



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Elīna Škapare

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

Promocijas darba kopsavilkums
farmācijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – Farmaceitiskā farmakoloģija

Rīga, 2012

Promocijas darbs izstrādāts:

Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā.

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. pharm., asoc. profesore **Maija Dambrova**, Latvijas Organiskās sintēzes institūta Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijas vadītāja

Dr. chem., doc. **Renāte Medne**, Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas ķīmijas katedras vadītāja

Oficiālie recenzenti:

Dr. biol., asoc. profesors **Andrejs Šķesters**, Rīgas Stradiņa universitātes Bioķīmijas laboratorijas vadītājs

Dr. habil. biol., profesors **Nikolajs Sjakste**, Latvijas Universitātes Medicīnas bioķīmijas katedras vadītājs

Dr., asoc. prof. **Vilmante Borutaite**, Biomedicīnas Pētījumu institūts, Kauņas Medicīnas universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2013. gada 11. janvārī plkst.15.00 Rīgas Stradiņa universitātes Farmācijas promocijas padomes atklātā sēdē Rīgā, Dzirciema ielā 16, Hipokrāta auditorijā.

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



IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ



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

Promocijas padomes sekretārs: *Dr. pharm.*, asoc. profesore **Anna Vītola**

SATURS

Ievads.....	4
1. Materiāli un metodes	5
1.1. Klīniskā pētījuma dalībnieki.....	5
1.2. Dzīvnieki	6
1.3. Bioķīmisko parametru mērījumi.....	7
1.4. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes noteikšana.....	7
1.5. Datu statistiskā apstrāde	7
2. Rezultāti.....	8
2.1. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar sāpīgu neiropātijas attīstību.....	8
2.2. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes izmaiņas eksperimentālajos dzīvnieku modeļos	11
2.3. Enerģijas metabolismu ietekmējošu savienojumu un to kombināciju lietošanas efektivitāte ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā	15
2.4. Mildronāta kardioprotektīvā efekta molekulāro mehānismu izpēte....	20
2.5. Asins L-karnitīna koncentrācijas saistība ar cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības pakāpi 1. un 2. tipa CD pacientiem.....	26
3. Diskusija	28
3.1. Glioksalāžu enzīmu aktivitātes izmaiņas diabēta gadījumā.....	29
3.2. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar vēlīno komplikāciju attīstību....	31
3.3. Enerģijas metabolisma regulācija eksperimentālajos ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju modeļos	33
3.4. Mildronāta molekulārie darbības mehānismi.....	36
3.5. L-karnitīna koncentrācijas saistība ar cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības pakāpi CD pacientes.....	39
4. Secinājumi	41
5. Darba aprobācija – publikācijas un tēzes	42
6. Izmantotā literatūra	45

IEVADS

Pētījuma aktualitāte

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 neiropātijas attīstību 1. un 2. tipa CD pacientiem, kas apliecina samazinātas Glo1 aktivitātes nozīmi sāpīgas diabētiskās neiropātijas attīstībā. Zemāka Glo1 aktivitāte neravidos saistīta ar augstāku glikozes un triglicerīdu koncentrāciju, kā arī traucētu endotēlija funkcionalitāti eksperimentālajā 2. tipa diabēta modelī. 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.

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.

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 neiropātijas 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 vēlino komplikāciju attīstību un smaguma pakāpi.

Darba hipotēzes

1. Glo1 aktivitāte ir izmantojama agrīnu CD vēlino 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 vēlino 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. MATERIĀLI UN METODES

1.1. 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 apstiprinājusī Centrālā medicīnas ētikas komiteja (2008. gada 27. jūnija

lēmums A-11). Visi pētījuma dalībnieki parakstījuši informētas piekrišanas formu. 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. Diabēta pacientu atlase, vēlīno komplikāciju noteikšana un paraugu savākšana tika veikta sadarbībā ar Dr. med. Ilzi Konrādi.

1.2. Dzīvnieki

Eksperimentiem tika izmantoti pieauguši *Wistar* līnijas žurku tēviņi (Rīgas Stradiņa universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Latvija), *Wistar* un *Goto-kakizaki* līnijas žurku tēviņi (Taconic Farms, ASV), *Zucker fa/fa* un atbilstoša vecuma *Zucker lean* (Charles River Laboratories, Francija) līnijas žurku tēviņi. 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.

Žurkām termiski izraisītu sāpju sajūtas tests (anģļu val. *tail flick test*) tika veikts atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Liepinsh, 2009a). Mehāniski izraisītu sāpju sajūtas (anģļu val. *paw pressure test*) izmaiņas noteica ar speciālu aparātu (Ugo Basile, Itālija) (Skapare, 2012). Y veida labirinta tests tika izmantots, lai novērtētu darbības atmiņu *Zucker*, *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurkām un veikts atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Yamada, 1999). *Zucker fa/fa*, *Zucker lean*, *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurku aortu endotēlija-atkarīgo funkciju noteica atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Bartus, 2008).

Izolētās žurku sirds infarktu eksperimentu veica saskaņā ar iepriekš aprakstītu procedūru (Liepinsh, 2006). Infarkta lielumu noteica, aprēķinot nekrozes lielumu pret kopējo riska zonas lielumu. Kontroles vērtības pieņēma kā 100 % un pārējos rezultātus attiecīgi pārrēķināja. Sirds audu paraugus taukskābju, RT-PKĶR un imunoblota analīzēm izolēja, atdalot veselos audus jeb sirds audu neriska zonu un nekrotiskos jeb riska zonu pēc 30 min išēmijas un 60 min reperfūzijas.

Radioiezīmētā palmitāta oksidāciju mērīja, izmantojot iepriekš aprakstītu metodi (Lopaschuk, 1997), izmantojot 9,10- ^{3}H]palmitātu (specifiskā aktivitāte 60 Ci/mmol). Karnitīna palmitoiltransferāzes I (KPT I)-neatkarīgas garķēžu taukskābju oksidācijas noteikšanai mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumus veica ar 36 μM palmitoil-karnitīnu saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Kuka, 2012). Mitohondriju funkcionalitātes novērtēšanai, sirds kambara muskuļa šķiedras kūlīšus izolēja no sirds audu riska un neriska zonas un permeabilizēja saskaņā ar iepriekš aprakstītu metodi (Kuka, 2012). Taukskābju daudzuma noteikšana tika veikta sadarbībā ar Dr. chem. O. Pugoviču un Dr. chem. S. Grīnbergu (Latvijas Organiskās sintēzes institūts).

PPAR α , PPAR γ un citu taukskābju metabolismā iesaistīto regulējošo faktoru daudzuma noteikšanai sirds un aknu audos imunoblota analīzi veica atbilstoši iepriekš aprakstītai procedūrai (Liepinsh, 2011). RT-PĶR analīzi veica Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System aparātā atbilstoši ražotāju protokoliem un instrukcijām.

1.3. Bioķīmisko parametru mērījumi

Brīvo taukskābju, triglicerīdu, glikogēna, glikozes, insulīna un laktāta koncentrācijas mērījumiem eksperimentālajos paraugos izmantoja Wako, Instrumentation Laboratory, Millipore un Roche noteikšanas reaģentu komplektus atbilstoši ražotāju instrukcijām.

Klīnisko pētījumu dalībniekiem venozās asins paraugos noteica glikozes, glikētā hemoglobīna (HbA_{1c}), lipīdu un augstas jutības C reaktīvā proteīna (hs-CRP) daudzumu akreditētā klīniskās slimnīcas laboratorijā ar komerciāli pieejamiem noteikšanas reaģentu komplektiem atbilstoši ražotāja instrukcijām.

1.4. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes noteikšana

Glo1 aktivitāti asins lizātos un audu paraugos noteica, mērot absorbcijas pieaugumu 5 minūšu laikā pie 240 nm, no hemitioacetāla veidojoties S-D-laktoilglutacionam. Lai nodrošinātu neenzimātisku hemitioacetāla veidošanos, 2 mM reducētā glutaciona ūdens šķīdumu un ekvimolāru metilglioksāla daudzumu 50 mM Na₂HPO₄ buferšķīdumā pH = 6.6 inkubēja +37°C temperatūrā 10 minūtes. Savukārt Glo2 aktivitāti asins lizātos un audu paraugos noteica, mērot absorbcijas samazinājumu 5 minūšu laikā pie 240 nm (Phillips, 1993). Glioksalāžu aktivitāte asins lizātos tika aprēķināta, izmantojot S-D-laktoilglutaciona standartlīkni, un izteikta kā μmol S-D-laktoilglutaciona, kas veidojušies vai hidrolizējušies 1 minūtes laikā 1 ml asins, standartizējot pret Hb daudzumu g (U/g Hb). 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).

1.5. Datu statistiskā apstrāde

Kvantitatīvie mainīgie attēloti kā vidējās aritmētiskās vērtības $\pm$ vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda (SEM) vai kā mediānas (starpkvartīļu intervāli), ja dati neatbilda normālajam sadalījumam. Kvalitatīvie mainīgie raksturoti kā skaits (n) un procentuālā proporcija (%). Grupsalīdzināšanai 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 diabētiskās neiropātijas riska 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.

2. REZULTĀTI

2.1. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar sāpīgu neiropātijas attīstību

Pētījuma dalībnieku demogrāfiskais un klīniskais raksturojums apkopots 2.1. tabulā. Kā redzams tabulā, salīdzinot ar 1. tipa CD pacientiem, 2. tipa CD pacientiem bija statistiski ticami augstāks ķermeņa masas indekss un tie bija vecāki (2.1. tabula).

2.1. tabula

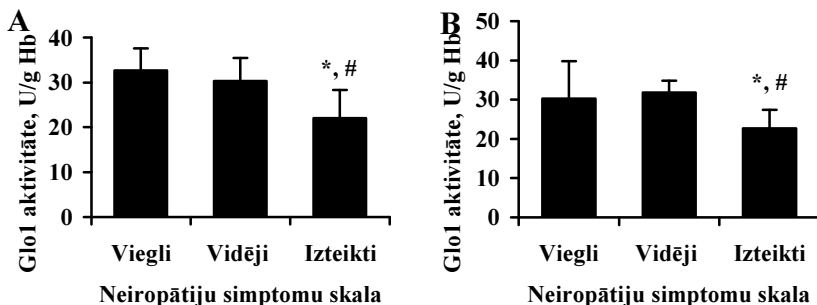
Cukura diabēta pacientu un kontroles grupas demogrāfiskais un klīniskais raksturojums

Noteiktie parametri	Kontrole	1. tipa CD	2. tipa CD
Skaits, 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)
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)

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. Vidējā Glo2 aktivitāte 1. un 2. tipa CD pacientu asins paraugos neatšķīrās no kontroles grupas. 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 CD pacientiem (2.1. attēls).



2.1. att. Glo1 aktivitātes saistība ar neiropātijas simptomu smaguma pakāpi (A) 1. tipa ($n = 88$) un (B) 2. tipa ($n = 74$) CD pacientiem. 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, $p < 0,05$).

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. Gan 1. tipa, gan 2. tipa cukura diabēta pacientiem Glo1 aktivitāte nekorelē 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.

Tā kā Glo1 aktivitāte bija samazināta pacientiem ar izteiktiem sāpīgas neiropātijas simptomiem, noteiktie bioķīmiskie parametri tika salīdzināti CD pacientiem ar nesāpīgu un sāpīgu neiropātiju. Pacientiem ar sāpīgu neiropātiju un neiropātiju bez sāpēm bija līdzīga nervu disfunkcijas pakāpe. Gan 1., gan 2. tipa CD pacientiem ar sāpīgu neiropātiju, salīdzinot ar pacientiem ar neiropātiju bez sāpēm, Glo1 aktivitāte bija statistiski samazināta attiecīgi par 12 un 14% (2.2. tabula).

Kā redzams 2.2. tabulā, 1. un 2. tipa diabēta pacienti ar sāpīgu neiropātiju, salīdzinot ar pacientiem ar nesāpīgu neiropātiju, 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 neiropātiju, salīdzinot ar pacientiem ar neiropātiju bez sāpēm, ĶMI bija palielināts par 10%. Pacientiem ar sāpīgu neiropātiju pārējie noteiktie parametri neatšķīrās, salīdzinot ar pacientiem ar neiropātiju bez sāpēm.

2.2. 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>	Nesāpīga neiropātija	Sāpīga neiropātija	<i>p</i>
Skaits, 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
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)	<0.0001
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
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

Rezultāti attēloti kā mediānas (starpkvartīļu intervāls) vai skaits.

Glo1 aktivitātei palielinoties par vienu vienību, ticami samazinājās sāpīgas neiropātijas risks, ņemot vērā pacientu vecumu, diabēta ilgumu un ĶMI multivariantajā analīzē (2.3. tabula).

2.3. tabula

Glo1 aktivitātes saistība ar sāpīgas neiropātijas 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
ĶMI, 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)).

Tikai 2. tipa CD pacientiem diabēta ilgums statistiski ticami bija saistīts ar sāpīgas neiropatijas iespējamību (2.3. tabula). Sāpīgas neiropatijas iespējamība nebija saistīta ar vecumu ne 1. tipa, ne 2. tipa CD gadījumā.

2.2. Glioksalāzes enzīmu aktivitātes izmaiņas eksperimentālajos dzīvnieku modeļos

Kā redzams 2.4. tabulā, *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 (2.4. tabulā).

HbA_{1C} koncentrācija *Goto-Kakizaki* un *Zucker fa/fa* žurkām bija attiecīgi 8,4±0,1 un 6,7±0,2% un statistiski ticami atšķīrās no kontroles dzīvniekiem (2.4. 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 (2.4. tabula).

2.4. tabula

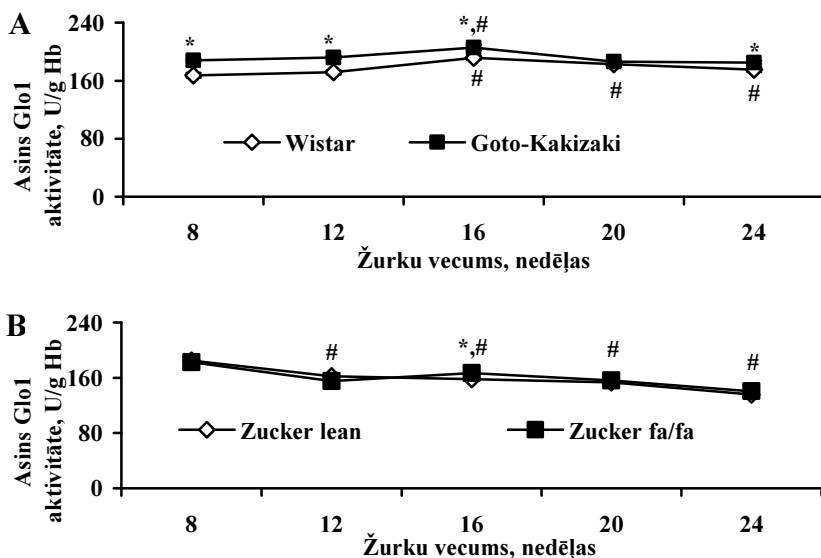
Bioķīmiskie parametri žurku plazmā

	Wistar	Goto-Kakizaki	Zucker lean	Zucker fa/fa
		Ēdušas		
Plazmas glikoze, mM	7.65±0.15	12.11±0.78*	8.73±0.20	8.97±0.16
Triglicerīdi, mM	0.51±0.03	1.13±0.08*	0.70±0.10	6.37±0.78#
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		
Plazmas glikoze, mM	6.0±0.2	8.3±0.3*	7.4±0.2	8.3±0.2#
Triglicerīdi, mM	0.5±0.03	0.8±0.1*	0.8±0.2	7.9±1.0#
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

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. 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% (2.4. tabula).

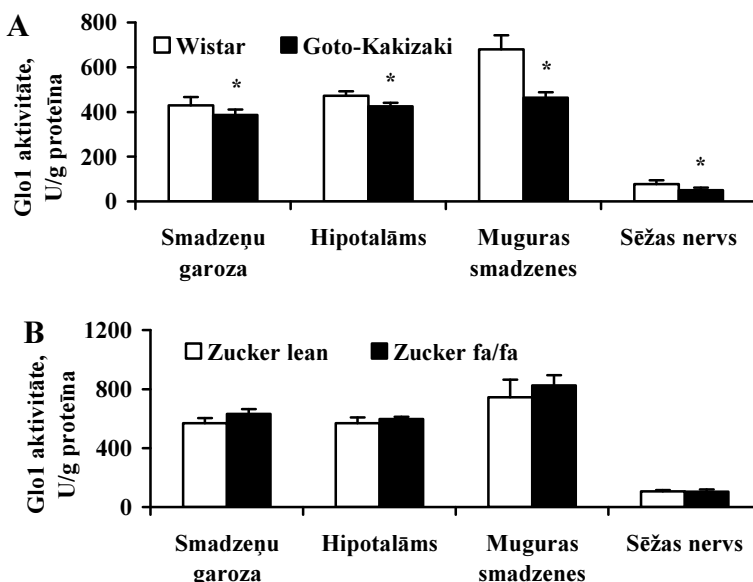
Eksperimenta sākumā *Glo1* aktivitāte *Goto-Kakizaki* žurkām 8 nedēļu vecumā bija statistiski ticami paaugstināta attiecīgi par 12%, salīdzinot ar vienāda vecuma *Wistar* žurkām, taču pēc 16 nedēļām šī atšķirība samazinājās līdz 5% (2.2.A. attēls). Līdzīgas izmaiņas novērojām arī asins *Glo2* aktivitātē *Goto-Kakizaki* žurkām.



2.2. att. Glo1 aktivitātes izmaiņas *Wistar* un *Goto-Kakizaki* žurku (A), *Zucker fa/fa* un *Zucker lean* (B) 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% (2.3.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%. *GLO1* un *GLO2* mRNS daudzums galvas, muguras un sēžas nerva audos 24

nedēļu vecām *Goto-Kakizaki* žurkām nebija izmainīts, salīdzinot ar kontroles grupu.

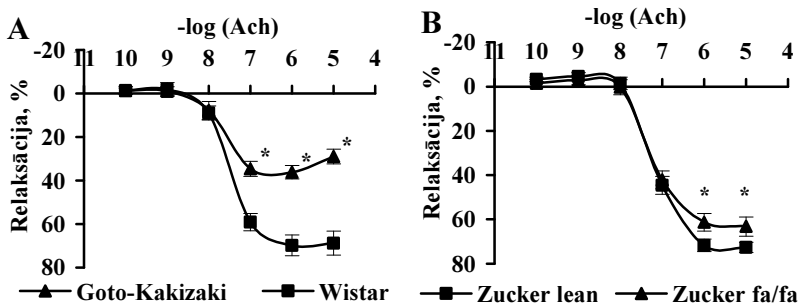


2.3. att. Glo1 aktivitāte galvas smadzeņu garozas, hipotalāma, muguras smadzeņu un sēžas nerva audos *Wistar* un *Goto-Kakizaki* (A), *Zucker fa/fa* un *Zucker lean* (B) žurkām 24. nedēļā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6 dzīvniekos $\pm$ SEM.

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

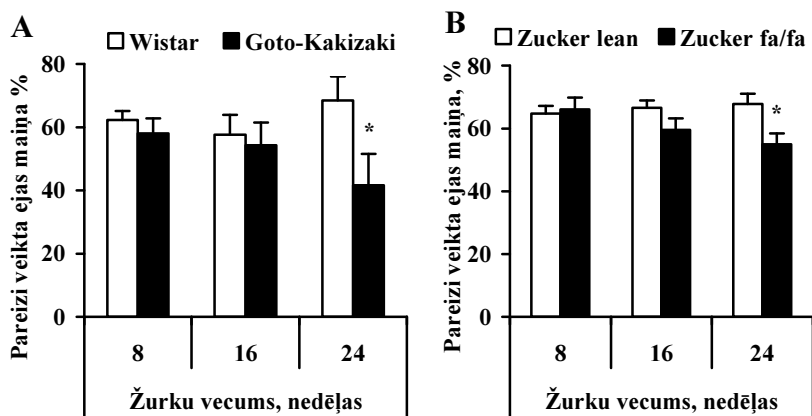
Zucker fa/fa žurkām, salīdzinot ar *Zucker lean* žurkām, asins lizātu un neironālo audu Glo1 aktivitāte nebija izmainīta (2.2.B. un 2.3.B. attēls). Glo2 aktivitāte asins lizātos 16 nedēļu laikā bija palielināta vidēji par 5-20%. Glo1 un Glo2 aktivitāte *Zucker fa/fa* žurku neironālajos audos neatšķīrās no *Zucker lean* žurku enzīmu aktivitātes, vai bija nedaudz paaugstināta.

Goto-Kakizaki un *Zucker fa/fa* žurku endotēlija-atkarīgā aortu gredzenu atslābšana acetilholīna ietekmē bija statistiski ticami izmainīta, salīdzinot ar kontroles grupu (2.4. 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% (2.4. attēls).



2.4. att. Izolētu aortu endotēlija-atkarīgā atslābšana acetilholīna 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 (Stjūdenta 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.



2.5. att. Īslaicīgās atmiņas darbība *Wistar* un *Goto-Kakizaki* (A), *Zucker lean* un *Zucker fa/fa* (B) 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% (2.5. attēls). Izziņas un atmiņas funkcijas *Goto-Kakizaki* un *Zucker fa/fa* žurkām 8 un 16 nedēļu vecumā neatšķīrās no kontroles grupas (2.5. attēls).

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 (2.5. tabula).

2.5. 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
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

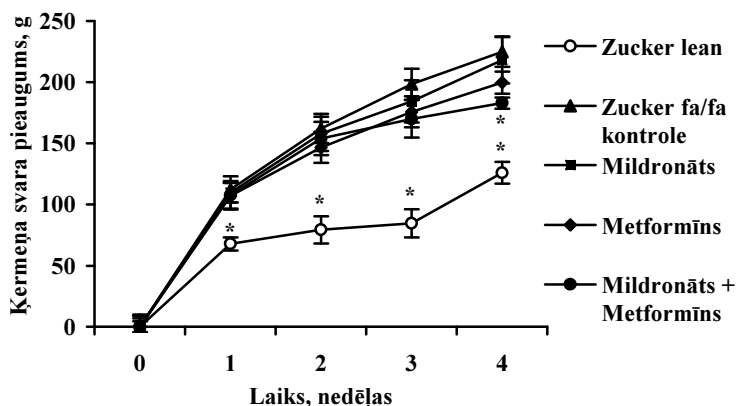
Rezultāti attēloti kā Spīrmena korelācijas koeficienti (*r*), ns – dati nav statistiski ticami, *p*>0,05.

Goto-Kakizaki žurku neironālajos audos maksimālā endotēlija relaksācija statistiski ticami korelēja ar augstāku Glo1 aktivitāti (2.5. 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.

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

Uzsākot eksperimentu, *Zucker fa/fa* žurkas nejaušināti sadalīja 4 grupās pa 10 žurkām katrā. Vienu reizi dienā p.o. ievadīja atbilstošo zāļu vielu

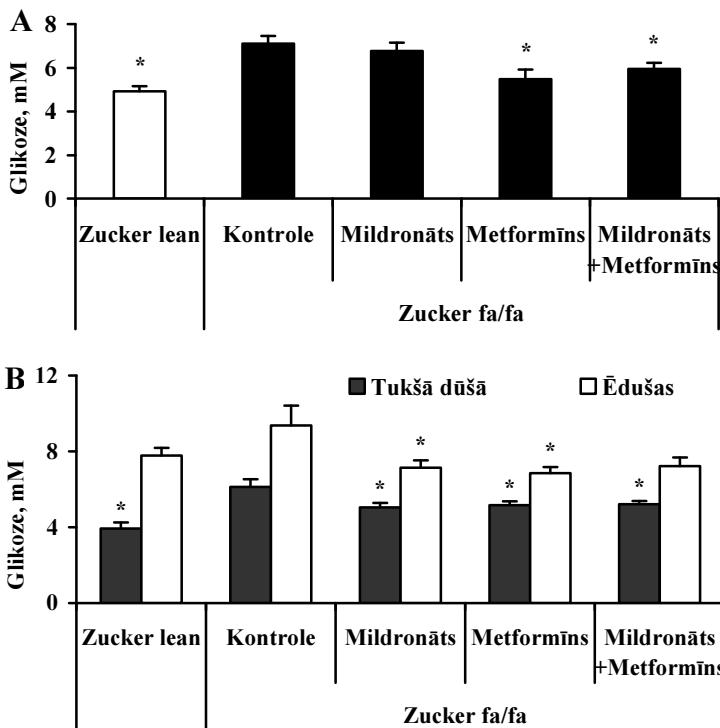
vai ūdeni kontroles grupu dzīvniekiem. *Zucker* žurku svars un apēstās barības daudzums tika mērīts eksperimenta sākumā, kā arī mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšanas periodā.



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

Kā redzams 2.6. attēlā, *Zucker fa/fa* žurkām svara pieaugums bija aptuveni divas reizes lielāks kā *Zucker lean* kontroles grupā. Atsevišķa mildronāta vai metformīna ievadīšanas neietekmēja svara pieaugumu, taču mildronāta un metformīna kombinācijas 4 nedēļu ievadīšanas gadījumā svara pieaugums bija par 19% mazāks, salīdzinot ar *Zucker fa/fa* kontroles žurkām (2.6. attēls).

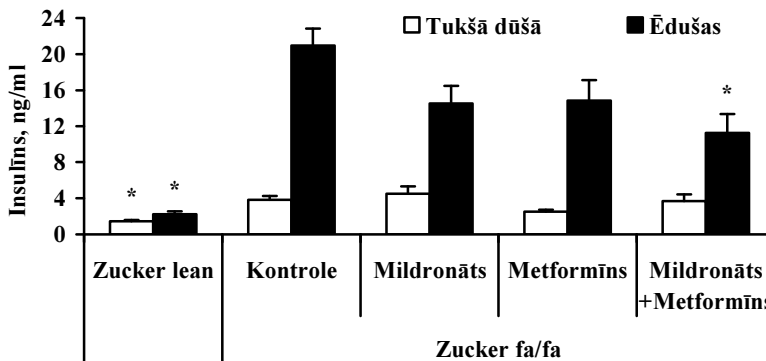
Eksperimenta sākumā glikozes koncentrācija asinīs *Zucker fa/fa* žurkām bija 1,5 reizes augstāka kā *Zucker lean* kontrolei (attiecīgi $7,1 \pm 0,4$ un $4,9 \pm 0,2$ mM). Akūta metformīna un tā kombinācijas ar mildronātu ievadīšana (1h pēc zāļu vielu ievadīšanas) samazināja glikozes koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku asinīs attiecīgi par 22 un 17% (2.7.A. attēls).



2.7. att. Akūtas (A) un ilgstošas (B) mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšanas ietekme uz glikozes koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku asinīs. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos $\pm$ SEM. *Statistiski ticami atšķiras no *Zucker fa/fa* kontroles grupas (Dunnetta tests, $p < 0,05$).

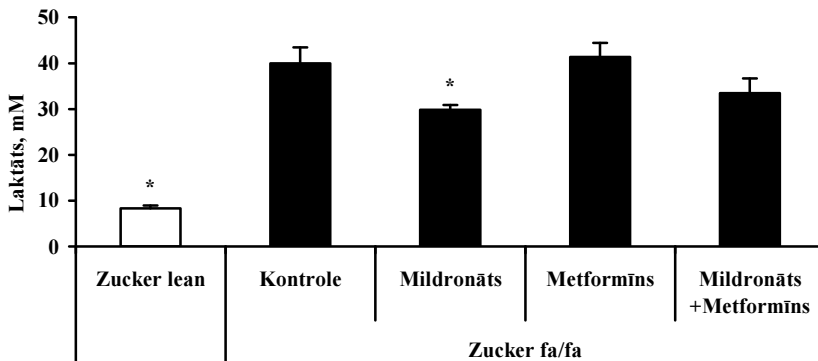
Akūta mildronāta ievadīšana neizmainīja glikozes koncentrāciju asinīs. Ilgstoša (4 nedēļu) gan atsevišķa mildronāta un metformīna, gan to kombinācijas ievadīšana novērsa diabēta simptomu attīstību un samazināja glikozes koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurkām - ēdušām un tukšā dūšā attiecīgi par 24 un 19% (2.7.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 (2.8. attēls). Ēdušām *Zucker fa/fa* žurkām mildronāta vai metformīna ievadīšanas 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% (2.8. attēls).



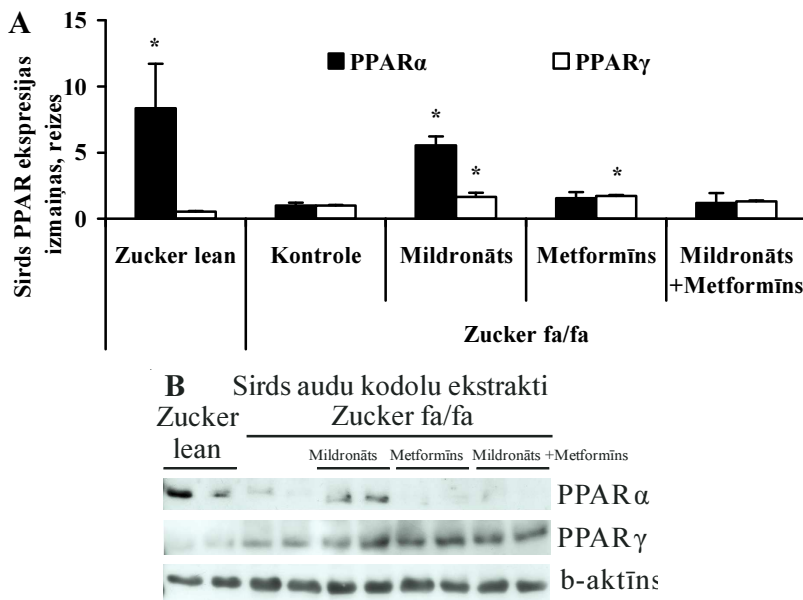
2.8. att. Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz insulīna koncentrāciju *Zucker fa/fa* žurku plazmā. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 8 dzīvniekos $\pm$ SEM. *Statistiski ticami atšķiras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

Ekspērimēta beigās laktāta koncentrācija ēdušu *Zucker fa/fa* žurku plazmā bija 5 reizes augstāka kā kontroles žurkām (2.9. attēls). 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% (2.9. attēls). Metformīna ievadīšana plazmas laktāta koncentrāciju neietekmēja.



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

Mildronāta, metformīna un to kombinācijas ievadīšanas ietekme uz PPAR α un PPAR γ daudzuma izmaiņām sirds audos apkopota 2.10. 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. *Zucker fa/fa* žurku sirds audu kodolu PPAR γ daudzums bija 2 reizes lielāks kā *Zucker lean* žurkām. Mildronāta un metformīna ievadīšana ticami palielināja PPAR γ daudzumu sirds audu kodolos 1,7 reizes.



2.10. 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 PPAR α un PPAR γ daudzumu *Zucker fa/fa* žurku sirds (A, B) 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, $p < 0,05$)

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-PKĶR analīzes metodi. Kā redzams 2.6. tabulā, glikozes transportproteīna 4 (GLUT4) mRNS daudzums *Zucker fa/fa* žurku sirds audos bija samazināts 1,8 reizes.

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
GLUT4	1.8±0.5*	1.0±0.1	1.4±0.4	0.8±0.2	3.9±2.1*
LPL	1.6±0.1*	1.0±0.1	1.5±0.2*	1.0±0.1	1.8±0.3*
mKPT 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*

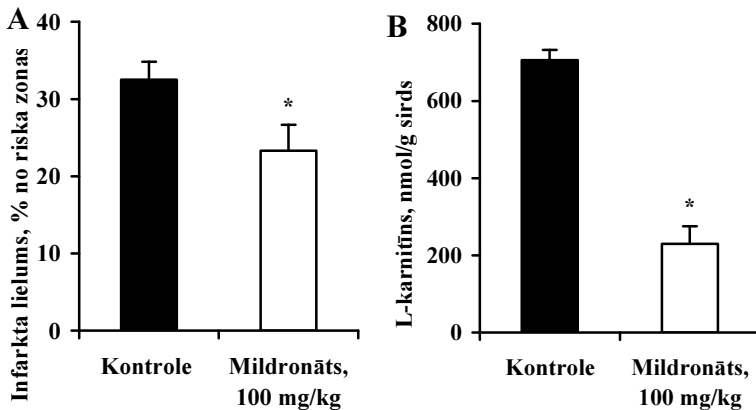
Mildronāta (200 mg/kg), metformīna (300 mg/kg) un to kombinācijas (200 mg/kg mildronāta + 300 mg/kg metformīna) 4 nedēļu ievadīšanas ietekme uz glikozes un taukskābju gēnu ekspresijas mRNS izmaiņām sirds audos. Rezultāti ir vidējais no mērījumiem vismaz 4 dzīvniekos ± SEM. *Statistiski ticami atšķiras 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. Taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu (lipoproteīnu lipāzes (LPL), karnitīna palmitoiltransferāzes I, muskuļu izoformas (mKPT I), acil-CoA oksidāzes 1 (ACOX), garķēžu acil-CoA sintetāzes (ACSL) un peroksisomālā membrānu proteīna 13 (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 PPARα mērķgēnu ekspresiju sirds audos (2.6. tabula).

2.4. Mildronāta kardioprotektīvā efekta molekulāro mehānismu izpēte

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 un mitohondriju 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

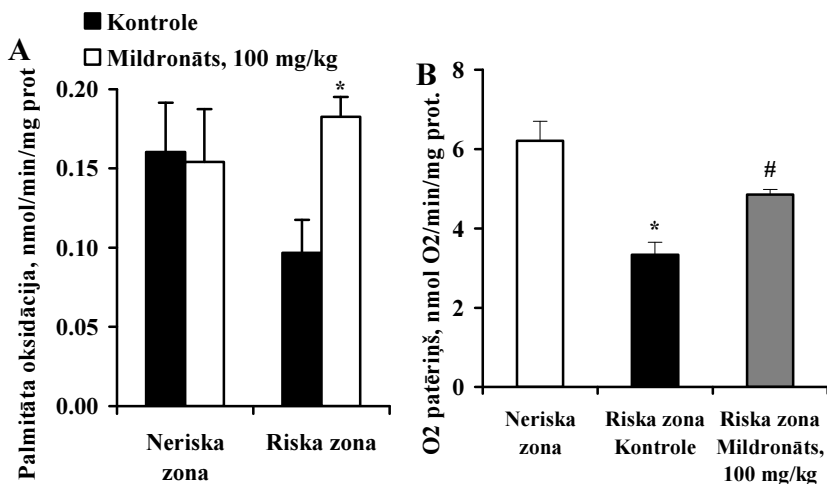
lietošanas infarkta izmēra samazinošais efekts nav saistīts ar izmaiņām sirds veiktajā darbā. Riska zonas lielums gan kontroles, gan mildronāta grupās arī bija vienāds. Infarkta zonas lielums kontroles žurku sirdīs bija 32.5% no riska zonas, bet mildronāta ievadīšana ticami samazināja L-karnitīna koncentrāciju sirds audos un infarkta izmēru par 28% (2.11.A. attēls).



2.11. att. Mildronāta ievadīšanas ietekme uz sirds infarkta izmēru (A) un L-karnitīna koncentrāciju (B) Wistar žurku sirds audos. Rezultāti ir vidējais no 9-10 mērījumiem $\pm$ SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdenta t tests, $p < 0.05$).

Iepriekš veiktajos pētījumos tika noskaidrots, ka nozīmīgu enerģijas metabolisma izmaiņu izraisīšanai, L-karnitīna daudzums sirds audos jāsamazina vismaz par 60%. Kā redzams 2.11.B. 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%).

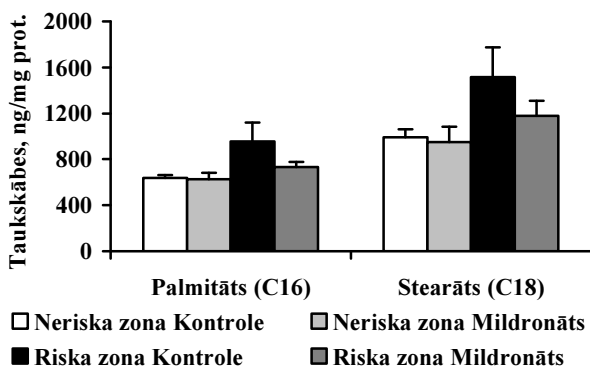
Taukskābju oksidācijas ātrums peroksisomās, kas izolētas no sirds audu neriska zonas, kontroles un mildronāta grupās bija vienāds. Turpretī sirds audu riska zonā peroksisomu funkcija un palmitāta oksidācijas ātrums išēmijas laikā bija samazināti, bet mildronāta ievadīšana saglabāja peroksisomālo taukskābju oksidācijas ātrumu (2.12.A. attēls). 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 (2.12.B attēls). Šie rezultāti liecina, ka samazinot L-karnitīna koncentrāciju, saglabājas peroksisomu un mitohondriju funkcionalitāte sirds išēmijas gadījumā.



2.12. att. Mildronāta ievadišanas 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 $\pm$ SEM.

*Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas. #Statistiski ticami atšķiras no attiecīgās išēmijas kontroles grupas (Stjudenta *t* tests vai Kruskal-Wallis tests, $p < 0,05$).

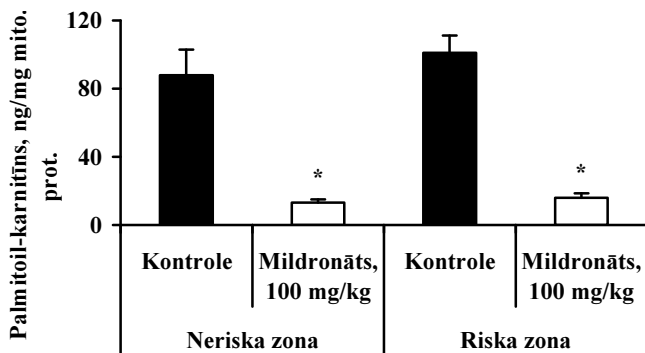
Tā kā iepriekš veiktajos pētījumos mildronāts samazināja garķēžu taukskābju oksidāciju mitohondrijos, sirds audos bija sagaidāms palielināts garķēžu taukskābju daudzums. Lai gan L-karnitīna koncentrācija bija samazināta, ne palmitīnskābes (C16), ne stearīnskābes (C18) daudzums sirds audu neriska zonā nebija palielināts (2.13. attēls). Riska zonā išēmijas laikā novēroja garķēžu taukskābju (C16 un C18) uzkrāšanos, un mildronāta ievadišana neietekmēja garķēžu taukskābju daudzumu sirds audos išēmijas laikā. Pēc 60 min ilgas reperfūzijas kontroles žurku sirdīs riska zonā garķēžu taukskābju daudzums joprojām bija palielināts (2.13. attēls).



2.13. att. Mildronāta ievadīšanas ietekme uz palmitāta (C16) un stearāta (C18) daudzumu neriska un riska zonā pēc 60 min reperfūzijas sirds audos.

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 4 dzīvniekos $\pm$ SEM.

Salīdzinot ar kontroles grupu, mildronāta ievadīšana samazināja garķēžu taukskābju daudzumu riska zonā un palmitoil-karnitīna daudzumu mitohondrijos gan sirds audu neriska, gan riska zonā (2.14. attēls), kas liecina par saglabātu mitohondriālo funkcionētspēju un atjaunotu taukskābju metabolismu reperfūzijas laikā.

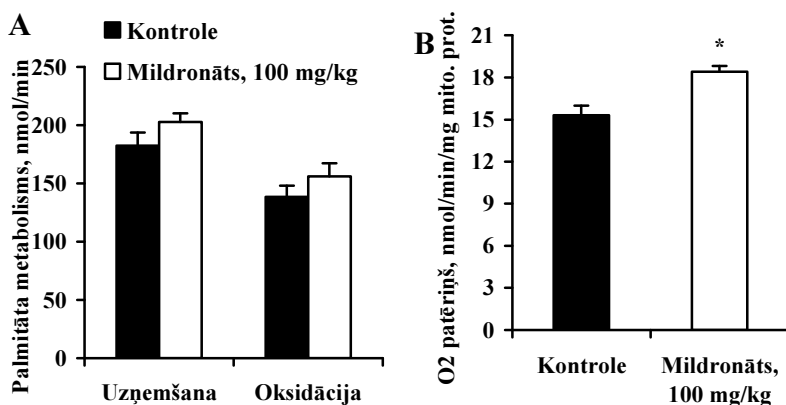


2.14. att. Mildronāta ievadīšanas ietekme uz palmitoil-karnitīna daudzumu mitohondrijos, kas izolēti no sirds audu neriska un riska zonas pēc 30 min išēmijas.

Rezultāti ir vidējais no mērījumiem 6-8 dzīvniekos $\pm$ SEM.

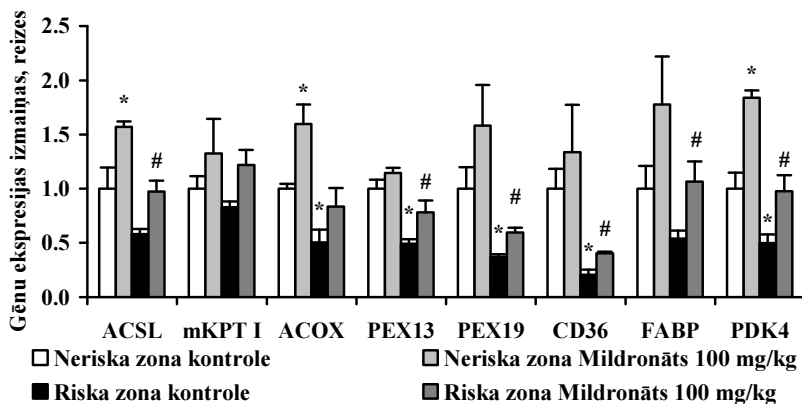
Nosakot garķēžu taukskābju uzņemšanu un oksidāciju izolētā sirdī, neskatoties uz L-karnitīna daudzuma samazinājumu 3 reizes, garķēžu taukskābju uzņemšana un oksidācija sirds audos normoksijā nebija izmainīta (2.15.A. attēls). Turklāt mildronāta ievadīšana sirds audos statistiski ticami

paaugstināja mitohondriju elpošanas ātrumu ar palmitoil-karnitīnu par 20% (2.15.B. attēls).



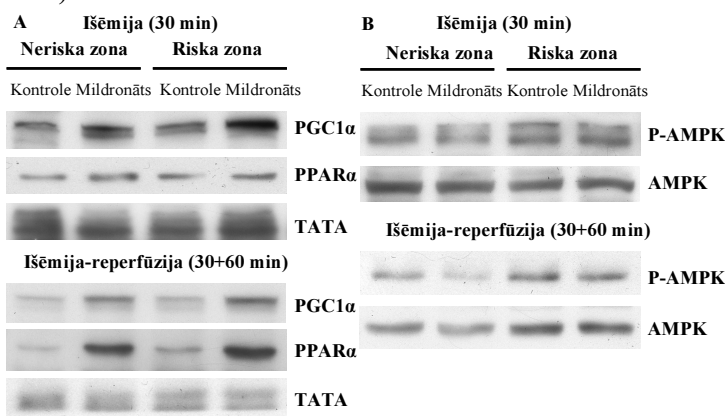
2.15. att. Mildronāta ievadīšanas ietekme uz iezīmēta palmitāta uzņemšanu un oksidāciju izolētā sirdī (A) un mitohondriālo elpošanu ar palmitolikarnitīnu (B). Rezultāti ir vidējais no 5-6 mērījumiem $\pm$ SEM. *Statistiski ticami atšķiras no kontroles grupas (Stjūdenta t tests, $p < 0,05$).

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. 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 (2.16. attēls).



2.16. att. Mildronāta ievadīšanas ietekme uz taukskābju un glikozes metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju sirds audu neriska un riska zonās pēc 60 min reperfūzijas. 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, $p < 0,05$).

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 (2.17.A. attēls).



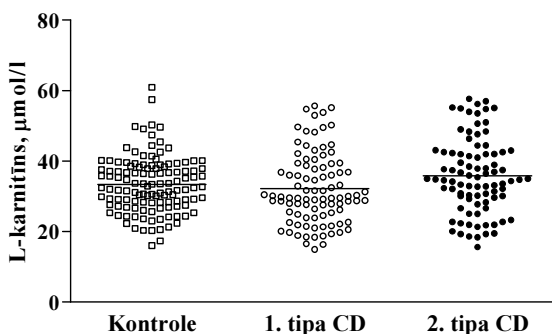
2.17. att. Mildronāta ievadīšanas ietekme uz PPAR α , PGC1 α (A) daudzumu sirds audu kodolos un P-AMPK daudzumu citosolā (B) neriska un riska zonās pēc 30 min išēmijas un sekojošas 60 min reperfūzijas.

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-APMK daudzums sirds audu citosolā bija palielināts 4 reizes (2.17.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.

2.5. 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 ietekmēt arī 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. Vidējais pētījuma dalībnieku vecums kontroles un cukura diabēta slimnieku grupā bija attiecīgi 42 un 47 gadi. 43% pētījuma dalībnieku bija vīrieši. Cukura diabēta pacientiem, salīdzinot ar kontroles grupu, bija statistiski ticami augstāka plazmas glikozes koncentrācija tukšā dūšā, kā arī paaugstināta asins HbA1c.

Brīvā L-karnitīna koncentrācija kontroles grupas dalībniekiem vidēji bija 33 ± 8 $\mu\text{mol/l}$ ($n=122$). L-karnitīna koncentrācija 1. un 2. tipa CD pacientu asins lizātos bija attiecīgi 32 ± 10 un 36 ± 11 $\mu\text{mol/l}$ ($n=93$ un 87), un tā statistiski ticami neatšķīrās no kontroles grupas (2.18. attēls). Zema L-karnitīna koncentrācija (zem 20 $\mu\text{mol/l}$) bija 9% CD pacientu.



2.18. att. Brīvā L-karnitīna koncentrācija kontroles grupas, 1. un 2. tipa cukura diabēta pacientu asins lizātos. Rezultāti ir attēloti kā vidējais no individuāliem mērījumiem.

Tā kā pētījumā tika iekļauti CD pacienti, kas ārstējās klīniskās slimnīcas “Gaiļezers” endokrinoloģijas nodaļā, CD vēlīno komplikāciju

sastopamības biežums bija salīdzinoši augsts - 88%. 159 no 180 pētījumā iesaistītajiem CD pacientiem bija attīstījusies kāda no slimības komplikācijām.

2.7. tabula

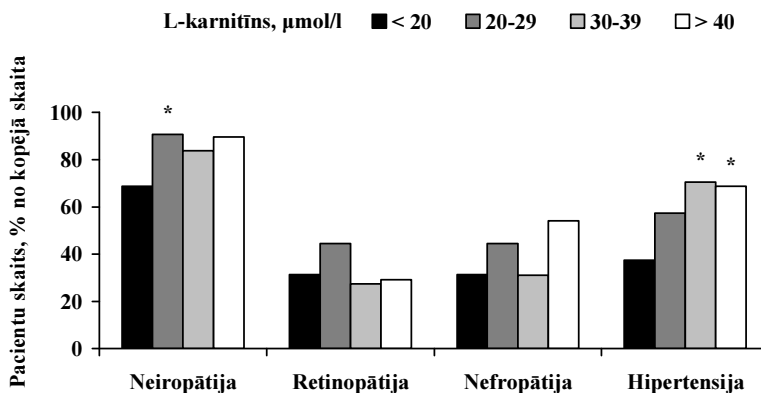
Vidējā L-karnitīna koncentrācija pacientiem ar vai bez komplikācijām

	L-karnitīns, $\mu\text{mol/l}$
Neiropātija	
Nav (n=25)	32 $\pm$ 11
Sāpīga (n=71)	35 $\pm$ 10
Nesāpīga (84)	34 $\pm$ 11
Retinopātija	
Nav (n=120)	34 $\pm$ 11
Neproliferatīva (n=40)	31 $\pm$ 9
Preproliferatīva (n=16)	36 $\pm$ 11
Proliferatīva ar makulas tūsķu (n=4)	42 $\pm$ 8
Nefropātija	
Nav (n=105)	32 $\pm$ 10
Mikroalbuminūrija (n=66)	36 $\pm$ 11
Makroalbuminūrija (n=8)	33 $\pm$ 8
Hipertensija	
Nav (n=66)	32 $\pm$ 11
Ir (n=113)	35 $\pm$ 10*

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

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 (2.7. 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 (2.7. tabula). Savukārt pacientiem ar hipertensiju L-karnitīna koncentrācija asinīs bija statistiski ticami lielāka, salīdzinot ar CD pacientiem bez hipertensijas (2.7. tabula).

Nosakot komplikāciju sastopamības biežumu, pacientiem ar zemu L-karnitīna koncentrāciju ($<20 \mu\text{mol/l}$) neiropātiju diagnosticēja 69% gadījumu, savukārt pacientiem ar augstāku L-karnitīna koncentrāciju neiropātija bija 88% pacientu (2.19. 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 (2.19. attēls).



2.19. 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 $\mu\text{mol/l}$. Rezultāti ir pacientu skaits procentos no kopējā pacientu skaita ar vēlīno komplikāciju. *Statistiski ticami atšķiras pacientu grupas ar zemu (<20 $\mu\text{mol/l}$) 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 (2.19. attēls). CD pacientiem ar zemu L-karnitīna koncentrāciju hipertensiju diagnosticēja 38% pacientu. Savukārt pacientiem ar L-karnitīna koncentrāciju virs 20 $\mu\text{mol/l}$ hipertensija bija sastopama 69% pacientu, un šis rādītājs statistiski ticami atšķīrās no pacientu grupas ar zemu L-karnitīna koncentrāciju (<20 $\mu\text{mol/l}$) (2.19. attēls).

3. 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 diabētiskās neiropātijas fenotipa attīstības prognozēšana, kā arī izpētīt enerģijas metabolisma regulācijas iespējas un molekulāros darbības mehānismus ogļhidrātu vielmaiņas patoloģiju gadījumā.

3.1. 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 neatšķiras, 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 neatšķiras 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 veseliem 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 HbA_{1C} koncentrācijas CD pacientiem nekorelēja ar glioksalāžu enzīmu aktivitātēm leukocītos, pētījuma autori secināja, ka glikozes koncentrācijas izmaiņas neietekmē Glo1 un Glo2 aktivitāti (Ratliff, 1996), kas ir saskaņā ar mūsu pētījuma rezultātiem, jo netika novērota izmaiņās Glo1 aktivitātes saistība ar glikozes, HbA_{1C} 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

pacienti 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 biokīmisko 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), 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 glutaciona 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 falfa* žurkām, jāsecina, ka paaugstināta lipīdu koncentrācija nav noteicošais faktors Glo1 aktivitātes regulācijā.

3.2. Glioksalāzes 1 aktivitātes saistība ar vēlmo 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.

Mūsu pētījumā noteicām gan NSS, gan NDS kā subjektīvus sāpju uztveres un objektīvus neiropātiskā deficīta mērtjumus, izmantojot iepriekš aprakstītas metodes (Doupis, 2009, McIntosh, 2003). Glo1 aktivitāte bija ievērojami samazināta pacientiem ar izteiktiem sāpīgas neiropātijas simptomiem gan 1., gan 2. tipa CD diabēta gadījumā, bet neatšķīrās dažādās NDS grupās. Iepriekšējos pētījumos pacientiem ar sāpīgu neiropātiju novērotas paaugstinātas CRP koncentrācijas, kas liecina, ka iekaisuma process un endotēlija disfunkcija ir saistīti ar perifēro sensibilizāciju, attīstoties sāpju sajūtai un diabētiskai neiropātijai (Doupis, 2009, Herder, 2009). Mūsu pētījuma rezultāti tomēr neapstiprina CRP saistību ar sāpīgas neiropātijas 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 neiropatiju bez sāpēm, gan sāpīgas diabētiskās neiropatijas 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 izpaužoties dažādās CD pacientu grupās.

Tā kā CD pacientu grupām ar sāpīgu un nesāpīgu perifēro neiropatiju bija atšķirīgs vecums un CD stāžs, tika veikta multivariantā regresijas analīze, lai novērtētu neatkarīgu Glo1 aktivitātes izmaiņu saistību ar sāpīgas perifērās neiropatijas attīstību. Multivariantā analīze liecina, ka, Glo1 aktivitātei palielinoties par 1 vienību, sāpīgas neiropatijas 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 neiropatijas 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 neiropatijas neļāva veikt atbilstošu Glo1 aktivitātes salīdzinājumu ar CD pacientiem, kam bija diagnosticēta neiropatija. 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 neiropatiju 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 neiropatijas fenotipā 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 vēlino komplikāciju attīstības pētījumiem CD vēlīnās stadijās.

Nesen noskaidrots, ka 2. tipa CD ir viens no izziņas funkcijas traucējumu attīstības riska faktoriem (Reijmer, 2010). Mūsu pētījumā *Zucker fa/fa* un *Goto-Kakizaki* žurkām eksperimenta beigās tika novēroti darbības atmiņas traucējumi. Izziņas 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 (de la Monte, 2010, Vijayakumar, 2012). Mūsu pētījuma rezultāti liecina par samazinātu Glo1 aktivitāti hiperglikēmijas, traucētas endotēlija-atkarīgās asinsvadu relaksācijas un smadzeņu izziņas darbības apstākļos, vēl pirms nosakāmām sāpju sajūtas izmaiņām. Papildus tam tomēr jāsecina, ka asins Glo1 un Glo2 aktivitātes nav izmantojamas kā agrīni marķieri CD vēlino komplikāciju attīstības raksturošanai eksperimentālajos 2. tipa CD un metabolā sindroma modeļos.

3.3. Enerģijas metabolisma regulācija eksperimentālajos ogļhidrātu 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, 2008, 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. 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. Tā kā zāļu ievadīšana neietekmēja uzņemtās barības daudzumu, domājams, ka mildronāta un metformīna kombinācijas ievadīšana varētu ietekmēt glikozes absorbciju pēc barības uzņemšanas. Svara 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.

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 faktoros, 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). 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 mērķģēnu 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 ģēnu ekspresiju. Palielināta taukskābju metabolisma ģēnu ekspresija tādējādi kompensē samazināto L-karnitīna daudzumu un saglabā kopējo taukskābju oksidācijas ātrumu sirdī. Turpretī aknās zāļu ievadīšana neietekmē PPAR α un tā mērķģēnu ekspresiju. Lai gan mildronāta un metformīna ievadīšana Zucker fa/fa žurkām atjaunoja samazināto PPAR γ daudzumu, PPAR γ mērķģēnu ekspresija aknu audos nebija izmainīta. Kopumā var secināt, ka mildronāta izraisītās ģēnu 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. 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. 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.

3.4. Mildronāta molekulārie darbības mehānismi

Nesen veiktā pētījumā pierādīts, ka mildronāta izraisītais L-karnitīna samazinājums sirds audos ir pamatā mehānismiem, kas nodrošina mildronāta kardioprotektīvo efektu išēmijas apstākļos (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 ģēnu 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 mērķģēnu

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.

PPAR aktivējas, piesaistoties ligandiem un transkripcijas koaktivatoriem (Duncan, 2011). PGC1 α ir visvairāk pētītais PPAR koaktivators. PGC1 α un PPAR α signālcēļu mijiedarbībai sirds audos ir nozīmīga loma taukskābju metabolismā iesaistīto proteīnu 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 signālcēļu 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 signālcēļu 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 signālcēļu aktivācija sirds audos visticamāk nav saistīta ar AMPK aktivēšanu.

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.

3.5. L-karnitīna koncentrācijas saistība ar cukura diabēta vēlīno komplikāciju attīstības pakāpi CD pacientos

Fizioloģiskos apstākļos L-karnitīns piedalās garķēžu taukskābju transportā mitohondrijos. Turklāt parādīts, ka lietojot L-karnitīnu kā farmakoloģisku līdzekli, tas, palielinot PDH aktivitāti un glikozes metabolismā iesaistīto enzīmu ekspresiju, stimulē glikolīzi (Foster, 2004, Stephens, 2007). 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 novērs CD vēlīno 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 neatšķīrās no kontroles grupas L-karnitīna koncentrācijām. Iegūtie rezultāti apliecina, ka augstākas L-karnitīna koncentrācijas nav saistītas ar zemāku CD vēlīno komplikāciju sastopamības biežumu vai smaguma pakāpi, tādēļ var secināt, ka papildus L-karnitīna lietošana CD gadījumā un CD vēlīno 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), 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. Pacientiem 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 (Huot, 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.

Kopumā iegūtie rezultāti apliecina, ka zema L-karnitīna koncentrācija CD pacientiem nav saistīta ar paaugstinātu CD vēlīno komplikāciju (perifērās

neiropātijas, nefropātijas, retinopātijas un hipertensijas) sastopamības biežumu vai smaguma pakāpi. Pacienti ar augstāku L-karnitīna koncentrāciju asinīs CD vēlīno komplikāciju sastopamības biežums nav samazināts. Pētījuma rezultāti apliecina, ka samazinot L-karnitīna koncentrāciju CD gadījumā iespējams aizkavēt CD vēlīno komplikāciju attīstību.

4. SECINĀJUMI

1. Zemāka Glol aktivitāte saistīta ar sāpīgas perifērās diabētiskās neiropātijas attīstību 1. un 2. tipa CD pacientiem. Pētījumā iegūtie rezultāti apliecina izmainītas Glol nozīmi sāpīgas diabētiskās neiropātijas attīstībā.
2. Asins lizātu Glol aktivitāte nav izmainīta, attīstoties agrīniem vaskulāriem bojājumiem, tomēr Glol 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.

5. DARBA APROBĀCIJA – PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

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.

Sagatavoti un iesniegti manuskripti starptautiski citētos zinātniskos izdevumos:

1. **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, iesniegts izskatīšanai žurnālā.
2. 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 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. Tirzīte D, Konrāde I, Segliņa D, **Škapare E**, Dambrova M, Āboli, florizīns un cukura diabēts, Latvijas ārsti, **2011**(10), 59-61.

3. 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.
4. 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.

Konferenču tēzes par pētījuma tēmu

1. Svalbe B, **Škapare E.**, Vavers E., Zvejniece L., Dambrova M. Investigation of cognitive function and pain perception in animal models of obesity and type 2 diabetes mellitus, *The International Nutrition and Brain Summer School*, Bordeaux, France, September 3-14, **2012**. Abstract Nr.21.
2. **Škapare 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.
3. Svalbe B, **Škapare 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.
4. Kuka J, **Škapare 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
5. **Škapare E.**, Liepinsh E, Kuka J, Cirule H, Dambrova M, Crosstalk between PPARs and NF-κB, *International Conference in Pharmacology*, Riga, Latvia, April 20-21, **2012**, Abstract book, P.56.
6. 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.
7. Konrade I, **Škapare 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**.
8. **Škapare 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.
9. **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

10. 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**.
11. **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.
12. 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.
13. 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.
14. Makrecka M, **Skapare 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. **Skapare E**, Molecular mechanisms of carbohydrate metabolism-related disorders: investigations in experimental models and clinical samples, 17th Young Scientists Training Course, Heidelberg, Vācija, **2010**.
2. **Skapare 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. **Skapare E**, Konrāde I, Liepiņš E, Medne R, Dambrova M, Glioksalāžu enzīmu loma cukura diabēta vēlmo 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.

6. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Liepinsh E, Vilskersts R, Zvejniece L et al. Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Br J Pharmacol*, 2009a;157:1549-1556.
2. Skapare E, Konrade I, Liepinsh E et al. Glyoxalase 1 and glyoxalase 2 activities in blood and neuronal tissue samples from experimental animal models of obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Physiol Sci*, 2012.
3. Yamada K, Tanaka T, Zou LB et al. Long-term deprivation of oestrogens by ovariectomy potentiates beta-amyloid-induced working memory deficits in rats. *Br J Pharmacol*, 1999;128:419-427.
4. Bartus S, Sorysz D, Siudak Z et al. Spontaneous closure of aorta-to-right atrium fistula after septal occluder implantation. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2008;9:744-746.
5. Liepinsh E, Vilskersts R, Loca D et al. Mildronate, an inhibitor of carnitine biosynthesis, induces an increase in gamma-butyrobetaine contents and cardioprotection in isolated rat heart infarction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006;48:314-319.
6. Lopaschuk GD, Barr RL Measurements of fatty acid and carbohydrate metabolism in the isolated working rat heart. *Mol Cell Biochem*, 1997;172:137-147.
7. Kuka J, Vilskersts R, Cirule H et al. The cardioprotective effect of mildronate is diminished after co-treatment with L-carnitine. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012;17:215-222.
8. Liepinsh E, Skapare E, Svalbe B et al. Anti-diabetic effects of mildronate alone or in combination with metformin in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol*, 2011;658:277-283.
9. 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.
10. Thornalley PJ Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochem J*, 1988;254:751-755.
11. Thornalley PJ, Hooper NI, Jennings PE et al. The human red blood cell glyoxalase system in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 1989;7:115-120.
12. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J et al. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond)*, 1994;87:21-29.
13. Thornalley PJ Advances in glyoxalase research. Glyoxalase expression in malignancy, anti-proliferative effects of methylglyoxal, glyoxalase I inhibitor diesters and S-D-lactoylglutathione, and

- methylglyoxal-modified protein binding and endocytosis by the advanced glycation endproduct receptor. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995;20:99-128.
14. Ratliff DM, Vander Jagt DJ, Eaton RP et al. 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.
 15. Sharma-Luthra R, Kale RK Age related changes in the activity of the glyoxalase system. *Mech Ageing Dev*, 1994;73:39-45.
 16. Nagaraj RH, Sarkar P, Mally A et al. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch Biochem Biophys*, 2002;402:110-119.
 17. Brouwers O, Niessen PM, Ferreira I et al. 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.
 18. Atkins TW, Thornally PJ Erythrocyte glyoxalase activity in genetically obese (ob/ob) and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res*, 1989;11:125-129.
 19. Rabbani N, Thornalley PJ Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 2011;22:309-317.
 20. Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J*, 2003;375:581-592.
 21. Jack MM, Ryals JM, Wright DE Characterisation of glyoxalase I in a streptozotocin-induced mouse model of diabetes with painful and insensate neuropathy. *Diabetologia*, 2011;54:2174-2182.
 22. Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S et al. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nat Med*, 2012;18:926-933.
 23. Doupis J, Lyons TE, Wu S et al. Microvascular reactivity and inflammatory cytokines in painful and painless peripheral diabetic neuropathy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009;94:2157-2163.
 24. McIntosh A, Peters J, Young R et al. 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.
 25. Herder C, Lankisch M, Ziegler D et al. Subclinical inflammation and diabetic polyneuropathy: MONICA/KORA Survey F3 (Augsburg, Germany). *Diabetes Care*, 2009;32:680-682.

26. Jenkins AJ, Rothen M, Klein RL et al. 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.
27. Arnalich F, Hernanz A, Lopez-Maderuelo D et al. Enhanced acute-phase response and oxidative stress in older adults with type II diabetes. *Horm Metab Res*, 2000;32:407-412.
28. Oltman CL, Coppey LJ, Gellett JS et al. 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.
29. Oltman CL, Davidson EP, Coppey LJ et al. Attenuation of vascular/neural dysfunction in Zucker rats treated with enalapril or rosuvastatin. *Obesity (Silver Spring)*, 2008;16:82-89.
30. Serpillon S, Floyd BC, Gupte RS et al. 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.
31. Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE et al. The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats. *Diabetes*, 1999;48:1448-1453.
32. Cheng AY, Fantus IG Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*, 2005;172:213-226.
33. Gupte S, Labinskyy N, Gupte R et al. 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.
34. Brouwers O, Niessen PM, Haenen G et al. 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.
35. Reijmer YD, van den Berg E, Ruis C et al. Cognitive dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2010;26:507-519.
36. de la Monte SM, Tong M, Nguyen V et al. Ceramide-mediated insulin resistance and impairment of cognitive-motor functions. *J Alzheimers Dis*, 2010;21:967-984.
37. Vijayakumar, T, Sirisha, G, Farzana Begam, M et al. Mechanism linking cognitive impairment and diabetes mellitus. *Eur J Appl Sci*, 2012;4:1-5.
38. Shulman GI Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, 2000;106:171-176.

39. Larsen TS, Aasum E Metabolic (in)flexibility of the diabetic heart. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2008;22:91-95.
40. Koves TR, Ussher JR, Noland RC et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab*, 2008;7:45-56.
41. Wang W, Lopaschuk GD Metabolic therapy for the treatment of ischemic heart disease: reality and expectations. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007;5:1123-1134.
42. Asaka N, Muranaka Y, Kirimoto T et al. 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.
43. Kirimoto T, Nobori K, Asaka N et al. Beneficial effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on energy metabolism in ischemic dog hearts. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1996;331:163-178.
44. Spaniol M, Kaufmann P, Beier K et al. Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *J Lipid Res*, 2003;44:144-153.
45. Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV et al. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 1988;37:195-202.
46. Bailey CJ, Turner RC Metformin. *N Engl J Med*, 1996;334:574-579.
47. Wiernsperger NF Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab*, 1999;25:110-127.
48. Liepinsh E, Vilskersts R, Skapare E et al. Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*, 2008;83:613-619.
49. Sokolovska J, Isajevs S, Sugoka O et al. Correction of glycaemia and GLUT1 level by mildronate in rat streptozotocin diabetes mellitus model. *Cell Biochem Funct*, 2011a;29:55-63.
50. Sokolovska J, Rumaks J, Karajeva N et al. The influence of mildronate on peripheral neuropathy and some characteristics of glucose and lipid metabolism in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus model. *Biomed Khim*, 2011b;57:490-500.
51. Hayashi Y, Tajima K, Kirimoto T et al. 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.
52. Liepinsh E, Kuka J, Svalbe B et al. Effects of long-term mildronate treatment on cardiac and liver functions in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009b;105:387-394.

53. Yasuda N, Inoue T, Nagakura T et al. 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.
54. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 1998;352:837-853.
55. 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.
56. Grimaldi PA Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci*, 2007;64:2459-2464.
57. Sugden MC, Zariwala MG, Holness MJ PPARs and the orchestration of metabolic fuel selection. *Pharmacol Res*, 2009;60:141-150.
58. Degrace P, Demizieux L, Du ZY et al. Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem*, 2007;282:20816-20826.
59. Satapati S, He T, Inagaki T et al. Partial resistance to peroxisome proliferator-activated receptor- α agonists in ZDF rats is associated with defective hepatic mitochondrial metabolism. *Diabetes*, 2008;57:2012-2021.
60. Luiken JJ, Niessen HE, Coort SL et al. 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.
61. Degrace P, Demizieux L, Gresti J et al. Fatty acid oxidation and related gene expression in heart depleted of carnitine by mildronate treatment in the rat. *Mol Cell Biochem*, 2004;258:171-182.
62. Doenst T, Richwine RT, Bray MS et al. Insulin improves functional and metabolic recovery of reperfused working rat heart. *Ann Thorac Surg*, 1999;67:1682-1688.
63. Ussher JR, Wang W, Gandhi M et al. Stimulation of glucose oxidation protects against acute myocardial infarction and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 2012.
64. 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.
65. Duncan JG Peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR α) and PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α) regulation of cardiac metabolism in diabetes. *Pediatr Cardiol*, 2011;32:323-328.

66. Beauloye C, Bertrand L, Horman S et al. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res*, 2011;90:224-233.
67. Kim M, Tian R Targeting AMPK for cardiac protection: opportunities and challenges. *J Mol Cell Cardiol*, 2011;51:548-553.
68. Foster DW The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004;1033:1-16.
69. 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.
70. Okuda Y, Kawai K, Murayama Y et al. Postprandial changes in plasma ketone body and carnitine levels in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Endocrinol Jpn*, 1987;34:415-422.
71. Poorabbas A, Fallah F, Bagdadchi J et al. Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. *Eur J Clin Nutr*, 2007;61:892-895.
72. Pregant P, Schernthaner G, Legenstein E et al. [Decreased plasma carnitine in Type I diabetes mellitus]. *Klin Wochenschr*, 1991;69:511-516.
73. Pregant P, Kaiser E, Schernthaner G No effect of insulin treatment or glycemic improvement on plasma carnitine levels in type 2 diabetic patients. *Clin Investig*, 1993;71:610-612.
74. Capaldo B, Napoli R, Di BP et al. Carnitine improves peripheral glucose disposal in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 1991;14:191-195.
75. Mingrone G Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 2004;1033:99-107.
76. Statsenko ME, Poletaeva LV, Turkina SV et al. Mildronate effects on oxidant stress in type 2 diabetic patients with diabetic peripheral (sensomotor) neuropathy. *Ter Arkh*, 2008;80:27-30.
77. Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2006;142C:77-85.
78. Demarquoy J, Georges B, Rigault C et al. Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries. *Food Chemistry*, 2004;86:137-142.
79. American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes-2011. *Diabetes Care*, 2011;34:11-61.
80. Hodge AM, English DR, Itsiopoulos C et al. 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.

81. 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.
82. Craig WJ Nutrition concerns and health effects of vegetarian diets. *Nutr Clin Pract*, 2010;25:613-620.
83. 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.
84. Bain MA, Milne RW, Evans AM Disposition and metabolite kinetics of oral L-carnitine in humans. *J Clin Pharmacol*, 2006;46:1163-1170.
85. Rebouche CJ Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2004;1033:30-41.
86. Vernez L, Dickenmann M, Steiger J et al. Effect of L-carnitine on the kinetics of carnitine, acylcarnitines and butyrobetaine in long-term haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 2006;21:450-458.
87. Verrina E, Caruso U, Calevo MG et al. Effect of carnitine supplementation on lipid profile and anemia in children on chronic dialysis. *Pediatr Nephrol*, 2007;22:727-733.
88. Hurot JM, Cucherat M, Haugh M et al. Effects of L-carnitine supplementation in maintenance hemodialysis patients: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*, 2002;13:708-714.
89. Delanghe J, De Slypere JP, De BM et al. Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. *Clin Chem*, 1989;35:1802-1803.
90. Barnard ND, Gloede L, Cohen J et al. 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.
91. Kahleova H, Matoulek M, Malinska H et al. 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.