PJ Endogenous alpha-oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycation endproducts in tissue damage. *Novartis Found Symp*, 2007; 285:229-243
33. Phillips SA, Mirrlees D, Thornalley PJ Modification of the glyoxalase system in streptozotocin-induced diabetic rats. Effect of the aldose reductase inhibitor Statil. *Biochem Pharmacol*, 1993; 46:805-811
34. Thornalley PJ Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J*, 1988; 254:751-755
35. Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J, Franke S, Strobel J, Stein G, Haik GM Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003; 44:5287-5292
36. Fosmark DS, Berg JP, Jensen AB, Sandvik L, Agardh E, Agardh CD, Hanssen KF Increased retinopathy occurrence in type 1 diabetes patients with increased serum levels of the advanced glycation endproduct hydroimidazolone. *Acta Ophthalmol*, 2009; 87:498-500
37. Wells-Knecht MC, Thorpe SR, Baynes JW Pathways of formation of glycoxidation products during glycation of collagen. *Biochemistry*, 1995; 34:15134-15141
38. Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, Dawnay A Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J*, 2003; 375:581-592

39. Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCance DR, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes*, 1991; 40:190-196
40. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant*, 1996; 11:48-53
41. Jono T, Nagai R, Lin X, Ahmed N, Thornalley PJ, Takeya M, Horiuchi S Nepsilon-(Carboxymethyl)lysine and 3-DG-imidazolone are major AGE structures in protein modification by 3-deoxyglucosone. *J Biochem*, 2004; 136:351-358
42. Konishi, Y, Hayase, F, and Kato, O Novel imidazolone compound formed by the advanced Maillard reaction of 3-deoxyglucosone and arginine residues in proteins. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994; 58:1953-1955
43. Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction in vivo. *J Biol Chem*, 1989; 264:3758-3764
44. Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J Biol Chem*, 1991; 266:11654-11660
45. Niwa T 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999; 731:23-36
46. Krymkiewicz N Reactions of methylglyoxal with nucleic acids. *FEBS Lett*, 1973; 29:51-54
47. Yuan B, Cao H, Jiang Y, Hong H, Wang Y Efficient and accurate bypass of N2-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine by DinB DNA polymerase in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008; 105:8679-8684
48. Murata-Kamiya N, Kamiya H Methylglyoxal, an endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucleic Acids Res*, 2001; 29:3433-3438
49. Thornalley PJ, Waris S, Fleming T, Santarius T, Larkin SJ, Winkhofer-Roob BM, Stratton MR, Rabbani N Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res*, 2010; 38:5432-5442
50. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*, 2004; 104:1287-1291
51. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*, 2010; 110:911-916
52. Finot PA The absorption and metabolism of modified amino acids in processed foods. *J AOAC Int*, 2005; 88:894-903
53. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94:6474-6479
54. Vlassara H, Uribarri J Glycoxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning? *Rev Endocr Metab Disord*, 2004; 5:181-188
55. Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94:13915-13920
56. Nicholl ID, Stitt AW, Moore JE, Ritchie AJ, Archer DB, Bucala R Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. *Mol Med*, 1998; 4:594-601

57. Ghanem AA, Elewa A, Arafa LF Pentosidine and N-carboxymethyl-lysine: biomarkers for type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol*, 2011; 21:48-54
58. He CJ, Koschinsky T, Buenting C, Vlassara H Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Mol Med*, 2001; 7:159-168
59. Lu J, Randell E, Han Y, Adeli K, Krahn J, Meng QH Increased plasma methylglyoxal level, inflammation, and vascular endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Clin Biochem*, 2011; 44:307-311
60. Turk Z, Vrdoljak A, Misur I, Trescec A, Benko B Methylglyoxal-derivative advanced glycation endproducts: detection by competitive immunofluorometric assay and quantifying in serum and urine. *Clin Lab*, 2009; 55:431-439
61. Boehm BO, Schilling S, Rosinger S, Lang GE, Lang GK, Kientsch-Engel R, Stahl P Elevated serum levels of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular oedema. *Diabetologia*, 2004; 47:1376-1379
62. Aso Y, Takanashi K, Sekine K, Yoshida N, Takebayashi K, Yoshihara K, Inukai T Dissociation between urinary pyrrolidine and pentosidine concentrations in diabetic patients with advanced nephropathy. *J Lab Clin Med*, 2004; 144:92-99
63. Misur I, Zarkovic K, Barada A, Batelja L, Milicevic Z, Turk Z Advanced glycation endproducts in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy. *Acta Diabetol*, 2004; 41:158-166
64. Han Y, Randell E, Vasdev S, Gill V, Gadag V, Newhook LA, Grant M, Hagerty D Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Mol Cell Biochem*, 2007; 305:123-131
65. Lapolla A, Flamini R, Lupo A, Arico NC, Rugiu C, Reitano R, Tubaro M, Ragazzi E, Seraglia R, Traldi P Evaluation of glyoxal and methylglyoxal levels in uremic patients under peritoneal dialysis. *Ann N Y Acad Sci*, 2005; 1043:217-224
66. Nakayama K, Nakayama M, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, Kohno M, Ito S Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol*, 2008; 28:871-878
67. Burn DJ, Bates D Neurology and the kidney. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998; 65:810-821
68. Rabbani N, Thornalley PJ Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino Acids*, 2012; 42:1133-1142
69. Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, Sauer SK, Eberhardt M, Schnolzer M, Lasitschka F, Neuhuber WL, Kichko TI, Konrade I, Elvert R, Mier W, Pirags V, Lukic IK, Morcos M, Dehmer T, Rabbani N, Thornalley PJ, Edelstein D, Nau C, Forbes J, Humpert PM, Schwaninger M, Ziegler D, Stern DM, Cooper ME, Haberkorn U, Brownlee M, Reeh PW, Nawroth PP Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med*, 2012; 18:926-933
70. Soro-Paavonen A, Zhang WZ, Venardos K, Coughlan MT, Harris E, Tong DC, Brasacchio D, Paavonen K, Chin-Dusting J, Cooper ME, Kaye D, Thomas MC, Forbes JM Advanced glycation end-products induce vascular dysfunction via resistance to nitric oxide and suppression of endothelial nitric oxide synthase. *J Hypertens*, 2010; 28:780-788
71. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szweda LI, Brownlee M, Monnier VM, Weiss MF Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005; 289:420-430

72. Lee HJ, Howell SK, Sanford RJ, Beisswenger PJ Methylglyoxal can modify GAPDH activity and structure. *Ann N Y Acad Sci*, 2005; 1043:135-145
73. Archer DB Bowman Lecture 1998. Diabetic retinopathy: some cellular, molecular and therapeutic considerations. *Eye (Lond)*, 1999; 13(4):497-523
74. McNulty M, Mahmud A, Feely J Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens*, 2007; 20:242-247
75. Schalkwijk CG, Miyata T Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*, 2012; 42:1193-1204
76. Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*, 2011; 121:43-55
77. Bierhaus A, Nawroth PP Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*, 2009; 52:2251-2263
78. Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*, 2001; 50:2792-2808
79. Li J, Schmidt AM Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 1997; 272:16498-16506
80. Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Mitsui Y, Low PA Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol*, 2001; 169:386-391
81. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981; 78:5190-5192
82. Vander Jagt DL, Hunsaker LA Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem Biol Interact*, 2003; 143-144:341-351
83. Thornalley PJ The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med*, 1993; 14:287-371
84. Cameron AD, Olin B, Ridderstrom M, Mannervik B, Jones TA Crystal structure of human glyoxalase I--evidence for gene duplication and 3D domain swapping. *EMBO J*, 1997; 16:3386-3395
85. Aronsson AC, Sellin S, Tibbelin G, Mannervik B Probing the active site of glyoxalase I from human erythrocytes by use of the strong reversible inhibitor S-p-bromobenzylglutathione and metal substitutions. *Biochem J*, 1981; 197:67-75
86. Ridderstrom M, Mannervik B Optimized heterologous expression of the human zinc enzyme glyoxalase I. *Biochem J*, 1996; 314 (2):463-467
87. Schimandle CM, Vander Jagt DL Isolation and kinetic analysis of the multiple forms of glyoxalase-I from human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*, 1979; 195:261-268
88. Talesa V, Uotila L, Koivusalo M, Principato G, Giovannini E, Rosi G Isolation of glyoxalase II from two different compartments of rat liver mitochondria. Kinetic and immunochemical characterization of the enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 993:7-11
89. Allen RE, Lo TW, Thornalley PJ Purification and characterisation of glyoxalase II from human red blood cells. *Eur J Biochem*, 1993; 213:1261-1267
90. Bito A, Haider M, Briza P, Strasser P, Breitenbach M Heterologous expression, purification, and kinetic comparison of the cytoplasmic and mitochondrial glyoxalase II enzymes, Glo2p and Glo4p, from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*, 1999; 17:456-464

91. Talesa V, Rosi G, Bistoni F, Marconi P, Norton SJ, Principato GB Presence of a plant-like glyoxalase II in *Candida albicans*. *Biochem Int*, 1990; 21:397-403
92. Creighton DJ, Hamilton DS Brief history of glyoxalase I and what we have learned about metal ion-dependent, enzyme-catalyzed isomerizations. *Arch Biochem Biophys*, 2001; 387:1-10
93. Ahmed U, Dobler D, Larkin SJ, Rabbani N, Thornalley PJ Reversal of hyperglycemia-induced angiogenesis deficit of human endothelial cells by overexpression of glyoxalase I in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, 2008; 1126:262-264
94. Shinohara M, Thornalley PJ, Giardino I, Beisswenger P, Thorpe SR, Onorato J, Brownlee M Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest*, 1998; 101:1142-1147
95. Atkins TW, Thornally PJ Erythrocyte glyoxalase activity in genetically obese (ob/ob) and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res*, 1989; 11:125-129
96. Brouwers O, Niessen PM, Ferreira I, Miyata T, Scheffer PG, Teerlink T, Schrauwen P, Brownlee M, Stehouwer CD, Schalkwijk CG Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats. *J Biol Chem*, 2011; 286:1374-1380
97. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nagai R, Ingelfinger JR, Miyata T, Fujita T, Inagi R Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009; 296:912-921
98. Morcos M, Du X, Pfisterer F, Hutter H, Sayed AA, Thornalley P, Ahmed N, Baynes J, Thorpe S, Kukudov G, Schlotterer A, Bozorgmehr F, El Baki RA, Stern D, Moehrlen F, Ibrahim Y, Oikonomou D, Hamann A, Becker C, Zeier M, Schwenger V, Miftari N, Humpert P, Hammes HP, Buechler M, Bierhaus A, Brownlee M, Nawroth PP Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 2008; 7:260-269
99. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, Hutter H, Du X, Oikonomou D, Ibrahim Y, Pfisterer F, Rabbani N, Thornalley P, Sayed A, Fleming T, Humpert P, Schwenger V, Zeier M, Hamann A, Stern D, Brownlee M, Bierhaus A, Nawroth P, Morcos M C. *elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes*, 2009; 58:2450-2456
100. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*, 1994; 87:21-29
101. Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE, Florkowski CM, Jones AF, Lunec J, Barnett AH The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 1989; 7:115-120
102. Konrāde I Dzijās glikēšanās galaproduktu receptora un glioksalāzes-1 loma cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstībā, 2008.
103. Ratliff DM, Vander Jagt DJ, Eaton RP, Vander Jagt DL Increased levels of methylglyoxal-metabolizing enzymes in mononuclear and polymorphonuclear cells from insulin-dependent diabetic patients with diabetic complications: aldose reductase, glyoxalase I, and glyoxalase II--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81:488-492
104. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 2005; 28:956-962
105. Tesfaye S, Selvarajah D Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012; 28 Suppl 1:8-14

106. Duckworth W, Abaira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2009; 360:129-139
107. Gaede P, Vedel P, Larsen N, Jensen GV, Parving HH, Pedersen O Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2003; 348:383-393
108. Siegelaar SE, Kilpatrick ES, Rigby AS, Atkin SL, Hoekstra JB, Devries JH Glucose variability does not contribute to the development of peripheral and autonomic neuropathy in type 1 diabetes: data from the DCCT. *Diabetologia*, 2009; 52:2229-2232
109. Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, Witte DR, Fuller JH Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*, 2005; 352:341-350
110. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med*, 2004; 21:114-121
111. Jack MM, Ryals JM, Wright DE Characterisation of glyoxalase I in a streptozocin-induced mouse model of diabetes with painful and insensate neuropathy. *Diabetologia*, 2011; 54:2174-2182
112. Obrosova IG, Xu W, Lyzogubov VV, Ilnytska O, Mashtalir N, Vareniuk I, Pavlov IA, Zhang J, Slusher B, Drel VR PARP inhibition or gene deficiency counteracts intraepidermal nerve fiber loss and neuropathic pain in advanced diabetic neuropathy. *Free Radic Biol Med*, 2008; 44:972-981
113. Huss JM, Kelly DP Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res*, 2004; 95:568-578
114. Schaffer JE, Lodish HF Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell*, 1994; 79:427-436
115. Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med*, 2004; 25:495-520
116. Gould GW, Holman GD The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J*, 1993; 295:329-341
117. Santalucia T, Boheler KR, Brand NJ, Sahye U, Fandos C, Vinals F, Ferre J, Testar X, Palacin M, Zorzano A Factors involved in GLUT-1 glucose transporter gene transcription in cardiac muscle. *J Biol Chem*, 1999; 274:17626-17634
118. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacin M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem*, 1997; 272:7085-7092
119. Russell RR, III, Bergeron R, Shulman GI, Young LH Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol*, 1999; 277:643-649
120. Consoli A, Nurjhan N, Capani F, Gerich J Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes*, 1989; 38:550-557
121. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 2004; 350:664-671
122. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM Mitochondrial overload and

- incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab*, 2008a; 7:45-56
123. Wang W, Lopaschuk GD Metabolic therapy for the treatment of ischemic heart disease: reality and expectations. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007; 5:1123-1134
 124. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002; 51:2944-2950
 125. Chua SC, Jr., White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada N, Kershaw EE, Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Tartaglia LA, Leibel RL Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes*, 1996; 45:1141-1143
 126. Aleixandre de AA, Miguel CM Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr*, 2009; 102:1246-1253
 127. Goto Y, Kakizaki M, Masaki N Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med*, 1976; 119:85-90
 128. Gotoh M, Li C, Yatoh M, Okabayashi N, Habu S, Hirooka Y Hypothalamic monoamine metabolism is different between the diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats and streptozotocin-induced diabetic rats. *Brain Res*, 2006; 1073-1074:497-501
 129. Shriver LP, Manchester M Inhibition of fatty acid metabolism ameliorates disease activity in an animal model of multiple sclerosis. *Sci Rep*, 2011; 1:79
 130. Hallfrisch J Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J*, 1990; 4:2652-2660
 131. Hu FB, Malik VS Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav*, 2010; 100:47-54
 132. Odetti P, Traverso N, Cosso L, Noberasco G, Pronzato MA, Marinari UM Good glycaemic control reduces oxidation and glycation end-products in collagen of diabetic rats. *Diabetologia*, 1996; 39:1440-1447
 133. Monnier VM, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W, Cleary PA, Lachin J, Genuth S Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial*. *Diabetes*, 1999; 48:870-880
 134. Engelen L, Lund SS, Ferreira I, Tarnow L, Parving HH, Gram J, Winther K, Pedersen O, Teerlink T, Barto R, Stehouwer CD, Vaag AA, Schalkwijk CG Improved glycemic control induced by both metformin and repaglinide is associated with a reduction in blood levels of 3-deoxyglucosone in nonobese patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*, 2011; 164:371-379
 135. Hartog JW, Willemsen S, van Veldhuisen DJ, Pasma JL, van Wijk LM, Hummel YM, Hillege HL, Voors AA Effects of alagebrium, an advanced glycation endproduct breaker, on exercise tolerance and cardiac function in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2011a; 13:899-908
 136. Chang KC, Hsu KL, Tseng CD, Lin YD, Cho YL, Tseng YZ Aminoguanidine prevents arterial stiffening and cardiac hypertrophy in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Br J Pharmacol*, 2006; 147:944-950
 137. Wu MS, Liang JT, Lin YD, Wu ET, Tseng YZ, Chang KC Aminoguanidine prevents the impairment of cardiac pumping mechanics in rats with streptozotocin and nicotinamide-induced type 2 diabetes. *Br J Pharmacol*, 2008; 154:758-764
 138. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR, Baynes JW Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int*, 2002; 61:939-950
 139. Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, Degenhardt TP, Schotzinger RJ, McGill JB Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. *Am J Nephrol*, 2007; 27:605-614

140. Alkhalaf A, Klooster A, van OW, Achenbach U, Kleefstra N, Slingerland RJ, Mijnhout GS, Bilo HJ, Gans RO, Navis GJ, Bakker SJ A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial on benfotiamine treatment in patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 2010; 33:1598-1601
141. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. *Acta Diabetol*, 2008; 45:131-141
142. Stracke H, Gaus W, Achenbach U, Federlin K, Bretzel RG Benfotiamine in diabetic polyneuropathy (BENDIP): results of a randomised, double blind, placebo-controlled clinical study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2008; 116:600-605
143. Figarola JL, Loera S, Weng Y, Shanmugam N, Natarajan R, Rahbar S LR-90 prevents dyslipidaemia and diabetic nephropathy in the Zucker diabetic fatty rat. *Diabetologia*, 2008; 51:882-891
144. Nakamura S, Tachikawa T, Tobita K, Aoyama I, Takayama F, Enomoto A, Niwa T An inhibitor of advanced glycation end product formation reduces N epsilon-(carboxymethyl)lysine accumulation in glomeruli of diabetic rats. *Am J Kidney Dis*, 2003; 41:68-71
145. Wilkinson-Berka JL, Kelly DJ, Koerner SM, Jaworski K, Davis B, Thallas V, Cooper ME ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic (mREN-2)27 rat. *Diabetes*, 2002; 51:3283-3289
146. Beisswenger P, Ruggiero-Lopez D Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes Metab*, 2003; 29:95-103
147. Beisswenger PJ, Howell SK, Touchette AD, Lal S, Szwegold BS Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999; 48:198-202
148. Coughlan MT, Forbes JM, Cooper ME Role of the AGE crosslink breaker, alagebrium, as a renoprotective agent in diabetes. *Kidney Int Suppl*, 2007:54-60
149. Hartog JW, Willemsen S, van Veldhuisen DJ, Posma JL, van Wijk LM, Hummel YM, Hillege HL, Voors AA Effects of alagebrium, an advanced glycation endproduct breaker, on exercise tolerance and cardiac function in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2011b; 13:899-908
150. Little WC, Zile MR, Kitzman DW, Hundley WG, O'Brien TX, Degroff RC The effect of alagebrium chloride (ALT-711), a novel glucose cross-link breaker, in the treatment of elderly patients with diastolic heart failure. *J Card Fail*, 2005; 11:191-195
151. Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*, 2010; 9:702-716
152. Hotta N, Kawamori R, Fukuda M, Shigeta Y Long-term clinical effects of epalrestat, an aldose reductase inhibitor, on progression of diabetic neuropathy and other microvascular complications: multivariate epidemiological analysis based on patient background factors and severity of diabetic neuropathy. *Diabet Med*, 2012; 29:1529-1533
153. Sugden MC, Zariwala MG, Holness MJ PPARs and the orchestration of metabolic fuel selection. *Pharmacol Res*, 2009; 60:141-150
154. Viollet B, Guigas B, Sanz GN, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*, 2012; 122:253-270
155. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 2009; 32:193-203

156. Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia*, 2011; 54:339-349
157. Hardie DG Neither LKB1 nor AMPK are the direct targets of metformin. *Gastroenterology*, 2006; 131:973-975
158. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, Viollet B, Guigas B Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia*, 2011; 54:3101-3110
159. Viollet B, Andreelli F AMP-activated protein kinase and metabolic control. *Handb Exp Pharmacol*, 2011:303-330
160. Bailey CJ, Turner RC Metformin. *N Engl J Med*, 1996; 334:574-579
161. Cheng AY, Fantus IG Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*, 2005; 172:213-226
162. Dicembrini I, Pala L, Rotella CM From theory to clinical practice in the use of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors therapy. *Exp Diabetes Res*, 2011; 2011:898913
163. Liepinsh E, Vilskersts R, Zvejniece L, Svalbe B, Skapare E, Kuka J, Cirule H, Grinberga S, Kalvinsh I, Dambrova M Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Br J Pharmacol*, 2009a; 157:1549-1556
164. Monti LD, Setola E, Fragasso G, Camisasca RP, Lucotti P, Galluccio E, Origgi A, Margonato A, Piatti P Metabolic and endothelial effects of trimetazidine on forearm skeletal muscle in patients with type 2 diabetes and ischemic cardiomyopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006; 290:54-59
165. Sossalla S, Maier LS Role of ranolazine in angina, heart failure, arrhythmias, and diabetes. *Pharmacol Ther*, 2012; 133:311-323
166. Kuwajima M, Harashima H, Hayashi M, Ise S, Sei M, Lu K, Kiwada H, Sugiyama Y, Shima K Pharmacokinetic analysis of the cardioprotective effect of 3-(2,2, 2-trimethylhydrazinium) propionate in mice: inhibition of carnitine transport in kidney. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999; 289:93-102
167. Hayashi Y, Tajima K, Kirimoto T, Miyake H, Matsuura N Cardioprotective effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on cardiac dysfunction induced by ischemia/reperfusion in isolated rat hearts. *Pharmacology*, 2000; 61:238-243
168. Sesti C, Simkhovich BZ, Kalvinsh I, Kloner RA Mildronate, a novel fatty acid oxidation inhibitor and antianginal agent, reduces myocardial infarct size without affecting hemodynamics. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006; 47:493-499
169. Vilskersts R, Liepinsh E, Mateuszuk L, Grinberga S, Kalvinsh I, Chlopicki S, Dambrova M Mildronate, a regulator of energy metabolism, reduces atherosclerosis in apoE/LDLR^{-/-} mice. *Pharmacology*, 2009a; 83:287-293
170. Vilskersts R, Liepinsh E, Kuka J, Cirule H, Veveris M, Kalvinsh I, Dambrova M Myocardial infarct size-limiting and anti-arrhythmic effects of mildronate orotate in the rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009b; 23:281-288
171. Degrace P, Demizieux L, Du ZY, Gresti J, Caverot L, Djaouti L, Jourdan T, Moindrot B, Guillard JC, Hocquette JF, Clouet P Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem*, 2007; 282:20816-20826
172. Harrison EH, Walusimbi-Kisitu M Properties and subcellular localization of myocardial fatty acyl-coenzyme A oxidase. *Am J Physiol*, 1988; 255:441-445
173. Degrace P, Demizieux L, Gresti J, Tsoko M, Andre A, Demaison L, Clouet P Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. *Mol Cell Biochem*, 2004; 258:171-182

174. Kuka J, Vilskersts R, Cirule H, Makreca M, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M, Liepinsh E The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012; 17:215-222
175. Srere PA Citryl-CoA. An substrate for the citrate-cleavage enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1963; 73:523-525
176. Williams SD, Hsu FF, Ford DA Electrospray ionization mass spectrometry analyses of nuclear membrane phospholipid loss after reperfusion of ischemic myocardium. *J Lipid Res*, 2000; 41:1585-1595
177. Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, Williams DR, Sonksen PH A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia*, 1993; 36:150-154
178. Yamada K, Tanaka T, Zou LB, Senzaki K, Yano K, Osada T, Ana O, Ren X, Kameyama T, Nabeshima T Long-term deprivation of oestrogens by ovariectomy potentiates beta-amyloid-induced working memory deficits in rats. *Br J Pharmacol*, 1999; 128:419-427
179. Bartus S, Sorysz D, Siudak Z, Dubiel JS, Dudek D Spontaneous closure of aorta-to-right atrium fistula after septal occluder implantation. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2008; 9:744-746
180. Konrade, I, Skapare, E, Liepins, E, Kuka, J, Petersone, I, Lejnicks, A, Bierhaus, A, and Dambrova, M Microplate assay of glyoxalase I activity in blood samples. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, 2007; 61:149-154
181. McLellan AC, Thornalley PJ Sample storage conditions for the assay of glyoxalase activities in whole blood samples. *Ann Clin Biochem*, 1992; 29 (2):222-223
182. Limphong P, Adams NE, Rouhier MF, McKinney RM, Naylor M, Bennett B, Makaroff CA, Crowder MW Converting GLX2-1 into an active glyoxalase II. *Biochemistry*, 2010; 49:8228-8236
183. Thornalley PJ, Bellavite P Modification of the glyoxalase system during the functional activation of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, 1987; 931:120-129
184. Basu S, Campbell HM, Dittel BN, Ray A Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J Vis Exp*, 2010; 41: doi:pii: 1546. 10.3791/1546
185. Pandzic J, V, Gizdic B, Miletic Z, Ostovic KT, Jaksic O Monocytes in metabolic disorders--opportunities for flow cytometry contributions. *Coll Antropol*, 2010; 34:319-325
186. Doupis J, Lyons TE, Wu S, Gnardellis C, Dinh T, Veves A Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94:2157-2163
187. McIntosh A, Peters J, Young R, Hutchinson A, Chiverton R, Clarkson S, Foster A, Gadsby R, O'Connor M, Rayman G, Feder G, Home PD: Prevention and Management of Foot Problems in Type 2 diabetes: Clinical Guidelines and Evidence. Sheffield, School of Health and Related Research (SCHARR), University of Sheffield, 2003
188. Herder C, Lankisch M, Ziegler D, Rathmann W, Koenig W, Illig T, Doring A, Thorand B, Holle R, Giani G, Martin S, Meisinger C Subclinical inflammation and diabetic polyneuropathy: MONICA/KORA Survey F3 (Augsburg, Germany). *Diabetes Care*, 2009; 32:680-682
189. Jenkins AJ, Rothen M, Klein RL, Moller K, Eldridge L, Zheng D, Durazo-Arvizu R, McGee D, Lackland D, Thorpe SR, Garvey WT, Lyons TJ Cross-sectional associations of C-reactive protein with vascular risk factors and vascular complications in the DCCT/EDIC cohort. *J Diabetes Complications*, 2008; 22:153-163

190. Arnalich F, Hernanz A, Lopez-Maderuelo D, Pena JM, Camacho J, Madero R, Vazquez JJ, Montiel C Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Horm Metab Res*, 2000; 32:407-412
191. Oltman CL, Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Lund DD, Yorek MA Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of Zucker diabetic fatty and Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005; 289:113-122
192. Oltman CL, Davidson EP, Coppey LJ, Kleinschmidt TL, Lund DD, Yorek MA Attenuation of vascular/neural dysfunction in Zucker rats treated with enalapril or rosuvastatin. *Obesity (Silver Spring)*, 2008; 16:82-89
193. Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS, George S, Kozicky M, Neito V, Recchia F, Stanley W, Wolin MS, Gupte SA Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009; 297:153-162
194. Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes*, 1999; 48:1448-1453
195. Gupte S, Labinskyy N, Gupte R, Csiszar A, Ungvari Z, Edwards JG Role of NAD(P)H oxidase in superoxide generation and endothelial dysfunction in Goto-Kakizaki (GK) rats as a model of nonobese NIDDM. *PLoS One*, 2010; 5:e11800
196. Brouwers O, Niessen PM, Haenen G, Miyata T, Brownlee M, Stehouwer CD, De Mey JG, Schalkwijk CG Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia*, 2010; 53:989-1000
197. Reijmer YD, van den Berg E, Ruis C, Kappelle LJ, Biessels GJ Cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010; 26:507-519
198. Abdul-Rahman O, Sasvari-Szekely M, Ver A, Rosta K, Szasz BK, Kereszturi E, Keszler G Altered gene expression profiles in the hippocampus and prefrontal cortex of type 2 diabetic rats. *BMC Genomics*, 2012; 13:81
199. de la Monte SM, Tong M, Nguyen V, Setshedi M, Longato L, Wands JR Ceramide-mediated insulin resistance and impairment of cognitive-motor functions. *J Alzheimers Dis*, 2010; 21:967-984
200. Vijayakumar, T, Sirisha, G, Farzana Begam, M, and Dhanaraju, M Mechanism linking cognitive impairment and diabetes mellitus. *Eur J Appl Sci*, 2012; 4:1-5
201. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab*, 2008b; 7:45-56
202. McGarry JD, Mills SE, Long CS, Foster DW Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J*, 1983; 214:21-28
203. Asaka N, Muranaka Y, Kirimoto T, Miyake H Cardioprotective profile of MET-88, an inhibitor of carnitine synthesis, and insulin during hypoxia in isolated perfused rat hearts. *Fundam Clin Pharmacol*, 1998; 12:158-163
204. Liepinsh E, Kuka J, Svalbe B, Vilskersts R, Skapare E, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M Effects of long-term mildronate treatment on cardiac and liver functions in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009b; 105:387-394
205. Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, Yamazaki K, Kira K, Saeki T, Tanaka I Metformin causes reduction of food intake and body weight gain and improvement of glucose

- intolerance in combination with dipeptidyl peptidase IV inhibitor in Zucker fa/fa rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004; 310:614-619
206. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 1998; 352:837-853
 207. Khan MA, St Peter JV, Xue JL A prospective, randomized comparison of the metabolic effects of pioglitazone or rosiglitazone in patients with type 2 diabetes who were previously treated with troglitazone. *Diabetes Care*, 2002; 25:708-711
 208. Abdulla MH, Sattar MA, Johns EJ The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat. *Int J Nephrol*, 2011; 2011:934659
 209. Grimaldi PA Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 2007; 64:2459-2464
 210. Duncan JG Peroxisome proliferator activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) regulation of cardiac metabolism in diabetes. *Pediatr Cardiol*, 2011; 32:323-328
 211. Satapati S, He T, Inagaki T, Potthoff M, Merritt ME, Esser V, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, Browning JD, Burgess SC Partial resistance to peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonists in ZDF rats is associated with defective hepatic mitochondrial metabolism. *Diabetes*, 2008; 57:2012-2021
 212. Luiken JJ, Niessen HE, Coort SL, Hoebbers N, Coumans WA, Schwenk RW, Bonen A, Glatz JF Etomoxir-induced partial carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) inhibition in vivo does not alter cardiac long-chain fatty acid uptake and oxidation rates. *Biochem J*, 2009; 419:447-455
 213. Doenst T, Richwine RT, Bray MS, Goodwin GW, Frazier OH, Taegtmeyer H Insulin improves functional and metabolic recovery of reperfused working rat heart. *Ann Thorac Surg*, 1999; 67:1682-1688
 214. Ussher JR, Wang W, Gandhi M, Keung W, Samokhvalov V, Oka T, Wagg CS, Jaswal JS, Harris RA, Clanachan AS, Dyck JR, Lopaschuk GD Stimulation of glucose oxidation protects against acute myocardial infarction and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2012; 94(2):359-369
 215. Korge P, Honda HM, Weiss JN Effects of fatty acids in isolated mitochondria: implications for ischemic injury and cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285:259-269
 216. Beauloye C, Bertrand L, Horman S, Hue L AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res*, 2011; 90:224-233
 217. Kim M, Tian R Targeting AMPK for cardiac protection: opportunities and challenges. *J Mol Cell Cardiol*, 2011; 51:548-553
 218. Gupta S, Young D, Maitra RK, Gupta A, Popovic ZB, Yong SL, Mahajan A, Wang Q, Sen S Prevention of cardiac hypertrophy and heart failure by silencing of NF-kappaB. *J Mol Biol*, 2008; 375:637-649
 219. Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Davidson MM, Chan TO, Feldman AM, Laguna JC, Vazquez-Carrera M The p65 subunit of NF-kappaB binds to PGC-1alpha, linking inflammation and metabolic disturbances in cardiac cells. *Cardiovasc Res*, 2010; 87:449-458
 220. Kono K, Kamijo Y, Hora K, Takahashi K, Higuchi M, Kiyosawa K, Shigematsu H, Gonzalez FJ, Aoyama T PPAR{alpha} attenuates the proinflammatory response in activated mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009; 296:328-336

221. Foster DW The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:1-16
222. Mingrone G Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:99-107
223. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol*, 2007; 581:431-444
224. Uziel G, Garavaglia B, Di DS Carnitine stimulation of pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) in isolated human skeletal muscle mitochondria. *Muscle Nerve*, 1988; 11:720-724
225. Okuda Y, Kawai K, Murayama Y, Yamashita K Postprandial changes in plasma ketone body and carnitine levels in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Endocrinol Jpn*, 1987; 34:415-422
226. Poorabbas A, Fallah F, Bagdadchi J, Mahdavi R, Aliasgarzadeh A, Asadi Y, Koushavar H, Vahed JM Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. *Eur J Clin Nutr*, 2007; 61:892-895
227. Pregant P, Scherthaner G, Legenstein E, Lienhart L, Bruck S, Schnack C, Kaiser E Decreased plasma carnitine in Type I diabetes mellitus. *Klin Wochenschr*, 1991; 69:511-516
228. Pregant P, Kaiser E, Scherthaner G No effect of insulin treatment or glycemic improvement on plasma carnitine levels in type 2 diabetic patients. *Clin Investig*, 1993; 71:610-612
229. Soltesz G, Melegh B, Sandor A The relationship between carnitine and ketone body levels in diabetic children. *Acta Paediatr Scand*, 1983; 72:511-515
230. Tamamogullari N, Silig Y, Icagasioglu S, Atalay A Carnitine deficiency in diabetes mellitus complications. *J Diabetes Complications*, 1999; 13:251-253
231. Winter SC, Simon M, Zorn EM, Szabo-Aczel S, Vance WH, O'Hara T, Higashi L Relative carnitine insufficiency in children with type I diabetes mellitus. *Am J Dis Child*, 1989; 143:1337-1339
232. Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006; 142:77-85
233. Demarquoy J, Georges B, Rigault C, Royer M, Clairet A, Soty M, Lekounougou S, Le Borgne F Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chemistry*, 2004; 86:137-142
234. American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes-2011. *Diabetes Care*, 2011; 34:11-61
235. Hodge AM, English DR, Itsiopoulos C, O'Dea K, Giles GG Does a Mediterranean diet reduce the mortality risk associated with diabetes: evidence from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011; 21:733-739
236. Aune D, Ursin G, Veierod MB Meat consumption and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Diabetologia*, 2009; 52:2277-2287
237. Craig WJ Nutrition concerns and health effects of vegetarian diets. *Nutr Clin Pract*, 2010; 25:613-620
238. Psaltopoulou T, Ilias I, Alevizaki M The role of diet and lifestyle in primary, secondary, and tertiary diabetes prevention: a review of meta-analyses. *Rev Diabet Stud*, 2010; 7:26-35
239. Bain MA, Milne RW, Evans AM Disposition and metabolite kinetics of oral L-carnitine in humans. *J Clin Pharmacol*, 2006; 46:1163-1170
240. Rebouche CJ Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1033:30-41

241. Vernez L, Dickenmann M, Steiger J, Wenk M, Krahenbuhl S Effect of L-carnitine on the kinetics of carnitine, acylcarnitines and butyrobetaine in long-term haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21:450-458
242. Verrina E, Caruso U, Calevo MG, Emma F, Sorino P, De PT, Lavoratti G, Turrini DL, Cassanello M, Cerone R, Perfumo F Effect of carnitine supplementation on lipid profile and anemia in children on chronic dialysis. *Pediatr Nephrol*, 2007; 22:727-733
243. Hurot JM, Cucherat M, Haugh M, Fouque D Effects of L-carnitine supplementation in maintenance hemodialysis patients: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13:708-714
244. Delanghe J, De Slypere JP, De BM, Robbrecht J, Wieme R, Vermeulen A Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. *Clin Chem*, 1989; 35:1802-1803
245. Barnard ND, Gloede L, Cohen J, Jenkins DJ, Turner-McGrievy G, Green AA, Ferdowsian H A low-fat vegan diet elicits greater macronutrient changes, but is comparable in adherence and acceptability, compared with a more conventional diabetes diet among individuals with type 2 diabetes. *J Am Diet Assoc*, 2009; 109:263-272
246. Kahleova H, Matoulek M, Malinska H, Oliyarnik O, Kazdova L, Neskudla T, Skoch A, Hajek M, Hill M, Kahle M, Pelikanova T Vegetarian diet improves insulin resistance and oxidative stress markers more than conventional diet in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med*, 2011; 28:549-559

9. PIELIKUMI

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Rīgā, Cēsu ielā 31/6, LV1012, 3.stāvs 323. kabinets

tel. 7043776

fax 7043701

27. jūnijs 2008.g. A-11

Lēmums Nr.11

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2008.gada 27.jūnijā izskatīja Stradiņa Universitātes Iekšējgo slimību katedras iesniegto pieteikuma projektu „Metaboloma metodes izmantošanas iespējas agrīnai ogļhidrātu vielmaiņas patoloģijas diagnostikai”.

Pamatojoties uz Centrālā medicīnas ētikas komitejas 2008. gada 27. jūnija sēdes protokola Nr. 4 punktu 6., tiek izsniegts atzinums, ka Stradiņa universitātes Iekšējgo slimību katedras iesniegtais pieteikuma projekts „Metaboloma metodes izmantošanas iespējas agrīnai ogļhidrātu vielmaiņas patoloģijas diagnostikai” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas komitejas
priekšsēdētāja vietnieks



prof. A. Lejnīks

L.Rudze, 7043776

9.1. att. Centrālās medicīnas ētikas komitejas atzinums.



3.pielikums
procedūrai KR.10.P.068
versija 02
lpp.1 no 1

PĀRTIKAS UN VETERINĀRĀ DIENESTA
ATĻAUJA Nr. 38
DZĪVNIEKU IZMANTOŠANAI IZMĒGINĀJUMĀ

Atļaujas saņēmējs

Latvijas Organiskās sintēzes institūts Farmaceutiskās Farmakoloģijas laboratorija
PVD Reģ.nr. 022842

Izmēģinājumu dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra nr.)

Reinis Vilškersts, PVD atļaujas nr.5

Par izmēģinājumu atbildīgā persona (vārds, uzvārds, PVD atļaujas nr.)

Izmēģinājuma nosaukums

„Farmakoloģiskās un bioloģiskās vielu aktivitātes pārbaude kardiovaskulārajos izmēģinājuma modeļos Latvijas Organiskās sintēzes institūtā”

Izmēģinājumā izmantojamie dzīvnieki

700 peles un 2000 žurkas/gadā
(suga un skaits)

Izmēģinājumu norises vieta

Rīga, Rātsupītes iela 1, LV 1006
(faktiskā adrese)

Atļaujas darbības laiks no

01.01.2012.g.
(dd. mm. gggg.)

līdz

31.12.2016.g.
(dd. mm. gggg.)

Ģenerāldirektora pienākumu izpildītājs


E. Zavadskis


ED-2 (1 no 1) 02.versija

9.2. att. Pārtikas un veterinārā dienesta atļauja dzīvnieku izmantošanai izmēģinājumos.