

Kristīne Voļska

METIL-GBB AIZSARGĀJOŠO EFEKTU
UN DARBĪBAS MEHĀNISMU IZPĒTE
DIABĒTA UN TĀ KOMPLIKĀCIJU
EKSPERIMENTĀLAJOS MODEĻOS

Promocijas darba kopsavilkums
farmācijas doktora zinātniskā grāda iegūšanai

Specialitāte – farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2019

Promocijas darbs izstrādāts: Latvijas Organiskās sintēzes institūta
Farmaceitiskās farmakoloģijas laboratorijā

Darba zinātniskā vadītāja:

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

Oficiālie recenzenti:

Dr. biol. asociētais profesors **Andrejs Šķesters**,
Bioķīmijas zinātniskā laboratorija, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija
Dr. habil. biol. profesore **Ruta Muceniece**, Latvijas Universitāte
PhD Aistē Jekabsone, Farmaceutisko Tehnoloģiju institūts,
Lietuvas Veselības zinātņu universitāte

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2019. gada 26. augustā 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 tīmekļa vietnē:
www.rsu.lv.

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. pharm. asociētā profesore **Baiba Mauriņa**

SATURS

Ievads	6
Darba mērķis.....	7
Darba uzdevumi.....	7
Darba hipotēze	8
Darba zinātniskā novitāte	8
1. Materiāli un metodes	10
1.1. Dzīvnieki un terapija.....	10
1.2. Metodes.....	12
1.2.1. <i>In vitro</i> metodes	12
1.2.1.1. <i>Western blot</i> analīze	12
1.2.1.2. Acilkarnitīnu noteikšana plazmā un audos.....	12
1.2.1.3. Metil-GBB noteikšana plazmā.....	12
1.2.1.4. Bioķīmisko parametru noteikšana plazmā un asinīs	13
1.2.1.5. Sirds mitohondriju izolēšana.....	13
1.2.1.6. Palmitoilkarnitīna uzkrāšanās noteikšana mitohondriju frakcijās.....	13
1.2.1.7. Mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumi	14
1.2.1.8. Aterosklerotisko bojājumu kvantitatīva noteikšana aortas sinusā.....	14
1.2.1.9. Makrofāgu un monocītu infiltrācijas kvantitatīva noteikšana aterosklerotiskajos bojājumos	15
1.2.1.10. Aterosklerotisko bojājumu kvantitatīva noteikšana aortā	15
1.2.2. <i>Ex vivo</i> un <i>in vivo</i> metodes.....	15
1.2.2.1. Glikozes un insulīna tolerances testi	15
1.2.2.2. Glikozes uzņemšanas mērījumi <i>in vivo</i>	16
1.2.2.3. Izolētais sirds infarkta pētījums	16
1.3. Datu apstrādes statistiskās metodes	16
2. Rezultāti	17
2.1. Palmitoilkarnitīna akūtas un ilgstošas lietošanas ietekme uz enerģijas metabolismu pelēs	17
2.1.1. Akūtas palmitoilkarnitīna ievadīšanas ietekme uz glikozes metabolismu.....	17
2.1.2. Palmitoilkarnitīna darbības mehānismi.....	22
2.1.3. Palmitoilkarnitīna ilgstošas ievadīšanas efekti.....	23
2.2. Metil-GBB terapijas un fiziskās aktivitātes iedarbība uz insulīna jutību eksperimentālos diabēta un insulīna rezistences modeļos	24
2.2.1. Acilkarnitīnu daudzums <i>db/db</i> peļu plazmā un muskuļos.....	24
2.2.2. Metil-GBB un fiziskās aktivitātes ietekme uz glikozes un insulīna toleranci	26

2.2.3. Metil-GBB un fiziskās aktivitātes ietekme uz glikozes un insulīna koncentrāciju.....	27
2.3. Garķēžu acilkarnitīnu loma išēmijas-reperfūzijas izraisīta bojājuma attīstībā sirds mitohondrijos	29
2.3.1. Acilkarnitīnu daudzums sirds audos un mitohondrijos.....	29
2.3.2. Palmitoilkarnitīna izraisītais mitohondriju bojājums.....	31
2.3.3. Acilkarnitīnu daudzuma palielināšanās un samazināšanās ietekme uz miokarda infarktu	33
2.4. Metil-GBB terapijas ietekme uz aterosklerozes attīstību	35
2.4.1. Metil-GBB ietekme uz acilkarnitīnu profilu.....	35
2.4.2. Metil-GBB lietošanas ietekme uz plazmas bioķīmisko profilu	36
2.4.3. Metil-GBB lietošanas ietekme uz TNF α koncentrāciju plazmā ...	37
2.4.4. Metil-GBB ietekme uz aterosklerotisko bojājumu attīstību visā aortā un aortas sīnūsā.....	37
2.4.5. Metil-GBB ietekme uz makrofāgu un monocītu daudzumu aterosklerotiskajos bojājumos.....	38
3. Diskusija	39
3.1. Garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās nozīme insulīna rezistences attīstībā	39
3.2. Garķēžu acilkarnitīnu daudzuma samazināšana kā efektīva farmakoloģiska stratēģija diabēta attīstības kavēšanai	42
3.3. Garķēžu acilkarnitīnu loma diabēta kardiovaskulāro komplikāciju attīstībā	44
3.4. Metil-GBB terapija kavē aterosklerozes attīstību, samazinot garķēžu acilkarnitīnu līmeni	47
4. Secinājumi	50
Darba aprobācija – publikācijas un tēzes	51
Literatūras saraksts	55

SAĪSINĀJUMI

[³H]-DOG – 2-[1,2-³H]-deoksi-D-glikoze

ABL – augsta blīvuma lipoproteīns

ADF – adenoziņa difosfāts

ALAT – alanīnaminotransferāze

AMF – adenoziņa monofosfāts

ASAT – aspartātaminotransferāze

ATF – adenoziņa trifosfāts

GB – guanabenzs

GBB – γ-butyrobetaīns

IC₅₀ – inhibitora koncentrācija, kas samazina enzīma vai transportproteīna aktivitāti par 50%

KPT1 – karnitīna palmitoiltransferāze 1

LEAK stāvoklis – mitohondriju skābekļa patēriņš kavētas adenīna nukleotīda translokāzes apstākļos

Metil-GBB – 4-[dietil(metil)amonija]butanoāts

Omy A – oligomicīns A

OXPPOS – oksidatīvā fosforilācija

OXPPOS stāvoklis – ADF-stimulētā mitohondriālā elpošana

P-Akt – fosforilēta proteīnkināze B

PK – palmitoilkarnitīns

TNFα – audzēja nekrozes faktors alfa

UPLC MS/MS – augstas izšķirtspējas šķīduma hromatogrāfija ar sekojošu tandēmmasspektrometriju

ZBL – zema blīvuma lipoproteīns

IEVADS

Cukura diabēta izplatība pasaulē nepārtraukti palielinās, pēdējo trīs gadu desmitu laikā pieaugot no 4,7% līdz 8,5% pieaugušo populācijā (*NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC)*, 2016). 2. tipa cukura diabēta patofizioloģijas pamatā ir nepietiekami efektīva insulīna darbība (*Kerner et al.*, 2014). Cukura diabēts ir iemesls daudzām kardiovaskulārām komplikācijām, piemēram, aterosklerozei un išēmiskai sirds slimībai (*Defronzo*, 2009; *Emerging Risk Factors Collaboration et al.*, 2010). Pašreizējā diabēta ārstēšana galvenokārt balstās uz hiperglikēmijas mazināšanu, tomēr šīm terapijām mēdz būt ierobežota efektivitāte un būtiskas blakusparādības (*Moller*, 2001). Tādēļ ir nepieciešams meklēt jaunus farmakoloģiskos mērķus un ārstēšanas stratēģijas, lai uzlabotu diabēta pacientu klīnisko iznākumu.

Pētījumi ir parādījuši, ka insulīna rezistenci un glikozes metabolisma traucējumus izraisa pārmērīga taukskābju metabolā plūsma, kas veicina nepilnīgu taukskābju oksidēšanos un dažādu lipīdu metabolītu uzkrāšanos (*Martins et al.*, 2012; *Schooneman et al.*, 2013; *van de Weijer et al.*, 2013). Starp citiem metabolītiem, kas saistīti ar insulīna rezistences attīstību, nozīmīga loma ir garķēžu acilkarnitīniem (*McCoin et al.*, 2015; *Schooneman et al.*, 2013). Acilkarnitīni veidojas no aktivētām taukskābēm un L-karnitīna un nodrošina garķēžu taukskābju transportu mitohondrijos turpmākai β -oksidācijai. Ir novērots, ka pacientiem ar insulīna rezistenci vai cukura diabētu ir nedaudz palielinātas garķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas plazmā un muskuļu audos (*Adams et al.*, 2009; *Mihalik et al.*, 2010). Arī eksperimentālos aterosklerozes modeļos novērota garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās (*Gillies un Bell*, 1976). Vairākos iepriekšējos pētījumos ir konstatēta taukskābju metabolītu uzkrāšanās sirds išēmijas-reperfūzijas gadījumos (*Corr et al.*, 1984; *Ford et al.*, 1996; *Idell-Wenger et al.*, 1978; *Whitmer et al.*, 1978). Iepriekšējā

pētījumā mēs parādījām, ka samazinot garķēžu acilkarnitīnu līmeni, sirds tiek pasargāta no išēmijas-reperfūzijas bojājuma (*Liepinsh et al.*, 2015). No šiem rezultātiem secinājām, ka acilkarnitīnu līmeņa farmakoloģisks samazinājums varētu būt noderīgs pacientiem ar diabētu un tā kardiovaskulārajām komplikācijām. Tā kā garķēžu acilkarnitīni veidojas no garķēžu taukskābēm un L-karnitīna, tad efektīvs veids, kā kavēt insulīna rezistences un ar diabētu saistīto kardiovaskulāro slimību attīstību, ir L-karnitīna un tā metabolītu daudzuma samazināšana. Nesen tika sintezēta un raksturota virkne savienojumu, kas inhibē L-karnitīna biosintēzi un transportēšanu (*Liepinsh et al.*, 2014a; *Tars et al.*, 2014). Labākais kardioprotektīvais efekts žurkām eksperimentālā sirds infarkta modelī tika novērots pēc terapijas ar 4-[etil(dimetil)amonio]butanoātu (metil-GBB), γ -butyrobetaīna (GBB) metil-atvasinājumu, kas efektīvi inhibē GBB dioksigenāzi (IC_{50} 2,8 μ M) un organisko katjonu transportproteīnu 2 (IC_{50} 3,0 μ M) (*Liepinsh et al.*, 2015). Līdz šim nebija noskaidrots, vai terapija ar metil-GBB kavē insulīna rezistences attīstību un būtu pielietojama diabēta ārstēšanai.

Ir nepieciešami papildus pētījumi, lai noskaidrotu acilkarnitīnu uzkrāšanās lomu insulīna rezistences, diabēta un tā kardiovaskulāro komplikāciju attīstībā, kā arī lai pārbaudītu, vai ārstēšana ar metil-GBB ir efektīva terapija diabēta un tā komplikāciju ārstēšanai.

Darba mērķis

Pētīt jaunas acilkarnitīnu līmeni pazeminošas vielas metil-GBB farmakoloģiskos darbības mehānismus eksperimentālos cukura diabēta, sirds išēmijas-reperfūzijas un aterosklerozes modeļos.

Darba uzdevumi

1. Pētīt garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās molekulāros mehānismus insulīna rezistences attīstībā.
2. Pētīt, vai garķēžu acilkarnitīnu līmeņa samazināšana, izmantojot metil-GBB terapiju atsevišķi vai kopā ar fizisko aktivitāti, aizkavē diabēta attīstību eksperimentālos insulīna rezistences modeļos.
3. Pētīt garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās ietekmi uz mitohondriālajiem signālceļiem išēmijas-reperfūzijas modelī.
4. Pētīt metil-GBB terapijas izraisīta garķēžu acilkarnitīnu līmeņa samazinājuma ietekmi uz aterosklerozes attīstību.

Darba hipotēze

Farmakoloģiski samazinot garķēžu acilkarnitīnu daudzumu, metil-GBB veicina glikozes metabolismu, uzlabo insulīna jutību, pasargā sirds mitohondrijus no išēmijas-reperfūzijas bojājuma, kavē aterosklerozes attīstību un varētu būt izmantojams diabēta un tā izraisīto komplikāciju ārstēšanā.

Darba zinātniskā novitāte

Pētījuma ietvaros tika izvērtēta garķēžu acilkarnitīnu loma enerģijas metabolisma regulēšanā un pētīta metil-GBB terapijas aizsargājošā ietekme diabēta un tā kardiovaskulāro komplikāciju eksperimentālajos modeļos:

1. Garķēžu acilkarnitīni glikozes klātbūtnē pastiprina insulīna izdalīšanos, lai stimulētu pāreju no tukšas dūšas uz ēdušu stāvokli. Garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās ēdusā stāvoklī ierobežo metabolisma elastību un veicina hiperglikēmijas un hiperinsulinēmijas attīstību.
2. Pirmo reizi ir aprakstīts metil-GBB terapijas aizsargājošais efekts diabēta eksperimentālajos modeļos. Metil-GBB ievadīšanas izraisīta acilkarnitīnu

daudzuma samazināšanās uzlabo insulīna jutību un ievērojami samazina glikozes un insulīna līmeni asinīs pelēm ar insulīna rezistenci un diabētu.

3. Garķēžu acilkarnitīni ir nozīmīgākie taukskābju metabolīti, kas izraisa išēmijas-reperfūzijas bojājumu. Acilkarnitīnu uzkrāšanās išēmijas laikā kavē oksidatīvo fosforilāciju, tādējādi izraisa mitohondriju membrānas hiperpolarizāciju un stimulē reaktīvo skābekļa savienojumu veidošanos sirds mitohondrijos.
4. Pirmo reizi parādīta metil-GBB terapijas aterosklerozes attīstību kavējošā iedarbība *apoE^{-/-}* pelēm. Metil-GBB terapijas pretaterosklerozes mehānisms ir saistīts ar garķēžu acilkarnitīnu daudzuma samazinājumu vaskulārajos audos, kā arī makrofāgu un monocītu infiltrācijas kavēšanu aterosklerotiskajās pangās.

1. MATERIĀLI UN METODEDES

1.1. Dzīvnieki un terapija

CD-1 līnijas peļu tēviņi (8–12 nedēļas veci, *Envigo Netherlands* (iepriekš *Harlan Laboratories BV*), Nīderlande), *C57BL/6* peles (8–12 nedēļu vecumā, *Envigo Netherlands*), *db/db* peles (10 nedēļu vecumā, *Envigo Netherlands*), bez diabēta *db/Lean* peļu tēviņi (*Envigo Netherlands*), *Wistar* līnijas žurkas (10–16 nedēļas, Eksperimentālo dzīvnieku laboratorija, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija), *apoE^{-/-}* peļu māģītes (7 nedēļu vecumā, *Taconic*, Dānija) tika izmantotas eksperimentos. Dzīvnieki tika turēti standarta apstākļos (21–23 °C, 12 h gaismas-tumsas cikls) ar neierobežotu piekļuvi pārtikai (*R70* barība, *Lantmännen Lantbruk*, Zviedrija) un ūdenim. Divas nedēļas pirms eksperimentu sākuma visi dzīvnieki tika pielāgoti vietējiem apstākļiem. Visas eksperimentālās procedūras ar laboratorijas dzīvniekiem tika veiktas saskaņā ar Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU, kā arī tās tika saskaņotas ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi. Ziņošana par *in vivo* eksperimentiem un rezultātiem tika veikta pēc *ARRIVE* vadlīnijām (*Kilkenny et al.*, 2010; *McGrath et al.*, 2010).

Lai izpētītu garķežu acilkarnitīnu ietekmi uz glikozes homeostāzi, *CD-1* pelēm tika intraperitoneāli ievadīts palmitoilkarnitīns devā 50 mg/kg. Lai nodrošinātu palmitoilkarnitīna nepārtrauktu devu, pelēm subkutāni tika implantēti osmotiski minisūkņi (*ALZET®*, *ASV*), kas uzpildīti ar palmitoilkarnitīnu (10 mg/kg dienā vai 50 mg/kg dienā) uz 24 stundām (akūtas iedarbības pētījums) vai 28 dienām (ilgtermiņa iedarbības pētījums). Kontroles dzīvniekiem tika implantēti osmotiskie minisūkņi ar fizioloģisko šķīdumu. Lai kavētu endogēnā insulīna izdalīšanos, pēc vienreizējas palmitoilkarnitīna (50 mg/kg) ievadīšanas tika izmantots α_2 -adrenoreceptoru agonists guanabenzs (i.p. 1 mg/kg, *Saha et al.*, 2005). Lai noteiktu palmitoilkarnitīna efektu uz insulīna

stimulēto iedarbību, insulīnu (0,3 SV/kg) ievadīja subkutāni 1 stundu pēc intraperitoneālas guanabenza vai guanabenza + palmitoilkarnitīna injekcijas.

Lai izpētītu ilgstošas farmakoloģiskas acilkarnitīnu līmeņa samazināšanas un fiziskās aktivitātes terapiju pretdiabēta iedarbību, C57BL/6 peles tika sadalītas 3 grupās, un db/db peles tika sadalītas 4 grupās, kā parādīts 1.1. tabulā. C57BL/6 peles 8 nedēļas tika barotas ar augsta tauku satura (*Special Diets Services*, Lielbritānija) diētu, lai izraisītu insulīna rezistenci. Metil-GBB fosfāts (ekvivalents 5 mg/kg metil-GBB) tika dots ar dzeramo ūdeni 8 nedēļas. Tajā pašā laika periodā tika nodrošināta fiziskā aktivitāte db/db pelēm, izmantojot piespiedu fiziskās aktivitātes aparatūru (*PsymCon Model 35500, Lafayette Instrument, ASV*).

1.1. tabula

Pētījuma dizains ar C57BL/6, db/Lean un db/db pelēm

Nr. p/k.	Grupa	Peles ar bojātu insulīna jutību	Peles ar diabētu	Terapija
1.	Kontrole bez diabēta	Parasta barība	<i>db/Lean</i>	ūdens
2.	Kontrole ar diabētu	Tauku barība	<i>db/db</i>	ūdens
3.	Metil-GBB	Tauku barība	<i>db/db</i>	Metil-GBB ¹
4.	Fiziskā aktivitāte	—	<i>db/db</i>	Fiziskā aktivitāte ²
5.	Metil-GBB + fiziskā aktivitāte	—	<i>db/db</i>	Metil-GBB ¹ + fiziskā aktivitāte ²

¹ metil-GBB vienreiz dienā, p.o. 5 mg/kg; ² Fiziskā aktivitāte – piespiedu staigāšana piecas dienas nedēļā, 60 minūtes dienā, ātrumā 5 metri minūtē.

Lai izpētītu acilkarnitīnu lomu išēmijas-reperfūzijas bojājuma attīstībā, pirms izolētas sirds eksperimentiem *Wistar* žurkas tika anestēzētas, izmantojot nātrija pentobarbitālu (60 mg/kg intraperitoneālas injekcijas), vienlaikus lietojot heparīnu (1000 vienības/kg).

Lai novērtētu saistību starp palielinātu plazmas un audu acilkarnitīnu daudzumu un aterosklerozes attīstību un pēfītu metil-GBB molekulāros pretaterosklerozes mehānismus, *apoE^{-/-}* pelēm tika dots metil-GBB fosfāts (atbilst 10 mg/kg metil-GBB), kas izšķīdināts dzeramajā ūdenī. Aterosklerozes attīstības pāātrināšanai visi eksperimentālie dzīvnieki 8 nedēļu vecumā 4 mēnešus tika baroti ar *Western RD (P)* diētu, kas saturēja 21% tauku un 0,15% holesterīna (*Special Diets Services*, Lielbritānija).

1.2. Metodes

1.2.1. *In vitro* metodes

1.2.1.1. *Western blot* analīze

Poliakrilamīda gela elektroforēze un *Western blot* analīze tika veikta, kā iepriekš aprakstīts (*Liepinsh et al.*, 2014b). Lai noteiktu Akt fosforilācijas līmeni Ser473, membrānas tika inkubētas ar anti-P-Akt (#sc-7985-R; *Santa Cruz Biotechnology*, ASV vai #4060S; *Cell Signaling Technology*, ASV) specifiskām antivielām un iegūtie dati tika normalizēti pret kopējo Akt (#sc-8312; *Santa Cruz Biotechnology*) proteīna ekspresiju.

1.2.1.2. Acilkarnitīnu noteikšana plazmā un audos

Acylkarnitīnu daudzuma noteikšanu paraugos veica ar *UPLC/MS/MS* (*Makrecka et al.*, 2014). Parauga ekstrakcija tika veikta, kā aprakstīts iepriekš (*Blachnio-Zabielska et al.*, 2011).

1.2.1.3. Metil-GBB noteikšana plazmā

Metil-GBB koncentrācijas plazmā mērīja ar *UPLC/MS/MS* un *Quattro Micro tripla-quadrupole* masas spektrometru, izmantojot pozitīvas uzlādēšanas elektroizsmidzināšanas jonizāciju (*Dambrova et al.*, 2008, 2013).

1.2.1.4. Bioķīmisko parametru noteikšana plazmā un asinīs

Asins paraugi bioķīmiskajiem mērījumiem tika ņemti no astes vēnas, izmantojot heparīnu saturošas mēģenes. Lai iegūtu plazmu, paraugus centrifugēja pie 1000 g 10 min 4 °C temperatūrā.

Glikozes koncentrāciju plazmas paraugos mērīja, izmantojot *Instrumentation Laboratory* (Itālija) un *Roche Diagnostics* (Vācija) komerciāli pieejamus reaģentu komplektus. Glikozes līmeni asinīs noteica ar *MediSense Optium* (*Abbott Diabetes Care*, Lielbritānija) glikozes mērītāju. Brīvo taukskābju koncentrācija tika noteikta, izmantojot reaģentu komplektus no *Wako* (Vācija). Insulīna koncentrācija plazmā tika noteikta, izmantojot žurku insulīna *RIA* komplektu un žurku/peļu insulīna *ELISA* komplektu (*Millipore*, ASV). Triglicerīdu, augsta un zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna koncentrācijas tika mērītas, izmantojot *IL Laboratories* komplektus (ASV). Audzēja nekrozes faktora alfa ($TNF\alpha$) koncentrāciju plazmā mērīja, izmantojot $TNF\alpha$ *ELISA* komplektu no *Millipore*.

1.2.1.5. Sirds mitohondriju izolēšana

Mitohondriji tika izolēti no sirds audiem, izmantojot iepriekš aprakstītu metodi (*Kuka et al.*, 2012a). Izolēti sirds mitohondriji līdz izmantošanai tika uzglabāti uz ledus vai tika sasaldēti līdz analīzei.

1.2.1.6. Palmitoilkarnitīna uzkrāšanās noteikšana mitohondriju frakcijās

Izolēti žurku sirds mitohondriji tika inkubēti 5,6 nM iezīmēta [9,10-³H]-palmitoilkarnitīna (specifiskā radioaktivitāte 60 Ci/mmol; *American Radiolabeled Chemicals*), 10 mM sukcināta, 1 μM rotenona un 1 mM ADF klātbūtnē. Pēc tam mitohondriji tika mazgāti un sagatavotas mitohondriju

frakcijas. Ārējās mitohondriju membrānas un starpmembrānu frakcijas atdalīšana tika veikta, kā aprakstīts iepriekš (Ryu *et al.*, 2011).

1.2.1.7. Mitohondriju skābekļa patēriņa mērījumi

Lai noteiktu palmitoilkarnitīna izraisītu mitohondriju bojājumu, tika veikta augstas izšķirtspējas respirometrija ar vienlaicīgu fluorimetriju, izmantojot *Oxygraph-2k* (*O2k*, *Oroboros Instruments*, Austrija) apvienojumā ar *O2k* fluorescences *LED2* moduli. Sukcināts (10 mM) ar rotenonu (1 μ M) tika izmantots, lai mērītu ar kompleksu II saistītu elpošanu, un piruvāts un malāts (attiecīgi 5 mM un 0,5 mM) ar sukcinātu (10 mM), lai mērītu ar kompleksiem I un II saistīto elpošanu. Mērījumi tika veikti oksidatīvās fosforilācijas (*OXPPOS*) stāvoklī, izmantojot 1 mM ADF. Lai noteiktu *LEAK_{Omy}* saistīto elpošanu, tika pievienots oligomicīns A (10 μ M). Vienlaikus ar skābekļa patēriņa mērījumiem tika izmantots tetrametil-rodamiņa metilesteris (TMRM, LST668, *Life Technologies*), lai noteiktu mitohondriju membrānas potenciālu, kā arī tika mērīta H₂O₂ plūsma, izmantojot H₂O₂ jutīgu zondi *Amplex® Ultra Red* (A36006, *Life Technologies*, *Makrečka-Kuka et al.*, 2015).

1.2.1.8. Aterosklerotisko bojājumu kvantitatīva noteikšana aortas sinusā

Aterosklerozes parametru kvantitatīvai analīzei sirdis tika apstrādātas, izmantojot iepriekš aprakstītu metodi (*Vilskersts et al.*, 2009). Aortas attēli tika iegūti, izmantojot *Leica DFC490* digitālo kameru (Vācija). Kopējais bojājuma laukums tika mērīts, izmantojot *Image-Pro Plus 6.3* programmatūru, kā aprakstīts iepriekš (*Liepinsh et al.*, 2013a).

1.2.1.9. Makrofāgu un monocītu infiltrācijas kvantitatīva noteikšana aterosklerotiskajos bojājumos

Lai noteiktu makrofāgu un monocītu skaitu aortas sinusa aterosklerotiskajos bojājumos, tika sagatavoti 10 µm biezi aortas sinusa griezumumi (*Vilskersts et al.*, 2009). Griezumi tika piestiprināti uz poli-L-lizīna pārklājumu saturošiem priekšmetstikliem, žāvēti gaisā un fiksēti aukstā acetona. Pēc fiksācijas griezumumi tika krāsoti ar žurku anti-MOMA-2 antivielām no *Abcam* (Lielbritānija), izmantojot iepriekš aprakstītu metodi (*Hoyer et al.*, 2012).

1.2.1.10. Aterosklerotisko bojājumu kvantitatīva noteikšana aortā

Aortas tika fiksētas 4% formaldehīdā. Pēc fiksācijas visa aorta tika atvērta garenvirzienā, piestiprināta pie silikona plāksnēm un krāsota lipīdu noteikšanai ar Sudānu IV. Aortas attēli tika uzņemti, izmantojot *Sony α77* digitālo kameru, un kopējais bojājuma laukums tika aprēķināts, izmantojot *Image-Pro Plus 6.3* programmatūru. Aterosklerozes apmērs tika izteikts procentos no aortas virsmas, ko pārklāj bojājumi, salīdzinot ar kopējo aortas virsmu.

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

1.2.2.1. Glikozes un insulīna tolerances testi

Lai sagatavotos glikozes tolerances testam, pelēm nakts laikā tika noņemta barība. Tad pelēm tika intraperitoneāli ievadīts glikozes šķīdums (0,5 vai 1 g/kg) un no astes vēnas tika ņemti asins paraugi šādos laika punktos: 0 (tukšā dūšā), 15, 30, 60, 120, 180 un 240 minūtes. Insulīna tolerances testam ēdušām pelēm insulīna šķīdums tika ievadīts intraperitoneāli vai subkutāni (ar attiecīgajām devām 0,75 vai 0,3 – 0,5 SV/kg) un no astes vēnas tika ņemti asins paraugi šādos laika punktos: 0 (ēduši), 30, 60, 120 un 240 minūtes

(eksperimentā ar *db/db* pelēm tika savākts papildus asins paraugs pēc 24 stundām). Glikozes koncentrācija asinīs tika mērīta, izmantojot *MediSense Optium Xceed* asins glikozes mērītāju.

1.2.2.2. Glikozes uzņemšanas mērījumi *in vivo*

Lai noteiktu glikozes uzņemšanu *in vivo*, pelēm tika ievadīts 1 μCi 2-[1,2- ^3H]-deoksi-D-glikozes (^3H)-DOG, specifiskā aktivitāte, 60 Ci/mmol). Pēc 10 minūtēm peles tika nogalinātas un tika sagatavoti sirds, muskuļu, aknu un taukaidu homogenāti (1 : 5, masa/tilpums *milliQ* ūdenī). ^3H -DOG saturs audu paraugos tika noteikts ar scintilācijas metodi.

1.2.2.3. Izolētas sirds infarkta pētījums

Izolētās žurku sirds infarktu eksperimentu veica saskaņā ar Langendorffa metodi, kā iepriekš aprakstīts (*Kuka et al.*, 2012a). Infarkta lielums tika noteikts, kā aprakstīts iepriekš (*Liepinsh et al.*, 2013a).

1.3. Datu apstrādes statistiskās metodes

Datus izteica kā vidējās aritmētiskās vērtības \pm vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda (S.E.M.). Grupu salīdzināšanai izmantoja Stjūdentu t-testu, hī kvadrāta testu dispersijas analīzes metodi ar sekojošu Tukija testu, t-testu divu atkarīgu izlašu salīdzināšanai, Manna-Vitnija U-testu vai Dunneta testu. Atšķirības tika uzskatītas par nozīmīgām, ja $P < 0,05$. Dati tika analizēti, izmantojot *Graph Pad Prism 5.03* programmatūru (*Graph Pad Inc.*, ASV).

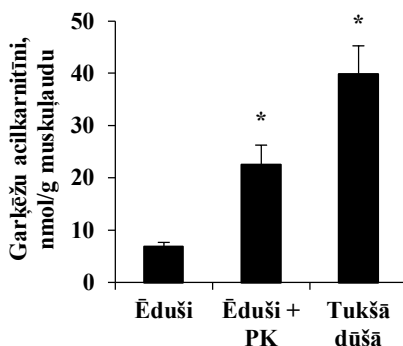
2. REZULTĀTI

2.1. Palmitoilkarnitīna akūtas un ilgstošas lietošanas ietekme uz enerģijas metabolismu pelēs

Lai izpētītu acilkarnitīnu nozīmi insulīna rezistences attīstībā, pelēm tika akūti vai ilgstoši ievadīts palmitoilkarnitīns, lai palielinātu garķēžu acilkarnitīnu koncentrāciju.

2.1.1. Akūtas palmitoilkarnitīna ievadīšanas ietekme uz glikozes metabolismu

Palmitoilkarnitīna ievadīšana devā 50 mg/kg izraisīja tikai trīskārtēju garķēžu acilkarnitīnu daudzuma pieaugumu muskuļos (2.1. attēls).

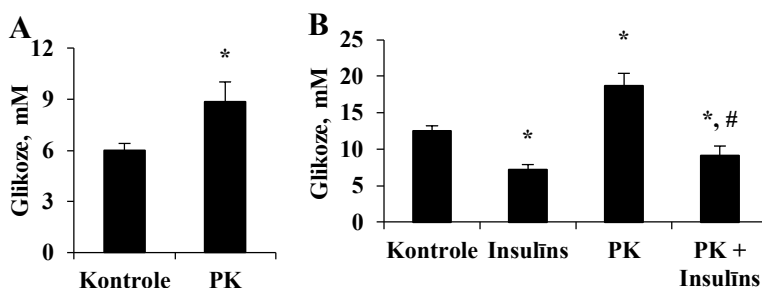


2.1. attēls. Palmitoilkarnitīna (PK, 50 mg/kg i.p. 1 h) akūtas lietošanas ietekme uz garķēžu acilkarnitīnu koncentrāciju muskuļu audos

Rezultāti ir vidējais \pm S.E.M. no 8 (ēdušām), 3 (ēdušām + PK) vai 5 (tukšas dūšas) pelēm. *Statistiski ticami atšķiras no ēdušo dzīvnieku grupas (Tukija tests, $P < 0,05$)

Salīdzinājumam, tukšas dūšas stāvoklī garķēžu acilkarnitīnu daudzums muskuļaudos bija 5 reizes lielāks nekā ēdušā stāvoklī (2.1. attēls). Tādējādi var secināt, ka palmitoilkarnitīna ievadīšanas izraisītais efekts uz garķēžu acilkarnitīnu daudzumu muskuļos ir līdzīgs īstermiņa badošanās stāvoklim.

Palmitoilkarnitīna vienreizēja ievadīšana izraisīja ievērojamu glikozes koncentrācijas palielināšanos pelēm tukšā dūšā (2.2. A attēls) un ēdušā stāvoklī (2.2. B attēls). Insulīna ievadīšana nozīmīgi samazināja glikozes līmeni asinīs gan kopā ar palmitoilkarnitīnu, gan bez tā. Šis papildus insulīna koncentrācijas pieaugums samazināja palmitoilkarnitīna izraisīto ietekmi uz glikozes līmeni asinīs, kas liecina, ka augstākas insulīna koncentrācijas var pārvarēt palmitoilkarnitīna izraisīto kavējošo ietekmi uz glikozes metabolismu.

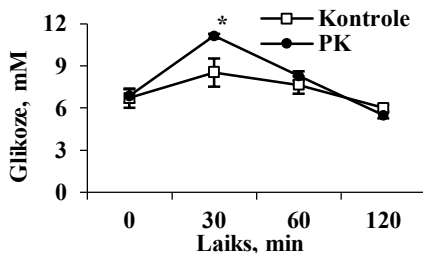


2.2. attēls. **Palmitoilkarnitīna (PK, 50 mg/kg i.p. 1 h) akūtās lietošanas ietekme uz glikozes koncentrāciju tukšā dūšā (A) un ēdušā (B) stāvoklī**

Rezultāti ir vidējais \pm S.E.M. no 5 dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no atbilstošās kontroles grupas, # ievērojami atšķiras no insulīna kontroles grupas (Stjudenta t-tests vai ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tujija testa, $P < 0,05$).

Lai pārbaudītu palmitoilkarnitīna 24 stundu iedarbību uz glikozes toleranci un enerģijas metabolisma līdzsvaru pelēm, palmitoilkarnitīnu ievadīja pelēm devā 50 mg/kg/dienā, izmantojot lēnās vielu izdalīšanas osmotiskos minisūkņus (2.3. attēls).

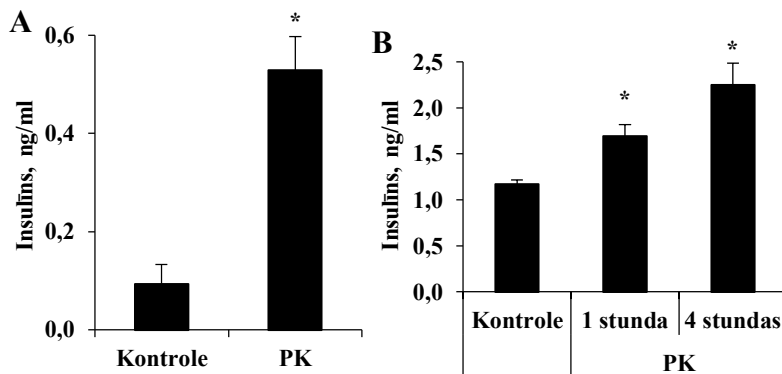
Glikozes tolerances testā palmitoilkarnitīna grupas pelēm tika novērots ievērojami augstāks glikozes līmenis asinīs (2.3. attēls). Šie rezultāti liecina, ka palmitoilkarnitīna koncentrācijas pieaugums kavē glikozes metabolisma pāreju no postprandiālā stāvokļa uz tukšas dūšas stāvokli.



2.3. attēls. **Palmitoilkarnitīna (PK, 50 mg/kg/24 stundās) ievadīšanas ietekme uz glikozes toleranci**

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 4 dzīvniekiem. * Būtiski atšķiras no attiecīgās kontroles grupas (Stjūdenta t-tests, $P < 0,05$).

Lai noteiktu, vai acilkarnitīni ietekmē insulīna sekrēciju, pelēm tukšā dūšā *bolus* injekcijas veidā tika ievadīts palmitoilkarnitīns. Palmitoilkarnitīna ievadīšana izraisīja ievērojamu (5 reizes) insulīna koncentrācijas palielināšanos (2.4. attēls).

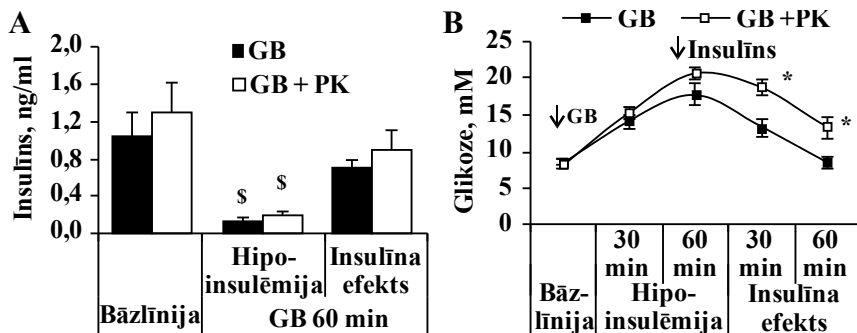


2.4. attēls. **Insulīna koncentrācija plazmā pēc palmitoilkarnitīna (PK, 50 un 100 mg/kg) ievadīšanas tukšā dūšā (A) un ēdušā stāvoklī (B)**

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 5 dzīvniekiem. * Būtiski atšķiras no attiecīgās kontroles grupas (Stjūdenta t-tests vai ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tukija testu, $P < 0,05$).

Pēc palmitoilkarnitīna ievadīšanas ēdušās pelēs insulīna koncentrācija palielinājās aptuveni 2 reizes (2.4. B attēls). Kopumā rezultāti parāda, ka palmitoilkarnitīns pastiprina glikozes stimulēto insulīna izdalīšanos, tādējādi parādot, ka garķēžu acilkarnitīnu iedarbība ir svarīga fizioloģiskai pārejai no tukšas dūšas stāvokļa uz ēdušu stāvokli, un diabēta gadījumā paaugstināta to koncentrācija izraisa hiperinsulinēmiju.

Lai detalizētāk analizētu palmitoilkarnitīna ietekmi uz insulīna izdalīšanos, tika novērtēta gan insulīnatkarīgā, gan no insulīna neatkarīgā glikozes homeostāze *in vivo*. Lai pētītu insulīna neatkarīgo palmitoilkarnitīna iedarbību uz plazmas glikozi, pelēm tika ievadīts α_2 -adrenoreceptora agonists guanabenzs, kas inhibē endogēnu insulīna izdalīšanos (Angel *et al.*, 1988; Saha *et al.*, 2005). Lai novērtētu insulīna atkarīgo iedarbību, pēc guanabenza ievadīšanas tika ievadīts insulīns (2.5. attēls).



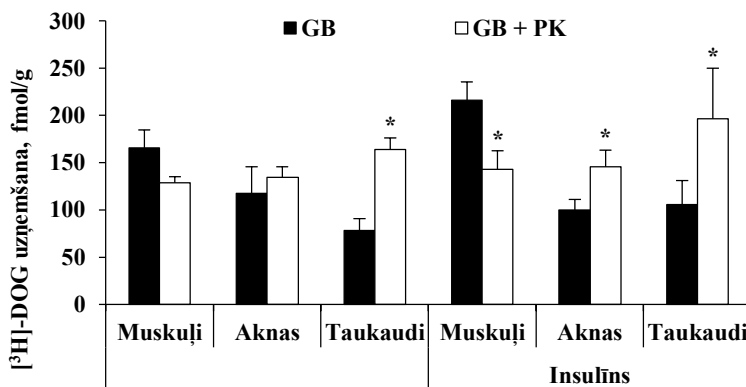
2.5. attēls. No insulīna neatkarīga palmitoilkarnitīna (PK, 50 mg / kg i.p.) ietekme uz plazmas insulīna (A) un glikozes (B) līmeni

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 8 dzīvniekiem. *Ievērojami atšķiras no attiecīgās kontroles grupas, \$ ievērojami atšķiras no bāzes līnijas (Stjudenta t-tests vai ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tukija testu, $P < 0,05$). GB - guanabenzs.

Ēdušām kontroles pelēm guanabenza ievadīšana izraisīja hipoinsulinēmiju (2.5. attēls) un izraisīja ievērojamu glikozes līmeņa

paaugstināšanos plazmā no 8,6 mM līdz 17,7 mM. Sekojoša insulīna ievadīšana palielināja insulīna koncentrāciju (2.5. A attēls) un ievērojami samazināja glikozes koncentrāciju līdz sākotnējam līmenim (2.5. B attēls). Palmitoilkarnitīna ievadīšana kombinācijā ar guanabenzu izraisīja glikozes koncentrācijas paaugstināšanos plazmā par aptuveni 3 mM augstāk nekā salīdzinājumā ar guanabenza grupu. Palmitoilkarnitīns arī ievērojami kavēja glikozes līmeni samazinošo insulīna efektu (2.5. attēls). Tādējādi glikozes koncentrācija asinīs palmitoilkarnitīna grupā saglabājās par 5 mM augstāka nekā kontroles pelēm.

Šos efektus var izskaidrot ar būtisku palmitoilkarnitīna izraisītu insulīna stimulētās [³H]-DOG uzņemšanas samazināšanu muskuļu audos (2.6. attēls).



2.6. attēls. Akūtas palmitoilkarnitīna (PK, 50 mg/kg i.p. 1 stunda) ievadīšanas iedarbība ar guanabenzu (GB) un insulīnu uz [³H]-deoksiglikozes uzņemšanu

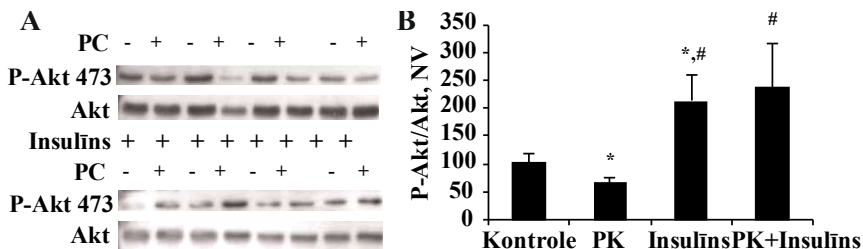
Katra vērtība ir vidējais ± S.E.M. no 8 dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no attiecīgās kontroles grupas (ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tukija testu, $P < 0,05$).

Svarīgi, ka palmitoilkarnitīna ietekmi uz glikozes līmeni asinīs daļēji mazināja ievērojami stimulētā [³H]-DOG uzņemšana aknās un taukaudos (2.6. attēls).

Kopumā palmitoilkarnitīna ievadīšana ierobežo ar insulīnu saistīto glikozes uzņemšanu muskuļos.

2.1.2. Palmitoilkarnitīna darbības mehānismi

Lai novērtētu palmitoilkarnitīna ietekmi uz insulīna signālceļu, tika novērtēta Akt Ser-473 fosforilācija peles muskuļos pēc vienreizējas palmitoilkarnitīna ievadīšanas *in vivo* (devā 50 mg/kg, 2.7. attēls). Akūta palmitoilkarnitīna ievadīšana (devā 50 mg/kg) samazināja Akt fosforilāciju (2.7. attēls). Insulīna koncentrācijas palielināšanās pārvarēja palmitoilkarnitīna izraisīto Akt fosforilācijas kavēšanu (2.7. attēls). Līdz ar to var secināt, ka palmitoilkarnitīns izraisa Akt fosforilācijas kavēšanu, bet insulīna koncentrācijas pieaugums līdz noteiktam līmenim var pārvarēt palmitoilkarnitīna izraisīto ietekmi uz insulīna signālceļu.



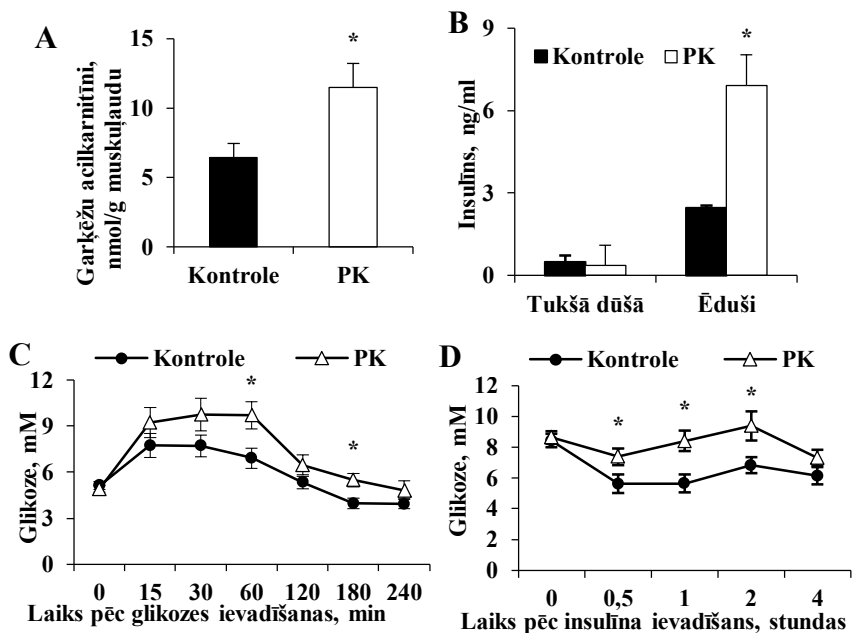
2.7. attēls. **Palmitoilkarnitīna (PK) ietekme ar insulīnu vai bez tā uz Akt (Ser-473) fosforilāciju ēdušu peļu muskuļos *in vivo* (50 mg/kg PK i.p. 1 stunda)**

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 5 dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no kontroles grupas, # ievērojami atšķiras no palmitoilkarnitīna grupas (ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tukija testu, $P < 0,05$).

Jāsecina, ka palmitoilkarnitīna inhibējošā iedarbība uz Akt fosforilāciju un insulīna signālceļu ir svarīgs tā darbības mehānisms.

2.1.3. Palmitoilkarnitīna ilgstošas ievadišanas efekti

Lai nodrošinātu palmitoilkarnitīna ilgstošu ievadišanu, lietojām zāļu vielas lēnas atbrīvošanas osmotiskos minisūkņus (*ALZET*®, ASV). Šis eksperimentālais modelis nodrošināja garķēžu acilkarnitīnu daudzuma pastāvīgu palielinājumu muskuļos 28 dienu garumā. Kontroles pelēm tika implantēti minisūkņi ar fizioloģisko šķīdumu.



2.8. attēls. Ilgstošas palmitoilkarnitīna (PK, 10 mg/kg/dienā 28 dienas) ievadišanas ietekme uz garķēžu acilkarnitīnu saturu muskuļos ēdušā stāvoklī (A), insulīna koncentrāciju plazmā (B), glikozes (C) un insulīna (D) toleranci

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 10 dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no attiecīgās kontroles grupas (Stjūdenta t-tests, $P < 0,05$)

Palmitoilkarnitīna ievadišana devā 10 mg/kg/dienā muskuļos izraisīja būtisku, divkārtu kopējo garķēžu acilkarnitīnu daudzuma pieaugumu (2.8. attēls). Ilgstoša garķēžu acilkarnitīnu daudzuma palielināšanās izraisīja glikozes

tolerances traucējumus (2.8. C attēls). Laukums zem līknes, kas tika aprēķināts no glikozes tolerances testa datiem palmitoilkarnitīna grupā, ievērojami palielinājās par 30%. Palmitoilkarnitīna ievadīšana bloķēja insulīna izraisīto glikozes līmeņa pazeminošo efektu insulīna tolerances testā (2.8. attēls).

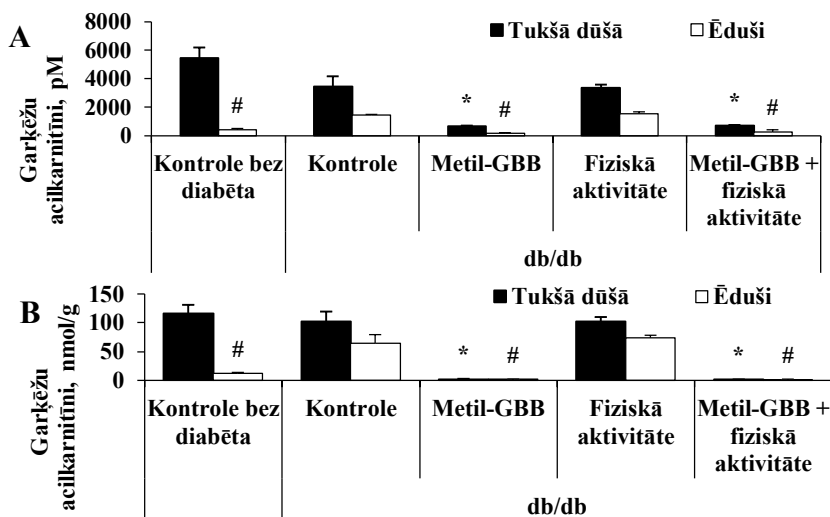
Kontroles dzīvniekiem insulīna ievadīšana samazināja glikozes koncentrāciju asinīs par aptuveni 3 mM, bet palmitoilkarnitīna grupā glikozes līmenis asinīs 4 stundu laikā nemainījās. Palmitoilkarnitīna grupas pelēm plazmas glikozes koncentrācija bija līdzīga kā kontroles peļu grupā. Tas, ka glikozes koncentrācija netika ietekmēta, varētu būt saistīts ar to, ka ēdušā stāvoklī palmitoilkarnitīna grupas pelēm bija 2,8 reizes lielāka insulīna koncentrācija (2.8. B attēls). Kopumā jāsecina, ka garķēžu acilkarnitīnu daudzuma palielināšanās ilgtermiņā izraisa insulīna rezistenci un hiperinsulinēmiju.

2.2. Metil-GBB terapijas un fiziskās aktivitātes iedarbība uz insulīna jutību eksperimentālos diabēta un insulīna rezistences modeļos

Lai pētītu farmakoloģiskas acilkarnitīnu koncentrācijas samazināšanas iedarbību cukura diabēta gadījumā, tika izmantota metil-GBB terapija atsevišķi vai kombinācijā ar fizisko aktivitāti. Tika izmantoti divi eksperimentāli modeļi: insulīna rezistences modelis, kur ar augsta tauku satura barību tika barotas *C57BL/6* peles, un *db/db* peļu diabēta modelis.

2.2.1. Acilkarnitīnu daudzums *db/db* peļu plazmā un muskuļos

Lai novērtētu, vai acilkarnitīni uzkrājas diabēta laikā, acilkarnitīnu daudzums tika mērīts ēdušā un tukšas dūšas stāvokļos (2.9. attēls).



2.9. attēls. Metil-GBB ievadišanas (devā 5 mg/kg 8 nedēļas) un fiziskās aktivitātes ietekme uz garķēžu acilkarnitīnu koncentrāciju peļu plazmā (A) un muskuļos (B) Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 10 dzīvniekiem. * Būtiski atšķiras no tukšas dūšas *db/db* kontroles grupas, # būtiski atšķiras no ēdušo *db/db* peļu kontroles grupas (ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tukija testu, $P < 0,05$).

Ēdušām bez diabēta kontroles pelēm garķēžu acilkarnitīnu koncentrācija plazmā bija 13 reizes zemāka nekā tukšā dūšā. Diabēta kontroles pelēm šī atšķirība samazinās līdz divkārtīgai, kas liecina par to, ka šis rādītājs varētu tikt izmantots kā metabolisma neelastīguma rādītājs diabēta gadījumā. Tukšā dūšā garķēžu acilkarnitīnu plazmas daudzums *db/db* pelēm bija par 37% mazāks nekā bez diabēta kontroles pelēm (2.9. A attēls). Ēdušā stāvoklī plazmas garķēžu acilkarnitīnu koncentrācija bija 3,5 reizes augstāka *db/db* pelēm nekā pelēm bez diabēta (2.9. A attēls), kā rezultātā tika konstatēta mazāka atšķirība starp garķēžu acilkarnitīnu daudzumiem ēdušos un tukšas dūšas stāvokļos *db/db* kontroles pelēm.

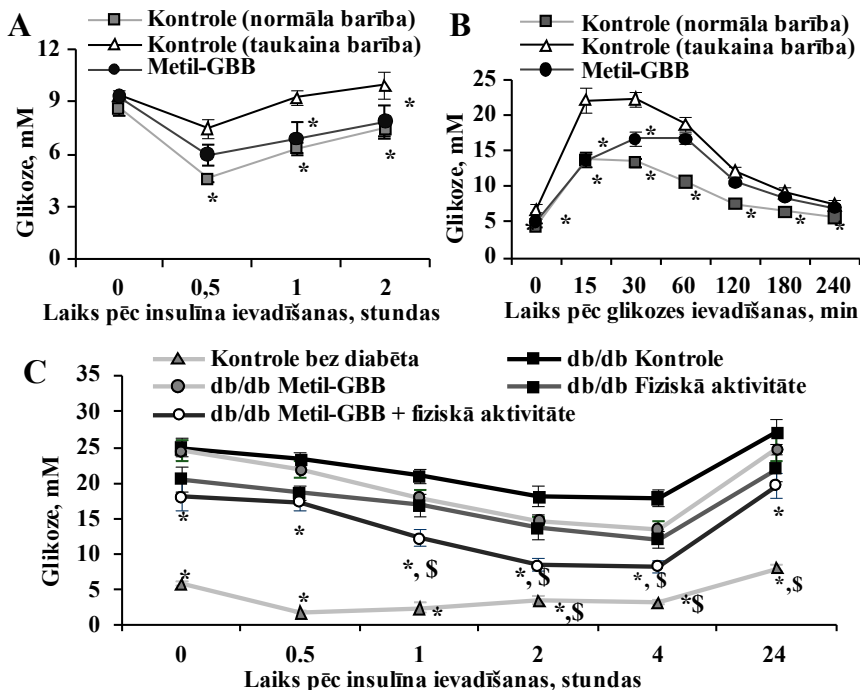
Acilkarnitīnu profils plazmā pilnībā atspoguļo acilkarnitīnu profilu muskuļos (2.9. attēls). Tukšā dūšā diabēta un bez diabēta kontroles pelēm

muskuļos garķēžu acilkarnitīnu daudzums bija līdzīgs, bet ēdušām *db/db* pelēm tika novērots 5 reizes lielāks garķēžu acilkarnitīnu daudzums kā bez diabēta kontroles pelēm. Šie rezultāti parāda, ka acilkarnitīnu uzkrāšanās muskuļos ir saistīta ar acilkarnitīnu bojājošo ietekmi uz glikozes metabolismu ēdušā stāvoklī. Fiziskā aktivitāte neietekmēja īso, vidējo un garo ķēžu acilkarnitīnu koncentrāciju plazmā un muskuļos (2.9. attēls). Savukārt, metil-GBB terapija izraisīja būtisku visu acilkarnitīnu plazmas un muskuļu koncentrāciju samazināšanos abos stāvokļos, kā arī tad, kad tā tika apvienota ar fizisko aktivitāti (2.9. A attēls). Līdz ar to metil-GBB izraisīja līdz pat 60-kārtēju samazinājumu acilkarnitīnu koncentrācijā muskuļos un līdz pat 7 reīžu acilkarnitīnu daudzuma samazinājumu plazmā (2.9. attēls). Rezultāti liecina, ka garķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas plazmā postprandiālā stāvoklī varētu būt insulīna rezistences marķieris. Metil-GBB terapijas izraisīts acilkarnitīnu daudzuma samazinājums bija konsekvents gan ēdušā, gan tukšas dūšas stāvokļos gan atsevišķi, gan kombinācijā ar fizisko aktivitāti.

2.2.2. Metil-GBB un fiziskās aktivitātes ietekme uz glikozes un insulīna toleranci

Tika veikti glikozes un insulīna tolerances testi, lai pārbaudītu glikozes metabolisma traucējumus *db/db* pelēm un insulīna rezistentām, ar taukainu barību barotām *C57BL/6* pelēm (2.10. attēls).

Rezultāti parādīja, ka metil-GBB terapija novērsa taukainas barības izraisītos glikozes metabolisma traucējumus, kā rezultātā tika ievērojami uzlabota insulīna jutība un glikozes tolerance (2.10. A un B attēli). Arī *db/db* pelēm insulīna tolerances tests parādīja nopietnus insulīna jutības traucējumus (2.10. C attēls).



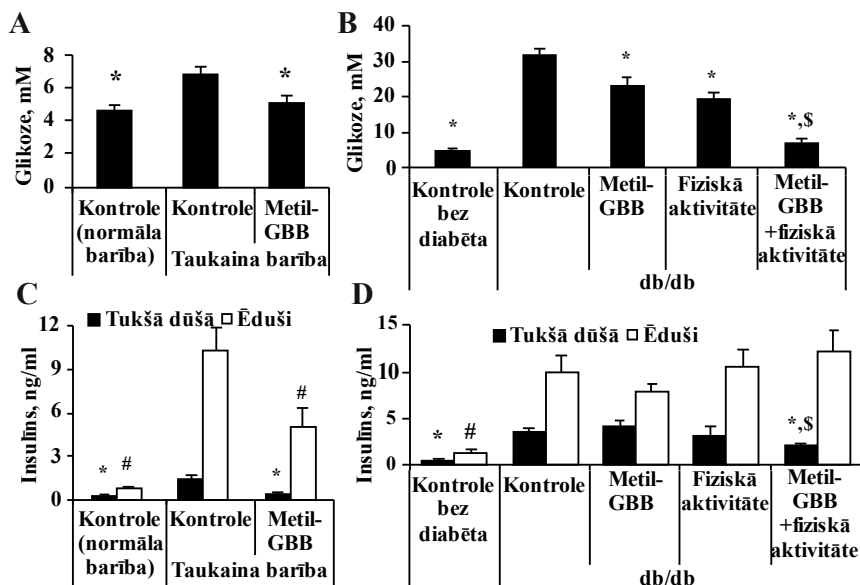
2.10. attēls. Metil-GBB ievadīšanas (5 mg/kg 8 nedēļas) un fiziskās aktivitātes izraisīta ietekme uz glikozes koncentrāciju pēc insulīna (A, C) un glikozes (B) ievadīšanas izmaiņām ar taukainu barību barotām (A, B) un *db/db* (C) pelēm. Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 10 dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no atbilstošās kontroles grupas, \$ būtiski atšķiras no fiziskās aktivitātes grupas (ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tukija testu, $P < 0,05$).

Gan fiziskā aktivitāte, gan metil-GBB ievadīšana uzlaboja jutību pret insulīnu, un īpaši izteiktu ietekmi uz insulīna jutību izraisīja metil-GBB terapijas un fiziskās aktivitātes kombinācija.

2.2.3. Metil-GBB un fiziskās aktivitātes ietekme uz glikozes un insulīna koncentrāciju

Salīdzinot ar normālas barības kontroles grupu, ar taukainu barību barotām *C57BL/6* pelēm bija ievērojami palielināta glikozes koncentrācija asinīs. Līdzīgi kā novēroja tolerances testu gadījumā, metil-GBB ievērojami

samazināja glikozes koncentrāciju līdz normālās barības kontroles grupai (2.11. attēls). *Db/db* pelēm glikozes koncentrācija gan ēdušā, gan tukšas dūšas stāvoklī bija ievērojami lielāka (2.10. C un 2.11 B attēls). Tas norāda, ka *db/db* pelēm raksturīga smaga hiperglikēmija un nekompensēts 2. tipa diabēts. *Db/db* pelēm fiziskā aktivitāte samazināja glikozes līmeni postprandiālā stāvoklī par 4 mM. Kombinēta ārstēšana izraisīja papildus par 6,5 mM samazinātu glikozes koncentrāciju (2.10. C attēls).



2.11. attēls. Metil-GBB ievadīšanas (5 mg/kg 8 nedēļas) un fiziskās aktivitātes ietekme uz glikozes līmeni tukšā dūšā, plazmas insulina koncentrācija ar taukainu barību barotām pelēm (A, C) un *db/db* pelēm (B, D)

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no 10 dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no atbilstošās cukura diabēta kontroles grupas, # ievērojami atšķiras no atbilstošās ēdušo dzīvnieku diabēta grupas, \$ ievērojami atšķiras no fiziskās aktivitātes grupas (ANOVA dispersijas analīze ar sekojošu Tukija testu, $P < 0,05$).

Tukšā dūšā *db/db* pelēm gan metil-GBB ievadīšana, gan fiziskā aktivitāte, kā arī abu kombinācija nozīmīgi samazināja glikozes koncentrāciju plazmā

attiecīgi par 8,6 mM, 12,3 mM un 24,3 mM (2.11 B attēls). Tādējādi, lai gan acilkarnitīnu uzkrāšanās tika novērota ēdušā stāvoklī, metil-GBB un kombinācijas grupas izraisītais glikozes līmeņa pazeminājums bija izteiktāks tukšā dūšā. Gan ar taukainu barību barotām pelēm, gan *db/db* pelēm novēroja hiperinsulinēmiju. Ar taukainu barību barotām pelēm metil-GBB būtiski samazināja insulīna koncentrāciju (2.11. C attēls). Pretstatā tam, fiziskā aktivitāte un metil-GBB ievadīšana būtiski neietekmēja hiperinsulinēmiju *db/db* pelēm (2.11. D attēls).

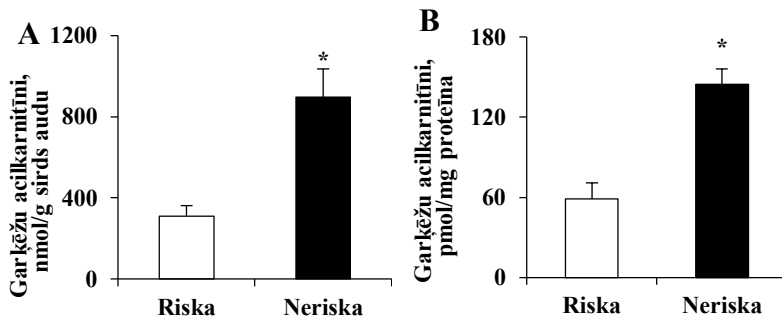
Šie rezultāti liecina, ka pārbaudīto terapiju izraisītais glikozes līmeņa pazeminājums ir saistīts ar insulīnu jutības paaugstināšanos.

2.3. Garķēžu acilkarnitīnu loma išēmijas-reperfūzijas izraisīta bojājuma attīstībā sirds mitohondrijos

Lai pētītu garķēžu acilkarnitīnu akumulācijas izraisītu bojājumu mehānismus sirds mitohondrijos išēmijas-reperfūzijas laikā, tika izmantots izolētas žurku sirds infarkta modelis un *in vitro* eksperimenti ar izolētiem sirds mitohondrijiem. *Wistar* žurkām vadīja metil-GBB, lai pārbaudītu iespējamās acilkarnitīnu daudzuma samazināšanas aizsargājošos efektus.

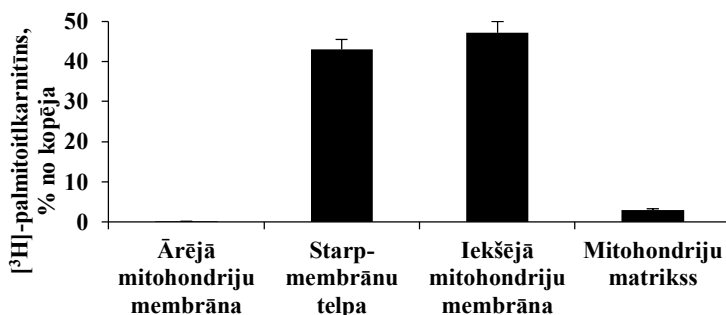
2.3.1. Acilkarnitīnu daudzums sirds audos un mitohondrijos

Acilkarnitīnu daudzums tika mērīts gan sirds audos, gan mitohondrijos riska zonā un neriska zonā pēc 30 minūšu išēmijas (2.12. attēls). Sirds audos riska zonā garķēžu acilkarnitīnu saturs bija trīs reizes lielāks nekā neriska zonā (2.12. A attēls). Arī išēmiskos mitohondrijos tika novērota garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās (2.12. B attēls).



2.12. attēls. Garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās sirds audos (A) un mitohondrijos (B), kas izolēti no riska un neriska zonām
 Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no sešām sirdīm. * Ievērojami atšķiras no atbilstošās neriska grupas (Stjudenta t tests, $P < 0,05$).

Lai izpētītu garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanos mitohondriju frakcijās, izmērījām radioiezīmētā [^3H]-palmitoilkarnitīna saturu mitohondrijos, izdalot iekšējās un ārējās membrānas, starpmembrānu telpas un mitohondriju matricas frakcijas (2.13. attēls).



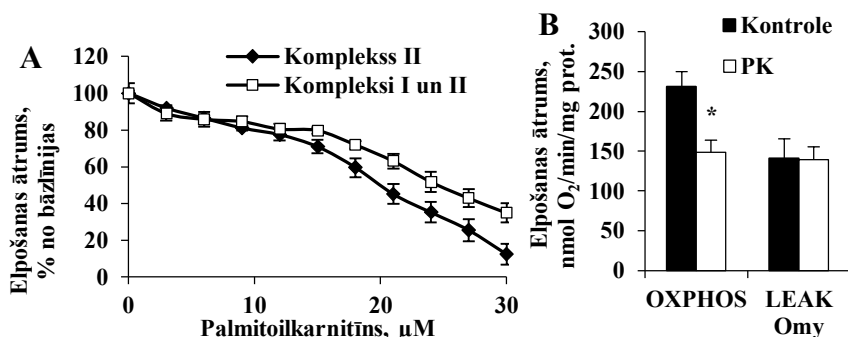
2.13. attēls. Palmitoilkarnitīna uzkrāšanās mitohondriju frakcijās
 Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no četriem eksperimentiem. * Ievērojami atšķiras no atbilstošās neriska grupas (Stjudenta t tests, $P < 0,05$).

Mitochondrijos starpmembrānu telpā tika konstatēts 43% [³H]-palmitoilkarnitīna, un 47% [³H]-palmitoilkarnitīna bija piesaistījies iekšējai mitohondriju membrānai. Mitohondriju matriksā uzkrājās tikai niecīgs daudzums [³H]-palmitoilkarnitīna.

Šie rezultāti parāda, ka galvenās palmitoilkarnitīna uzkrāšanās vietas ir iekšējā mitohondriju membrāna un starpmembrānu telpa.

2.3.2. Palmitoilkarnitīna izraisītais mitohondriju bojājums

Lai noteiktu garķēžu acilkarnitīnu izraisītā mitohondriālā bojājuma mehānismus, tika pētīta palmitoilkarnitīna ietekme uz mitohondriju skābekļa patēriņu, H₂O₂ ražošanu un mitohondriju membrānas potenciālu, izmantojot vienlaicīgu augstas izšķirtspējas respirometriju un fluorimetriju. Palmitoilkarnitīns devas atkarīgi samazināja no oksidatīvās fosforilēšanas atkarīgo mitohondriju elpošanu ar kompleksa II un kompleksu I un II substrātiem (2.14. attēls).

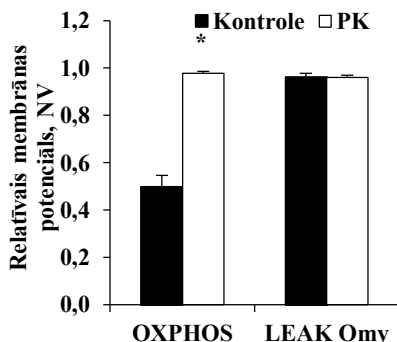


2.14. attēls. Palmitoilkarnitīna (PK) ietekme uz *OXPHOS*-atkarīgo mitohondriju elpošanu

Katra vērtība ir vidējais ± S.E.M. no četriem vai pieciem eksperimentiem. * Būtiski atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t tests, P < 0,05).

15 μM palmitoilkarnitīna pievienošana sirds mitohondrijiem neizraisīja oksidatīvās fosforilācijas atjūgšanu, jo nenovēroja mitohondriju elpošanas

palielināšanos ne *OXPHOS*, ne *LEAK_{Omy}* stāvoklī (2.14. B attēls). Tomēr 15 μ M palmitoilkarnitīna klātbūtne izraisīja divkārtu mitohondriju membrānas potenciāla palielināšanos, līdzīgi kā 10 μ M oligomicīns A (2.15. attēls).

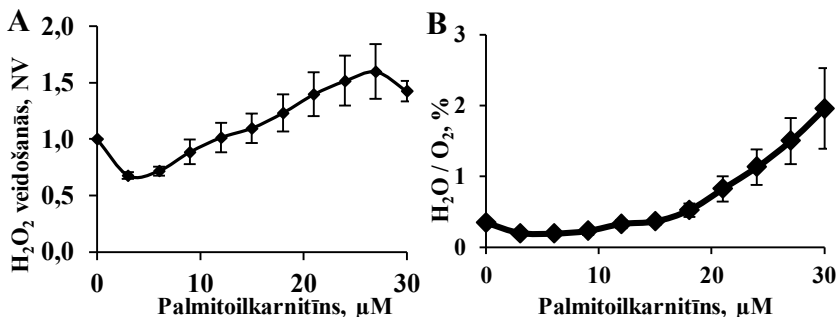


2.15. attēls. **Palmitoilkarnitīna (PK) ietekme uz mitohondriju membrānas potenciālu ar kompleksu II saistītajos *OXPHOS* un *LEAK* stāvokļos, izmantojot TMRM**

TMRM - tetrametil-rodamīna metilesteris. Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no četriem vai pieciem eksperimentiem. * Būtiski atšķiras no kontroles grupas (Stjudenta t tests, $P < 0,05$).

Palmitoilkarnitīna pievienošana devas atkarīgā veidā palielināja H_2O_2 izveides ātrumu un H_2O_2/O_2 attiecību mitohondrijos (2.16. attēls).

Kopumā šie rezultāti parāda, ka garķēžu acilkarnitīni inhibē oksidatīvo fosforilāciju sirds mitohondrijos, tādējādi izraisot mitohondriju membrānas hiperpolizāciju un stimulējot reaktīvo skābekļa savienojumu veidošanos, kas var izraisīt šūnu nāvi.

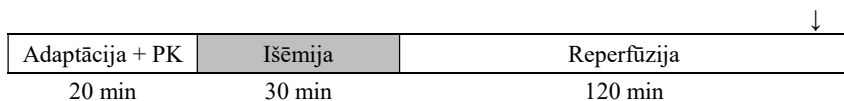


2.16. attēls. **Palmitoalkarnitīna ietekme uz H₂O₂ izveidi kompleksa II saistītajā OXPPOS stāvoklī (A un B)**

Katra vērtība ir vidējais ± S.E.M. no četriem vai pieciem eksperimentiem. * Būtiski atšķiras no kontroles grupas (Studentu t tests, P < 0,05).

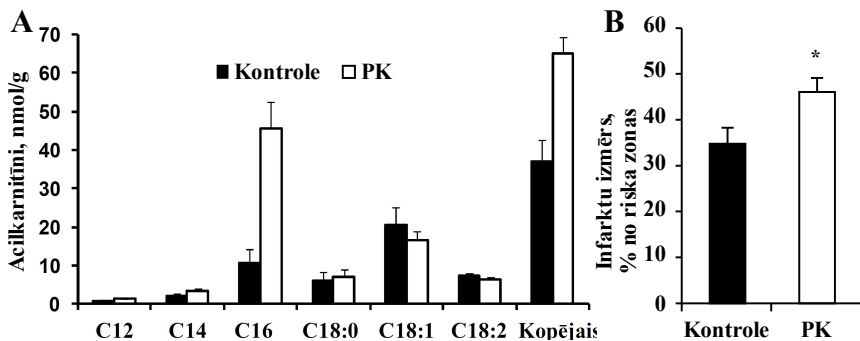
2.3.3. Acilkarnitīnu daudzuma palielināšanās un samazināšanās ietekme uz miokarda infarktu

Palmitoalkarnitīna kaitīgo ietekmi pētīja izolētas žurkas sirds išēmijas-reperfūzijas modelī, izmantojot palmitoalkarnitīnu koncentrācijā 2 µM (2.17. attēls).



2.17. attēls. **Miokarda infarkta eksperiments ar palmitoalkarnitīnu (PK): plāns** PK tika pievienots cirkulējošam Krebsa – Henzeleita buferim 2 µM koncentrācijā 20 minūtes pirms išēmijas.

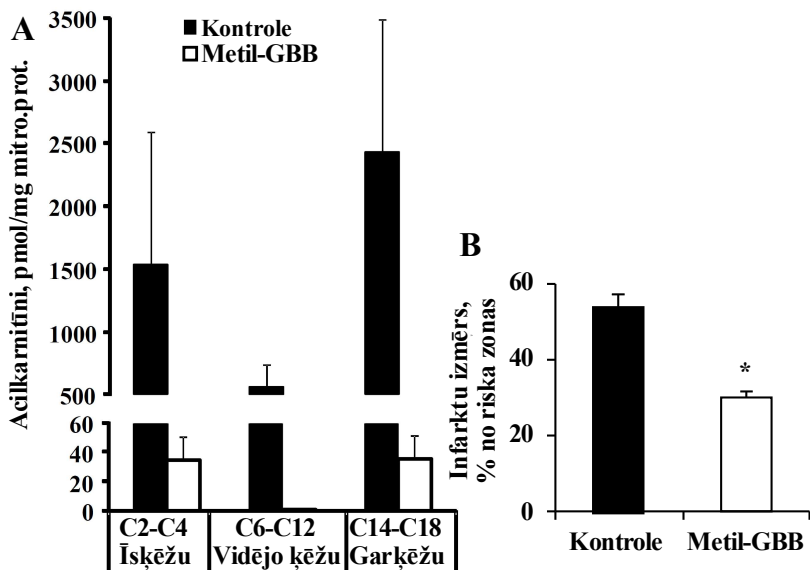
2 µM palmitoalkarnitīna pievienošana perfūzijas buferšķīdumam 4 reizes palielināja palmitoalkarnitīna koncentrāciju sirdī (2.18. A attēls). Kā parādīts 2.18 B attēlā, palmitoalkarnitīna pievienošana būtiski par 33% palielināja infarkta lielumu salīdzinājumā ar kontroles grupas infarkta lielumu. Tātad var secināt, ka palmitoalkarnitīns būtiski palielina infarkta izmēru.



2.18. attēls. Acilkarnitīnu uzkrāšanās sirds audos (A) un infarkta lielums (B) pēc reperfūzijas kontroles un palmitoilkarnitīna (PK) grupās

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no pieciem līdz desmit dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no atbilstošās kontroles grupas (Studentu t tests, $P < 0,05$).

Lai pārbaudītu acilkarnitīnu daudzuma samazināšanās ietekmi, 14 dienas pirms išēmijas-reperfūzijas bojājuma izraisīšanas žurkām tika uzsākta ilgstoša metil-GBB terapija. Rezultāti parādīja, ka metil-GBB terapija pilnībā novērsa acilkarnitīna uzkrāšanos. No riska zonas izolētos sirds mitohondrijos metil-GBB izraisīja īso, vidējo un garo ķēžu acilkarnitīnu daudzuma samazināšanos līdz 60 reizēm (2.19. A attēls). Rezultātā infarkta lielums samazinājās par 44% (2.19. B attēls). Tādējādi metil-GBB izraisīta acilkarnitīnu daudzuma samazināšana aizsargā pret akūtas išēmijas-reperfūzijas izraisītiem bojājumiem.



2.19. attēls. Ilgtermiņa metil-GBB (20 mg/kg) terapijas ietekme uz acilkarnitīnu daudzumu (A) un infarkta izmēru (B)

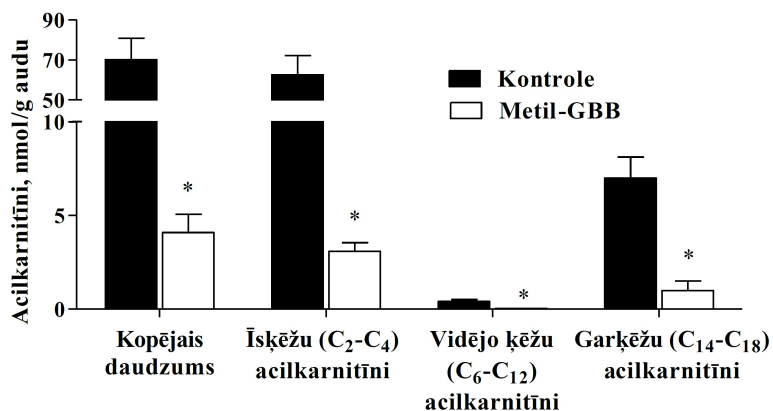
Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no pieciem līdz desmit dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no atbilstošās kontroles grupas (Studentu t tests, $P < 0,05$).

2.4. Metil-GBB terapijas ietekme uz aterosklerozes attīstību

Šajā pētījumā *apoE*^{-/-} pelēm tika vadīts metil-GBB, lai pārbaudītu terapijas ietekmi uz aterosklerozes attīstību. Savienojuma molekulārie pret-aterosklerotiskie darbības mehānismi tika izvērtēti *CD-1* līnijas pelēs pēc metil-GBB terapijas.

2.4.1. Metil-GBB ietekme uz acilkarnitīnu profilu

Metil-GBB terapijas ietekmi uz acilkarnitīna profilu aortu audos pārbaudīja *CD-1* līnijas peļu kontroles un metil-GBB grupās. Kā redzams 2.20. attēlā, metil-GBB ievadīšana devā 16,8 mg/kg ievērojami samazināja acilkarnitīnu daudzumu aortas audos.



2.20. attēls. Metil-GBB terapijas ietekme uz acilcarnitīnu profilu aortas audos

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no desmit dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no kontroles grupas (t-tests divu atkarīgu izlašu salīdzināšanai, $P < 0,05$).

Metil-GBB terapija gandrīz septiņpadsmit reizes samazināja kopējo un īsķēžu acilcarnitīnu līmeni un septiņas reizes vidējo un garo ķēžu acilcarnitīnu līmeni.

2.4.2. Metil-GBB lietošanas ietekme uz plazmas bioķīmisko profilu

ApoE^{-/-} pelēm terapija ar metil-GBB devā 10 mg/kg četru mēnešu laikā statistiski nozīmīgi samazināja triglicerīdu, un augsta un zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna koncentrāciju attiecīgi par 44%, 29% un 24% (2.1. tabula).

2.1. tabula

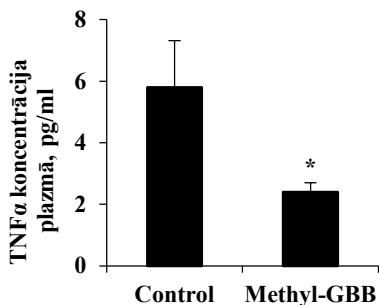
Plazmas bioķīmiskais profils pēc metil-GBB terapijas

Grupa	Triglicerīdi, mM	ABL, mg/dl	ZBL, mg/dl
Kontrole	1.8 \pm 0.2	212 \pm 22	1014 \pm 53
Metil-GBB	1.0 \pm 0.1*	150 \pm 18*	767 \pm 47*

Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no desmit dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no kontroles grupas (t-tests divu atkarīgu izlašu salīdzināšanai, $P < 0,05$). ABL – augsta blīvuma lipoproteīni; ZBL – zema blīvuma lipoproteīni

2.4.3. Metil-GBB lietošanas ietekme uz TNF α koncentrāciju plazmā

Vidējā TNF α koncentrācija kontroles grupas dzīvnieku plazmā bija $5,8 \pm 1,5$ pg/ml (2.21. attēls).

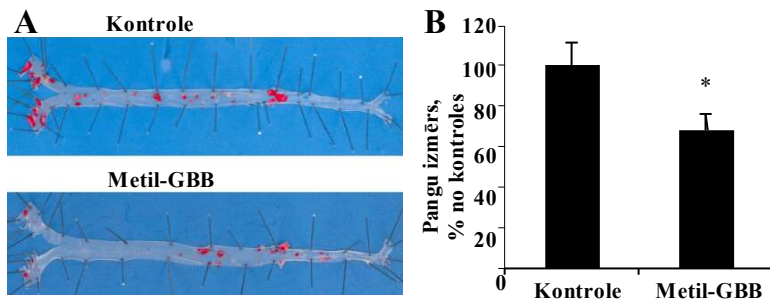


2.21. attēls. **Metil-GBB terapijas ietekme uz TNF α koncentrāciju plazmā**
Katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no desmit dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no kontroles grupas (t-tests divu atkarīgu izlašu salīdzināšanai, $P < 0,05$).

Terapija ar metil-GBB ievērojami samazināja TNF α koncentrāciju līdz $2,4 \pm 0,3$ pg/ml.

2.4.4. Metil-GBB ietekme uz aterosklerotisko bojājumu attīstību visā aortā un aortas sīnūsā

Pēc četriem eksperimenta mēnešiem *apoE*^{-/-} pelēm abās grupās tika novēroti aterosklerotiskie bojājumi. Kontroles grupā aterosklerotiskās pangas aptvēra $16,0 \pm 1,7\%$ no visas aortas laukuma. Metil-GBB ievadīšana samazināja aterosklerotisko pangu pārklāto platību visā aortā līdz $10,3 \pm 1,7\%$, tādējādi ievērojami samazinot aterosklerotisko bojājumu attīstību visā aortā par 36% (2.22. attēls). Līdzīgi, ārstēšana ar metil-GBB mazināja arī aterosklerotisko bojājumu attīstību aortas sīnūsā par aptuveni 35% (2.22. B attēls).

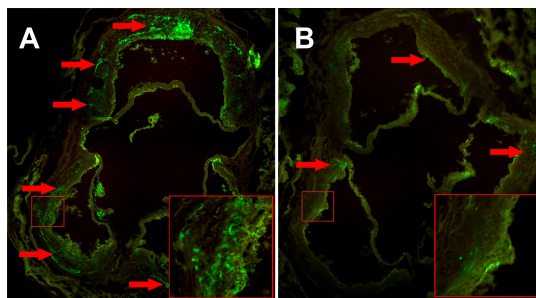


2.22. attēls. Metil-GBB ievadišanas ietekme uz aterosklerotisko bojājumu attīstību *apoE^{-/-}* peļu aortās (A) un aortu sīnusā (B)

A ir aortu pēc apstrādes ar lipīdus krāsojošu šķīdumu reprezentatīvie digitālie attēli no abām eksperimentālajām grupām. Attēlā B katra vērtība ir vidējais \pm S.E.M. no desmit dzīvniekiem. * Ievērojami atšķiras no kontroles grupas (t-tests divu atkarīgu izlašu salīdzināšanai, $P < 0,05$).

2.4.5. Metil-GBB ietekme uz makrofāgu un monocītu daudzumu aterosklerotiskajos bojājumos

Lai novērtētu metil-GBB anti-aterosklerotisko mehānismu, makrofāgu un monocītu skaits tika noteikts kontroles un metil-GBB grupās (2.23. attēls).



2.23. attēls. Metil-GBB ievadišanas ietekme uz makrofāgu un monocītu uzkrāšanos *apoE^{-/-}* peļu aortas bojājumos kontroles (A) un metil-GBB terapijas (B) grupās. Griezumi tika krāsoti ar MOMA2 antivielām. Sarkanās bultiņas norāda fluorescējošos reģionus, kuros atrodas makrofāgi un monocīti. Sarkanais kvadrāts ilustrē krāsoto šūnu atrašanās vietu aterosklerotiskajā pangā.

Metil-GBB terapija samazināja makrofāgu un monocītu infiltrāciju aortas sīnusa aterosklerotiskajās pangās.

3. DISKUSIJA

Promocijas darbs apraksta saikni starp acilkarnitīnu uzkrāšanos un tādiem patoloģiskajiem procesiem kardiometabolās slimībās kā insulīna rezistences attīstība, ateroskleroze un sirds išēmijas-reperfūzijas bojājumu attīstība. Pētījuma mērķis bija noteikt, vai acilkarnitīnu koncentrācijas farmakoloģiska samazināšana ar metil-GBB ir noderīga minēto slimību ārstēšanā, un izpētīt metil-GBB farmakoloģiskos mehānismus. Sākotnēji tika pētīti molekulārie mehānismi garķēžu acilkarnitīnu akumulācijai insulīna rezistences un diabēta modeļos. Tad tika pētīta metil-GBB terapijas pretiabēta iedarbība atsevišķi vai kombinācijā ar fizisku aktivitāti. Tika aprakstīts sirds mitohondriju bojājums, ko izraisa garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās išēmijas-reperfūzijas bojājumā, un tika novērtēta metil-GBB kardioprotektīvā iedarbība. Visbeidzot tika novērtēta metil-GBB terapijas ietekme uz aterosklerozes attīstību.

3.1. Garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās nozīme insulīna rezistences attīstībā

Esam parādījuši, ka garķēžu acilkarnitīni ietekmē glikozes metabolismu *in vivo*, un tādēļ tie ir nozīmīgi enerģijas metabolisma fizioloģiskās regulācijas nodrošināšanā. Turklāt garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās postprandiālā stāvoklī var paātrināt diabēta progresēšanu, jo tie vienlaicīgi izraisa gan insulīna rezistenci, gan pastiprina insulīna izdalīšanos *in vivo*. Palmitoilkarnitīna vienreizējas devas ievadīšana pelēm inhibē Akt fosforilāciju muskuļos un sekojošos signālceļus, kas saistīti ar glikozes uzņemšanu. Palmitoilkarnitīna ilgstoši paaugstināta koncentrācija izraisa insulīna rezistenci, hiperinsulinēmiju un glikozes tolerances traucējumus.

Iepriekšējos pētījumos vēlējāmie apstiprināt, ka paaugstināti garķēžu acilkarnitīnu līmeņi ir ne tikai marķieri nepabeigtai taukskābju oksidācijai, bet tie ir arī aktīvi taukskābju metabolīti, kas iesaistīti enerģijas metabolisma regulēšanā (*Makrecka et al.*, 2014). Mūsu pašreizējie dati apstiprina šo hipotēzi ar rezultātiem, kas liecina, ka akūts un hronisks palmitoilkarnitīna līmeņa paaugstinājums *in vivo* kavē insulīna signālceļu un ar insulīnu saistīto glikozes uzņemšanu muskuļos. Saskaņā ar mūsu rezultātiem, mehānisms, kas nodrošina novērotos garķēžu acilkarnitīnu efektus muskuļos *in vivo*, ir Akt fosforilācijas kavēšana un turpmākā signālceļa inhibēšana. Tas atbilst iepriekšējiem pētījumiem ar *C2C12* līnijas muskuļu šūnām *in vitro* (*Aguer et al.*, 2015; *Koves et al.*, 2008). Interesanti, ka palielināta insulīna koncentrācija var pārvarēt garķēžu acilkarnitīnu izraisītos efektus un atgriezt Akt fosforilāciju līdz iepriekšējam līmenim. Tas izskaidro iepriekš aprakstīto, ka palielināta insulīna koncentrācija, reaģējot uz glikozes stimulāciju ēdušā stāvoklī, var pārvarēt augstas garķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas kavējošo iedarbību (*Consitt et al.*, 2016; *Soeters et al.*, 2009). Turklāt, lai atbalstītu pāreju no tukšas dūšas uz ēdušu stāvokli un pārvarētu īslaicīgu intramuskulāru insulīna nejutīgumu, garķēžu acilkarnitīni pastiprina insulīna izdalīšanos.

Tukšā dūšā zemais insulīna līmenis nespēj kavēt garķēžu acilkarnitīnu sintēzi, un augstā garķēžu acilkarnitīnu koncentrācija turpina inhibēt Akt ceļu. Tā rezultātā glikozes uzņemšana un metabolisms tiek kavēts, savukārt KPT1 katalizētā garķēžu acilkarnitīnu sintēze un sekojoša taukskābju oksidācija palielinās. Tāpēc iepriekš ir novērots, ka veselīem cilvēkiem pēc ilgstošas ēdiena neuzņemšanas intracelulārā garķēžu acilkarnitīnu koncentrācija ir lielāka nekā tukšā dūšā (*Soeters et al.*, 2009). Mūsu pētījumā gan palmitoilkarnitīna (C16) *bolus* ievadīšana, gan ilgstoša terapija palielināja C18 acilkarnitīnu saturu, liecinot, ka augsts garķēžu acilkarnitīnu daudzums bloķē insulīna izraisīto KPT1 kavēšanu un tādējādi stimulē vēl lielāku garķēžu acilkarnitīnu

koncentrācijas pieaugumu. Daudzi pētījumi liecina, ka acilkarnitīnu uzkrāšanās ir nepilnīgas taukskābju oksidācijas rezultāts (*Aguer et al.*, 2015; *McCain et al.*, 2015; *Samuel un Shulman*, 2012; *Schooneman et al.*, 2013). Tomēr mūsu rezultāti liecina arī to, ka noteiktos apstākļos, piemēram, tukšā dūšā, fizioloģiski nozīmīgā garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās ir KPT1 izraisītas pārprodukcijas rezultāts, pat ja tā ir saistīta ar augstu taukskābju oksidācijas ātrumu. Kopumā rezultāti parāda, ka garķēžu acilkarnitīni, kavējot Akt fosforilāciju, aktīvi piedalās insulīna signālceļa atgriezeniskās saites mehānisma nodrošināšanā un ir būtiski enerģijas metabolisma regulētāji.

Veseliem indivīdiem ēdušā stāvoklī palielināta insulīna koncentrācija inhibē garķēžu acilkarnitīnu veidošanos, palielinot malonil-koenzīma A daudzumu audos (*Schooneman et al.*, 2013; *Soeters et al.*, 2009). Iemesls tam ir insulīna izraisīta AMF-aktīveta proteīna kināzes kavēšana, kas rezultējas stimulētā acetil-koenzīma A karboksilāzes aktivitātē (malonil-koenzīma A sintēze) un kavētā malonil-koenzīma A dekarboksilāzes aktivitātē (malonil-koenzīma A noārdīšana, *Ruderman et al.*, 1999; *Valentine et al.*, 2014). Insulīna nespēja kavēt garķēžu acilkarnitīnu veidošanos ēdušā stāvoklī izraisa glikozes uzņemšanas un metabolisma traucējumus. Insulīna rezistences sākumposmā hiperinsulinēmija spēj kompensēt insulīna rezistenci, kā arī pārvarēt paaugstinātu garķēžu acilkarnitīnu līmeņu izraisītās sekas. Slimības turpmākajos posmos insulīna rezistence noved pie nespējas kavēt garķēžu acilkarnitīnu ražošanu, kā rezultātā paaugstinās garķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas, kas savukārt nepārtraukti inhibē Akt-mediēto signālceļu un izraisa glikozes tolerances traucējumu progresēšanu. Tādējādi garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās var paātrināt insulīna rezistences attīstību.

Ņemot vērā muskuļu metabolisma elastības nozīmi un spēju pārslēgties starp ēdušo un tukšas dūšas stāvokļiem, kopumā varam secināt, ka garķēžu acilkarnitīniem ir nozīme enerģijas metabolisma regulēšanā. Šie rezultāti

sasaista muskuļu audu insulīna rezistences veidošanos ar pārmērīgu garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanos un parāda, ka acilkarnitīni var izraisīt insulīna rezistenci.

3.2. Garķēžu acilkarnitīnu daudzuma samazināšana kā efektīva farmakoloģiska stratēģija diabēta attīstības kavēšanai

Šis pētījums parāda, ka garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās postprandiālajā stāvoklī ir 2. tipa diabēta iezīme. Tādēļ ar metil-GBB terapiju samazināta acilkarnitīnu satura gadījumā uzlabojās insulīna jutība un ievērojami samazinājās glikozes un insulīna līmeņi asinīs pelēm ar traucētu insulīna jutību un diabētu. Fiziskās aktivitātes un metil-GBB terapijas kombinācija uzlaboja insulīna jutību db/db pelēm. Tādējādi acilkarnitīnu līmeņa pazemināšanās ir pietiekama, lai atjaunotu insulīna jutību diabēta agrīnā stadijā, bet smaga diabēta gadījumā, lai sasniegtu būtisku antidiabētisku efektu, ir nepieciešama gan fiziskā aktivitāte, gan acilkarnitīnu daudzuma samazināšana ar metil-GBB.

Vairākos iepriekšējos pētījumos mēģināts saistīt acilkarnitīnus ar diabētu, tomēr acilkarnitīnu daudzuma saistība ar ēdušo vai tukšas dūšas stāvokli un ārstēšanas efektivitāti nav iepriekš skatīta (*Rodríguez-Gutiérrez et al.*, 2012; *Su et al.*, 2005; *Zhang et al.*, 2014). Šajā pētījumā acilkarnitīnu daudzums tika mērīts ēdušu un tukšas dūšas dzīvnieku plazmā un muskuļos, un rezultāti skaidri parādīja, ka galvenos acilkarnitīnu uzkrāšanās bojājumus 2. tipa diabēta gadījumā novēro postprandiālajā stāvoklī. Acilkarnitīnu uzkrāšanās ēdušā stāvoklī notiek insulīna rezistences rezultātā vai insulīna nespējas pietiekami samazināt acilkarnitīnu veidošanos dēļ. Savukārt, acilkarnitīni inhibē piruvāta un laktāta oksidēšanos, kā rezultātā pieaug glikozes un laktāta koncentrācijas asinīs un rodas bieži sastopamās hiperglikēmijas komplikācijas.

Iepriekšējie pētījumi jau ir parādījuši, ka taukskābju oksidācijas kavēšana varētu kalpot kā terapijas mērķis diabēta ārstēšanai. Šajā pētījumā 60-

kārtīga garķēžu acilkarnitīnu samazināšanās nerezultējās līdzīga apmēra taukskābju metabolisma ātruma kavēšanā skeleta muskulatūrā. Iepriekš tika norādīts, ka KPT1 inhibīcija un samazināts acilkarnitīnu daudzums pilnībā neatspoguļo taukskābju uzņemšanu vai oksidācijas ātrumu (*Liepinsh et al.*, 2013b, 2015; *Luiken et al.*, 2009). Metil-GBB izraisītie insulīna jutības uzlabojumi galvenokārt ir saistīti ar acilkarnitīnu daudzuma samazināšanos. Turklāt tas liecina, ka muskuļos metil-GBB samazina tikai acilkarnitīnu pārprodukciju, tādējādi līdzsvarojot acilkarnitīnu sintēzi un izmantošanu. Turklāt acilkarnitīnu daudzuma ievērojamais samazinājums tikai daļēji atjauno jutību pret insulīnu, un papildus uzlabojumi varētu būt iespējami, izmantojot citus mehānismus, piemēram, taukskābju oksidācijas kavēšanu.

Klīniskos pētījumos ir parādīts, ka fiziskās aktivitātes ir svarīgas diabēta profilaksei un efektīvai terapijai (*Balducci et al.*, 2014). Tomēr šīs stratēģijas īstenošana klīniskajā praksē ne vienmēr ir devusi gaidītos rezultātus (*De Feo un Schwarz*, 2013). Šajā pētījumā zemas intensitātes fiziskā aktivitāte bija labvēlīga *db/db* pelēm. Augstākas intensitātes fiziskās aktivitātes sniedz lielāku labumu diabēta ārstēšanā, tomēr tās arī palielina traumu un kardiovaskulāro komplikāciju risku (*Balducci et al.*, 2014). Līdz ar to mērenas intensitātes fiziskās aktivitātes, piemēram, staigāšana, varētu nodrošināt vislabāko vispārējo ieguvumu veselībai pacientiem ar diabētu. Papildus uzlabojumus varētu panākt ar farmakoloģisku terapiju, kas uzlabotu fizisko aktivitāšu izraisīto pretdiabētisko efektu. Pacientiem ar diabētu, pievienojot viņu fiziskās aktivitātes režīmam papildus 1000 soļus dienā, var samazināt glikozes līmeni asinīs par 1,6 mM divu gadu laikā (*Tudor-Locke un Bassett*, 2004). Mūsu eksperimentā insulīna jutības uzlabošanās un 4 mM glikozes līmeņa samazināšanās postprandiālajā stāvoklī *db/db* pelēm tika panākta, liekot pelēm staigāt papildus 3600 soļus dienā darba dienās. Ar kombinētu terapiju ēdušā stāvoklī tika sasniegts papildus samazinājums glikozes koncentrācijā un

nozīmīgs insulīna jutības uzlabojums. Papildus tam metil-GBB iepriekš novērotās kardioprotektīvās īpašības var samazināt iespējamās išēmijas izraisītās kardiovaskulārās komplikācijas (*Liepinsh et al.*, 2015). Tādējādi metil-GBB farmakoloģiska acilkarnitīnu līmeņa samazināšana kopā ar mērenām fiziskām aktivitātēm ir īpaši lietderīga pacientiem ar diabētu.

3.3. Garķēžu acilkarnitīnu loma diabēta kardiovaskulāro komplikāciju attīstībā

Šis pētījums parāda, ka garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās mitohondrijos nosaka išēmijas-reperfūzijas izraisītos bojājumus. Acilkarnitīnu uzkrāšanās išēmijas laikā kavē oksidatīvo fosforilāciju sirds mitohondrijos, tādējādi izraisot mitohondriju membrānas hiperpolizāciju un stimulējot reaktīvo skābekļa savienojumu veidošanos. Farmakoloģiski metil-GBB terapijas izraisīts mitohondriju acilkarnitīnu daudzuma samazinājums samazina infarkta lielumu.

Acilkarnitīnu uzkrāšanās išēmijas laikā tika novērota jau apmēram pirms trīsdesmit gadiem (*Corr et al.*, 1984; *Ford et al.*, 1996; *Idell-Wenger et al.*, 1978; *Whitmer et al.*, 1978), tomēr šajā jautājumā vēl ir daudz neskaidrību. Parasti acilkarnitīnu daudzums ir atkarīgs gan no konkrētu taukskābju metabolītu sintēzes, gan no to izmantošanas ātrumiem. Līdz ar to taukskābju metabolītu pārprodukcija taukskābju metabolisma ceļā notiek stimulētas taukskābju plūsmas laikā vai to nepietiekamas izmantošanas mitohondrijos dēļ. Tādējādi tukšā dūšā acilkarnitīnu daudzums sirdīs audos ir līdz pat piecām reizēm augstāks nekā ēdušā stāvoklī (*Makrecka et al.*, 2014). Ņemot vērā to, ka badošanās ir fizioloģisks stāvoklis un neizraisa sirds mitohondriju bojājumus, vidēji 1,5–3 reizes lielāks taukskābju metabolītu pieaugums išēmijas laikā ir kaitīgs tikai dzīvniekiem tukšā dūšā vai badinātiem dzīvniekiem. Tāpat arī augstāks kardiovaskulāro slimību risks diabēta pacientiem (*Peters et al.*, 2015) varētu būt saistīts ar augstāku acilkarnitīnu daudzumu sirdī. Iepriekšējais

pētījums, kas parādīja, ka sirds išēmiskais bojājums ēdusā stāvoklī ir ievērojami mazāks nekā tukšā dūšā (*Liepinsh et al.*, 2014b), arī norādīja, ka taukskābju metabolītu uzkrāšanās vismaz daļēji nosaka sirds bojājumu apmēru išēmijā.

Gan acil-koenzīmi A, gan acilkarnitīni uzkrājas išēmijas laikā, bet acil-koenzīmi A iepriekš ir vērtēti kā nozīmīgākie taukskābju metabolīti, kas ir atbildīgi par mitohondriju bojājumiem (*Drosatos un Schulze*, 2013; *Li et al.*, 2010). Tomēr iepriekšējā pētījumā mēs parādījām, ka tieši fizioloģiskais acilkarnitīnu daudzums, bet ne acil-koenzīmu A daudzums, ir pietiekams, lai mitohondrijos inhibētu piruvāta un laktāta metabolismu (*Makrecka et al.*, 2014). Savukārt, šajā pētījumā sirds perfūzijas buferšķīduma papildināšana ar palmitoilkarnitīnu izraisīja acilkarnitīnu daudzuma divkārtu palielināšanos un ievērojami palielināja infarkta lielumu. Tādējādi mūsu rezultāti liecina, ka acilkarnitīni ir galvenie taukskābju metabolīti, kas izraisa išēmijas-reperfūzijas bojājumu.

Līdz šim tikai daži pētījumi ir pievērsušies mitohondriju bojājumu mehānismiem, ko izraisa garķēžu acilkarnitīni (*Korge et al.*, 2003; *Siliprandi et al.*, 1992; *Tominaga et al.*, 2008). Tika izteikts viedoklis, ka oksidatīvās fosforilācijas, mitohondriju membrānas depolarizācijas, mitohondriju caurlaidības poras atvēršana, reaktīvo skābekļa savienojumu veidošanās veicināšana un atjūgšana ir mehānismi, ar kuru palīdzību taukskābes un to metabolīti izraisa mitohondriju bojājumus un sekojošus šūnu bojājumus. Pētījumā, kurā izmantoja permeabilizētus izolētus žurku sirds kambara miocītus, tika parādīts, ka palmitoilkarnitīna izraisītu mitohondriju bojājumu mehānisms ir atšķirīgs zemu un augstu acilkarnitīna koncentrāciju gadījumā (*Tominaga et al.*, 2008). Šī pētījuma svarīgākais novērojums ir parādītā palmitoilkarnitīna uzkrāšanās vieta mitohondrijos. Rezultāti liek domāt, ka acilkarnitīni, kas veidojušies vai nu KPT1 katalizētās sintēzes ceļā, vai transportēti no citosola, var uzkrāties starp mitohondriju membrānām un uz

mitohondriju iekšējās membrānas. Zināmā mērā mitohondrijus varētu aizsargāt taukskābes saistošie proteīni, kas lokalizējas uz mitohondriju membrānām, tomēr acilkarnitīnu pārprodukcija palielina nesaistīto acilkarnitīnu koncentrāciju starpmembrānu telpā un attiecīgi arī to kaitīgo iedarbību. Kopumā var secināt, ka garķēžu acilkarnitīni inhibē oksidatīvo fosforilāciju un tādējādi izraisa protonu uzkrāšanos un mitohondriju membrānas hiperpolarizāciju, kas stimulē reverso protonu plūsmu caur elpošanas ķēdi un sekojošu reaktīvo skābekļa savienojumu veidošanos.

Acilkarnitīnu sintēzes kavēšana ir izvirzīta kā kardiiovaskulārs zāļu mērķis (*Keung et al.*, 2013; *Liepinsh et al.*, 2013b, 2015). KPT1 tiek uzskatīts par svarīgu enzīmu, kas ierobežo taukskābju transportu mitohondrijos, un bieži vien tieši vai netieši tiek izmantots farmakoloģiskai ietekmēšanai ar mērķi kavēt taukskābju metabolismu un veicināt glikozes oksidāciju. Ir skaidrs, ka, kavējot taukskābju metabolisma ceļu augšup no KPT1, tiktu kavēta arī acilkarnitīnu sintēze, un vismaz daļa no taukskābju plūsmas kavēšanas aizsargmehānisma varētu būt saistīta ar samazinātu acilkarnitīnu daudzumu. Ir parādīts, ka, samazinot acilkarnitīnu daudzumu sirdī un mitohondrijos un ierobežojot garķēžu taukskābju oksidāciju un tādējādi stimulējot glikozes oksidāciju, metil-GBB terapija ir efektīvs līdzeklis infarkta izmēra samazināšanai pēc išēmijas-reperfūzijas bojājuma (*Liepinsh et al.*, 2015). Arī šajā pētījumā metil-GBB ievadīšana pilnībā novērsa acilkarnitīnu uzkrāšanos un samazināja infarkta izmēru. Tādēļ acilkarnitīnu daudzuma farmakoloģiskas samazināšanas galvenā priekšrocība varētu būt tiešā bojājuma samazināšana, ko izraisa garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās mitohondrijos išēmiskā sirdī.

3.4. Metil-GBB terapija kavē aterosklerozes attīstību, samazinot garķēžu acilkarnitīnu līmeni

Šajā pētījumā tika novērtēta metil-GBB terapijas izraisītās garķēžu acilkarnitīnu līmeņu samazināšanas ietekme uz aterosklerozes attīstību *apoE*^{-/-} pelēm. Mēs noskaidrojām, ka metil-GBB ievadīšana būtiski mazināja aterosklerotisko bojājumu attīstību visā aortā un ievērojami samazināja acilkarnitīnu daudzumu aortas audos.

Aterosklerozes gadījumā ir novēroti asinsvadu iekaisuma procesi, kuros ir iesaistītas arī imūnsistēmas šūnas (Libby, 2012). Ir arī parādīts, ka acilkarnitīni uzkrājas aortu audos aterosklerotisko bojājumu veidošanās laikā (Gillies un Bell, 1976). Iepriekšējā pētījumā parādīja, ka acilkarnitīni izraisa makrofāgu aktivāciju un veicina ciklooksigenāzes 2 ekspresiju un TNF α un citu iekaisuma citokīnu sekrēciju (Rutkowski et al., 2014). Turklāt ir parādīts, ka palmitoilkarnitīns traucē asinsvadu endotēlija darbību un samazina slāpekļa oksīda sintēzi (Inoue et al., 1994), kas varētu veicināt aterosklerozes progresēšanu. Analizējot peles aortas audu ekstraktus, tika konstatēts, ka metil-GBB ievadīšana ievērojami samazināja īso, vidējo un garo ķēžu acilkarnitīnu daudzumu. Tādējādi metil-GBB anti-aterosklerotiskais mehānisms varētu ietvert imūnsistēmas šūnu infiltrāciju aterosklerotiskajos bojājumos. Iepriekšminēto pieņēmumu atbalsta iegūtie aortas sīnusa aterosklerotisko bojājumu analīzes rezultāti, kas parādīja, ka metil-GBB terapija samazina makrofāgu un monocītu uzkrāšanos aterosklerotiskajos bojājumos. Turklāt metil-GBB ievadīšana būtiski samazināja TNF α koncentrāciju plazmā, kas varētu būt aktivēto makrofāgu izraisītas TNF α sekrēcijas samazināšanās rezultāts. Tādējādi šis pētījums parāda, ka metil-GBB kavē aterosklerozes attīstību, samazinot makrofāgu un monocītu infiltrāciju aortas sīnusa aterosklerotiskajos bojājumos, samazinot iekaisuma citokīnu sekrēciju un, iespējams, samazinot acilkarnitīnu kaitīgo ietekmi uz asinsvadu endotēliju.

Vieni no aterosklerozes attīstības riska faktoriem ir postprandiālā hipertrigliceridēmija un paaugstināts zema blīvuma lipoproteīnu līmenis (Fujioka un Ishikawa, 2009; Odden *et al.*, 2014). Šajā pētījumā metil-GBB terapija izraisīja triglicerīdu koncentrācijas samazināšanos, līdz ar to šis triglicerīdu koncentrācijas samazinājums varētu kavēt aterosklerozes attīstību. Metil-GBB ievadīšana samazināja arī zema blīvuma lipoproteīnu holesterīna koncentrāciju, bet tomēr metil-GBB ietekme uz acilkarnitīnu un triglicerīdu līmeni bija ievērojami izteiktāka nekā uz plazmas holesterīna koncentrāciju.

Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka farmakoloģiska terapija ar L-karnitīna koncentrāciju pazeminošām vielām (D-karnitīns un no pivalāta atvasināti savienojumi) vai proteīnu ģenētiskās mutācijas, kas ir saistītas ar L-karnitīna homeostāzi un sintēzi, izraisa dažādu orgānu funkcionālās darbības traucējumus (Broderick, 2006; Magoulas un El-Hattab, 2012). Mūsu eksperimentā *apoE*^{-/-} pelēm ārstēšana ar metil-GBB ievērojami samazināja L-karnitīna līmeni, bet mēs neredzējām nekādas muskuļu vājuma pazīmes vai ALAT un ASAT līmeņu paaugstināšanos. Iepriekš tika parādīts, ka 2 nedēļu ilgā metil-GBB terapija devā 20 mg/kg samazināja L-karnitīna daudzumu sirds audos par 95%, bet kreisā kambara sistoliskā funkcija un anatomiskie parametri nemainījās (Liepinsh *et al.*, 2015). Tādējādi mēs secinām, ka L-karnitīna līmeņa samazināšanās nav galvenais faktors, kas nosaka orgānu disfunkcijas attīstību, un tas drīzāk varētu būt saistāms ar pētāmās vielas farmakoloģiskajām vai toksiskajām īpašībām. Šo pieņēmumu apstiprina pētījums, kas parādīja, ka terapija ar nātrija pivalātu samazināja L-karnitīna daudzumu sirds audos tikai par 37% un vienlaicīgi kavēja palmitoil-koenzīma A metabolismu, kā arī izraisīja piruvāta metabolisma traucējumus (Kuka *et al.*, 2012b). Tādējādi varētu tikt izraisīta ATF līmeņa samazināšanās un kambaru disfunkcijas attīstība, kas iepriekš tika novērota pēc ilgstošas pivalāta ievadīšanas (Broderick, 2006). Gluži pretēji, ārstēšana ar metil-GBB ne tikai ierobežo

taukskābju metabolismu, bet arī veicina glikozes metabolismu sirds audos (*Liepinsh et al.*, 2015), tādējādi saglabājot atbilstošu ATF līmeni un sirds darbību. Kopumā, tā kā *apoE^{-/-}* peļu modelis atspoguļo asinsvadu bojājumu rašanos cilvēkos (*Nakashima et al.*, 1994), varam izvirzīt hipotēzi, ka metil-GBB terapija varētu būt efektīva arī aterosklerozes attīstības kavēšanai klīnikā.

Šis pētījums kopumā parāda, ka garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās, inhibējot Akt fosforilāciju un glikozes metabolismu, paātrina hiperglikēmiju un hiperinsulinēmiju, kas izraisa vielmaiņas neelastību un insulīna rezistenci. Garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās išēmijas laikā izraisa sirds mitohondriju bojājumus, norādot, ka garķēžu acilkarnitīni ir galvenie taukskābju metabolīti, kas izraisa ar išēmiju-reperfūziju saistītos bojājumus. Garķēžu acilkarnitīni piedalās dažādos iekaisuma procesos, ieskaitot TNF α un citu iekaisuma citokīnu ekspresiju un sekrēciju, un acilkarnitīnu uzkrāšanos novēro aterosklerotiskajos bojājumos. Mūsu dati par paaugstinātu acilkarnitīnu daudzuma kaitīgo ietekmi un acilkarnitīnu līmeņa pazemināšanu ar metil-GBB terapiju liecina, ka acilkarnitīnu veidošanās kavēšana mitohondrijos ir nozīmīgs kardiometabolo zāļu mērķis.

Noslēgumā varam secināt, ka farmakoloģiski izraisītais garķēžu acilkarnitīnu daudzuma samazinājums ar metil-GBB uzlabo glikozes metabolismu un audu jutību pret insulīnu, aizsargā sirds mitohondrijus pret išēmiju-reperfūzijas bojājumu un kavē aterosklerozes attīstību un tādējādi metil-GBB terapija ir efektīva stratēģija diabēta un tā komplikāciju ārstēšanai.

4. SECINĀJUMI

1. Garķēžu acilkarnitīnu uzkrāšanās postprandiālā stāvoklī ierobežo metabolisma elastīgumu un veicina hiperglikēmijas un hiperinsulinēmijas veidošanos. Akt fosforilācijas un ar to saistītā insulīna signālceļa kavēšana ir svarīgs garķēžu acilkarnitīnu darbības mehānisms.
2. Metil-GBB terapijas izraisītā garķēžu acilkarnitīnu līmeņa samazināšanās uzlabo insulīna jutību un samazina glikozes un insulīna līmeņus eksperimentālos insulīna rezistences un diabēta modeļos.
3. Garķēžu acilkarnitīni ir galvenie taukskābju metabolīti, kuri nosaka išēmijas-reperfūzijas izraisītos bojājumus, kavējot oksidatīvo fosforilēšanu un sekojoši izsaucot mitohondriju membrānas hiperpolarizāciju un stimulējot reaktīvo skābekļa savienojumu veidošanos sirds mitohondrijos. Metil-GBB terapija pasargā sirds mitohondrijus no acilkarnitīnu uzkrāšanās izraisītiem bojājumiem išēmijas-reperfūzijas laikā.
4. Metil-GBB terapija kavē aterosklerozes attīstību *apoE^{-/-}* pelēs. Metil-GBB terapijas pretaterosklerozes mehānisms ir saistīts ar garķēžu acilkarnitīnu daudzuma samazinājumu vaskulārajos audos, kā arī makrofāgu un monocītu infiltrācijas kavēšanu aterosklerotiskajās pangās.

DARBA APROBĀCIJA – PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

Publikācijas recenzējamās starptautiskos izdevumos:

1. Liepinsh, E., Makrečka-Kuka, M., Makarova, E., Volska, K., Vilks, K., Sevostjanovs, E., et al. 2017. Acute and long-term administration of palmitoylcarnitine induces muscle-specific insulin resistance in mice. *BioFactors*. 43(5), 718–730.
2. Liepinsh, E., Makrečka-Kuka, M., Makarova, E., Volska, K., Svalbe, B., Sevostjanovs, E., et al. 2016. Decreased acylcarnitine content improves insulin sensitivity in experimental mice models of insulin resistance. *Pharmacol Res*. 113(Pt B), 788–795.
3. Liepinsh, E., Makrečka-Kuka, M., Volska, K., Kuka, J., Makarova, E., Antone, U., et al. 2016. Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochem J*. 473(9), 1191–1202.
4. Vilskersts, R., Kuka, J., Liepinsh, E., Makrečka-Kuka, M., Volska, K., Makarova, E., et al. 2015. Methyl- γ -butyrobetaine decreases levels of acylcarnitines and attenuates the development of atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 72, 101–107.

Ziņojumi un tēzes starptautiskās konferencēs:

1. Volska, K., Liepinsh, E., Makarova, E., Makrečka-Kuka, M., Kuka, J., Dambrova, M. 2018. The mechanisms of long-chain acylcarnitine accumulation during ischemia, 13th Conference on Mitochondrial Physiology: The role of mitochondria in health, disease and drug discovery, Jurmala, Latvia, 18–21 Sep 2018, Book of Abstracts, p. 22.
2. Volska, K., Makrečka-Kuka, M., Makarova, E., Kuka, J., Vilskersts, R., Liepinsh, E., Dambrova, M. 2017. Protective effects of pharmacologically decreased long-chain acylcarnitine contents in the preclinical models of

- diabetes and its complications, 2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets (ICP2017RIGA), Riga, Latvia, October 19–20, 2017. doi:10.25006/IA.5.S2-A2.28
3. Vilks, K., Volska, K., Makarova, E., Makrecka-Kuka, M., Dambrova, M., Liepinsh, E. 2017. Impact of long-chain acylcarnitines on muscle insulin sensitivity and interaction with Akt-related insulin signalling pathway, 2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets (ICP2017RIGA), Riga, Latvia, October 19–20, 2017. doi:10.25006/IA.5.S2-A2.20
 4. Vilks, K., Volska, K., Makarova, E., Makrecka-Kuka, M., Dambrova, M., Liepinsh, E. 2017. Elevated acylcarnitine levels induce muscle insulin insensitivity through the interaction with Akt-related insulin signalling pathway, 42nd FEBS Congress – From molecules to cells and back, Jerusalem, Israel, September 10, 2017, p.5.4-013.
 5. Vilks, K., Volska, K., Makarova, E., Makrecka-Kuka, M., Dambrova, M., Liepinsh, E. 2017. Palmitoylcarnitine interacts with Akt-related insulin signalling pathway and induces muscle-specific insulin resistance. *Latvijas Universitātes 75. konference, Molekulārās bioloģijas sekcija*, Rīga, Latvija, 2017. gada 31. janvāris.
 6. Makarova, E., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Vilks, K., Grinberga, S., Dambrova, M., Liepinsh, E. 2017. The impaired change in plasma long-chain acylcarnitine level as a marker of insulin resistance in *db/db* and high fat diet-fed mice, 50th Miami Winter Symposium, Diabetes: Today's Research – Tomorrow's Therapies, Miami, USA, January 22–25, 2017, p.028.
 7. Volska, K., Liepinsh, E., Makarova, E., Makrecka-Kuka, M., Kuka, J., Dambrova, M. 2016. Mitochondrial damage induced by accumulation of acyl-coenzymes A and acylcarnitines during ischemia. *FEBS Workshop*

- “Coenzyme A and its derivatives in health and disease”, Marseille, France, August 23–27, 2016, Book of Abstracts, p. 51.
8. Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Kuka, J., Dambrova, M. Long chain acylcarnitines: new target to prevent ischemia-reperfusion induced damage in heart mitochondria. 2016. *Mitochondrial Medicine: Developing New Treatments for Mitochondrial Disease*, Hinxtion, Cambridge, UK, May 4–6, 2016, Book of Abstracts, p. 58.
 9. Dambrova, M., Volska, K., Makrecka-Kuka, M., Makarova, E., Kuka, J., Vilskersts, R., Liepinsh, E. 2016. Cardioprotective effects of pharmacologically decreased long-chain acylcarnitine contents in experimental models of myocardial infarction, atherosclerosis, and diabetes, *7th European Congress of Pharmacology*, Istanbul, Turkey, June 26–30, 2016, Book of Abstracts, p. 81–82.
 10. Dambrova, M., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Sevostjanovs, E., Konrade, I., Liepinsh, E. 2015. Acyl-carnitines induce insulin resistance in high fat diet-fed and diabetic *db/db* mice. *51st EASD Annual Meeting*, Stockholm, Sweden, September 14–18, 2015, Book of Abstracts, p. 606.
 11. Volska, K., Makrecka-Kuka, M., Makarova, E., Svalbe, B., Sevostjanovs, E., Liepinsh, E., Dambrova, M. 2015. Decreased acylcarnitine content and increased physical activity improve insulin sensitivity in *db/db* mice. *Drug Discovery conference*, Riga, Latvia, August 27–29, 2015, Book of Abstracts, p. 160.
 12. Vilskersts, R., Kuka, J., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Makarova, E., Liepinsh, E., Dambrova, M. 2015. Attenuation of atherosclerosis development by targeting acylcarnitine pools. *Drug Discovery conference*, Riga, Latvia, August 27–29, 2015, Book of Abstracts, p. 37.

13. Makrecka-Kuka, M., Voļska, K., Kuka, J., Dambrova, M., Liepiņš, E. 2015. Acylcarnitines in mitochondrial bioenergetics. *Drug Discovery conference*, Riga, Latvia, August 27–29, 2015, Book of Abstracts, p. 46.
14. Vilskersts, R., Kuka, J., Makrecka-Kuka, M., Voļska, K., Dambrova, M., Liepiņš, E. 2015. Targeting acylcarnitine content on vascular tissue to attenuate development of atherosclerosis. *Annual Congress of The European Atherosclerosis Society*. Glasgow, UK, March 21–25, 2015.

Ziņojumi un tēzes vietēja mēroga konferencēs:

1. Konrāde, I., Makarova, E., Tonne, I., Dambrova, G., Kalere, I., Vilks, K., Voļska, K., Dambrova, M. 2017. Acilkarnitīnu koncentrācijas mērījumi – jauna diagnostikas metode insulīna rezistences noteikšanai, *RSU 2017. gada zinātniskā konference*, Sekc. “Hroniskās slimības, terapiju algoritmi, jaunas ārstniecības metodes” [Rīga, Latvija, 6. un 7. aprīlis, 2017. gads]: Tēzes, 274. lpp.
2. Voļska, K., Kūka, J., Makrecka-Kūka, M., Alonso Garcia-Mauriño, M., Dambrova, M. 2016. Garķēžu acilkarnitīnu nozīme sirds išēmijas-reperfūzijas bojājuma attīstībā, *RSU 2016. gada zinātniskā konference* [Rīga, Latvija, 17.–18. marts, 2016]: Tēzes, 65. lpp.
3. Voļska, K., Makrecka-Kūka, M., Kūka, J., Dambrova, M., Liepiņš, E. 2015. Garķēžu acilkarnitīnu loma insulīna rezistences attīstībā: pētījumi eksperimentālajos modeļos. *RSU 2015. gada zinātniskā konference*, Sekc. “Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte” [Rīga, Latvija, 26.–27. marts, 2015]: Tēzes, 64. lpp.
4. Vilšķērsts, R., Kūka, J., Makrecka-Kūka, M., Voļska, K., Liepiņš, E., Dambrova, M. 2015. Metil- γ -butirobetaīns samazina acilkarnitīnu līmeni un aizkavē aterosklerozes attīstību. *RSU 2015. gada zinātniskā konference*, Sekc. “Latvijas iedzīvotāju veselību apdraudošo eksogēno un endogēno faktoru izpēte” [Rīga, Latvija, 26.–27. marts, 2015]: Tēzes, 62. lpp.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Adams, S. H., Hoppel, C. L., Lok, K. H., Zhao, L., Wong, S. W., et al. 2009. Plasma Acylcarnitine Profiles Suggest Incomplete Long-Chain Fatty Acid - Oxidation and Altered Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Type 2 Diabetic African-American Women. *Journal of Nutrition*. 139(6), 1073–1081.
2. Aguer, C., McCoin, C. S., Knotts, T. A., Thrush, A. B., Ono-Moore, K., et al. 2015. Acylcarnitines: Potential Implications for Skeletal Muscle Insulin Resistance. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 29(1), 336–345.
3. Angel, I., Bidet, S., and Langer, S. Z. 1988. Pharmacological Characterization of the Hyperglycemia Induced by Alpha-2 Adrenoceptor Agonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 246(3), 1098–1103.
4. Balducci, S., Sacchetti, M., Haxhi, J., Orlando, G., D'Errico, V., et al. 2014. Physical Exercise as Therapy for Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 30(S1), 13–23.
5. Blachnio-Zabielska, A. U., Koutsari, C., and Jensen, M. D. 2011. Measuring Long-Chain Acyl-Coenzyme A Concentrations and Enrichment Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with Selected Reaction Monitoring. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 25(15), 2223–2230.
6. Broderick, T. L. 2006. Hypocarnitinaemia Induced by Sodium Pivalate in the Rat Is Associated with Left Ventricular Dysfunction and Impaired Energy Metabolism. *Drugs in R & D*. 7(3), 153–161.
7. Consitt, L. A., Koves, T. R., Muoio, D. M., Nakazawa, M., Newton, C. A., et al. 2016. Plasma Acylcarnitines during Insulin Stimulation in Humans Are Reflective of Age-Related Metabolic Dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 479(4), 868–874.
8. Corr, P. B., Gross, R. W., and Sobel, B. E. 1984. Amphipathic Metabolites and Membrane Dysfunction in Ischemic Myocardium. *Circulation Research*. 55(2), 135–154.
9. Dambrova, M., Cirule, H., Svalbe, B., Zvejniece, L., Pugovichs, O., et al. 2008. Effect of Inhibiting Carnitine Biosynthesis on Male Rat Sexual Performance. *Physiology & Behavior*. 95(3), 341–347.
10. Dambrova, M., Skapare-Makarova, E., Konrade, I., Pugovics, O., Grinberga, S., et al. 2013. Meldonium Decreases the Diet-Increased Plasma Levels of Trimethylamine N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 53(10), 1095–1098.
11. Defronzo, R. A. 2009. Banting Lecture. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 58(4), 773–795.
12. Drosatos, K. and Schulze, P. C. 2013. Cardiac Lipotoxicity: Molecular Pathways and Therapeutic Implications. *Current Heart Failure Reports*. 10(2), 109–121.
13. De Feo, P. and Schwarz, P. 2013. Is Physical Exercise a Core Therapeutical Element for Most Patients with Type 2 Diabetes? *Diabetes Care*. 36 (Suppl. 2) S149–154.

14. Ford, D. A., Han, X., Horner, C. C., and Gross, R. W. 1996. Accumulation of Unsaturated Acylcarnitine Molecular Species During Acute Myocardial Ischemia: Metabolic Compartmentalization of Products of Fatty Acyl Chain Elongation in the Acylcarnitine Pool. *Biochemistry*. 35(24), 7903–7909.
15. Fujioka, Y. and Ishikawa, Y. 2009. Remnant Lipoproteins As Strong Key Particles to Atherogenesis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 16(3):145–154.
16. Gillies, P. J. and Bell, F. P. 1976. Arterial and Plasma Carnitine Levels in Rabbits: Influence of Age and Dietary Cholesterol. *Experimental and Molecular Pathology*. 25(3), 402–411.
17. Hoyer, F. F., Albrecht, L., Nickenig, G., and Müller, C. 2012. Selective Inhibition of Leukotriene Receptor BLT-2 Reduces Vascular Oxidative Stress and Improves Endothelial Function in ApoE^{-/-} Mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 359(1–2), 25–31.
18. Idell-Wenger, J. A., Grotyohann, L. W., and Neely, J. R. 1978. Coenzyme A and Carnitine Distribution in Normal and Ischemic Hearts. *The Journal of Biological Chemistry*. 253(12), 4310–4318.
19. Inoue, N., Hirata, K. -i., Akita, H., and Yokoyama, M. 1994. Palmitoyl-L-Carnitine Modifies the Function of Vascular Endothelium. *Cardiovascular Research*. 28(1), 129–134.
20. Kerner, W., Brückel, J., and German Diabetes Association. 2014. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 122(07), 384–386.
21. Keung, W., Ussher, J. R., Jaswal, J. S., Raubenheimer, M., Lam, V. H. M., et al. 2013. Inhibition of Carnitine Palmitoyltransferase-1 Activity Alleviates Insulin Resistance in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*. 62(3), 711–720.
22. Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G., et al. 2010. Animal Research: Reporting in Vivo Experiments: The ARRIVE Guidelines. *British Journal of Pharmacology*. 160(7), 1577–1579.
23. Korge, P., Honda, H. M., and Weiss, J. N. 2003. Effects of Fatty Acids in Isolated Mitochondria: Implications for Ischemic Injury and Cardioprotection. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 285(1), H259–269.
24. Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., Slentz, D., Mosedale, M., et al. 2008. Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metabolism*. 7(1), 45–56.
25. Kuka, J., Makrecka, M., Grinberga, S., Pugovics, O., Liepinsh, E., et al. 2012. A Short-Term High-Dose Administration of Sodium Pivalate Impairs Pyruvate Metabolism without Affecting Cardiac Function. *Cardiovascular Toxicology*. 12(4), 298–303.
26. Kuka, J., Vilskersts, R., Cirule, H., Makrecka, M., Pugovics, O., et al. 2012. The Cardioprotective Effect of Mildronate is Diminished After Co-Treatment with l-Carnitine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 17(2), 215–222.
27. Li, L. O., Klett, E. L., and Coleman, R. A. 2010. Acyl-CoA Synthesis, Lipid Metabolism and Lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1801(3), 246–251.
28. Libby, P. 2012. Inflammation in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and*

- Vascular Biology*. 32(9), 2045–2051.
29. Liepinsh, E., Kuka, J., and Dambrova, M. 2013. Troubleshooting Digital Macro Photography for Image Acquisition and the Analysis of Biological Samples. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 67(2), 98–106.
 30. Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Kuka, J., Vilskersts, R., Makarova, E., et al. 2015. Inhibition of L-Carnitine Biosynthesis and Transport by Methyl- γ -Butyrobetaine Decreases Fatty Acid Oxidation and Protects against Myocardial Infarction. *British Journal of Pharmacology*. 172(5), 1319–1332.
 31. Liepinsh, E., Makrecka, M., Kuka, J., Cirule, H., Makarova, E., et al. 2014. Selective Inhibition of OCTN2 is More Effective than Inhibition of Gamma-Butyrobetaine Dioxygenase to Decrease the Availability of l-Carnitine and to Reduce Myocardial Infarct Size. *Pharmacological Research*. 85, 33–38.
 32. Liepinsh, E., Makrecka, M., Kuka, J., Makarova, E., Vilskersts, R., et al. 2014. The Heart Is Better Protected against Myocardial Infarction in the Fed State Compared to the Fasted State. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 63(1), 127–136.
 33. Liepinsh, E., Skapare, E., Kuka, J., Makrecka, M., Cirule, H., et al. 2013. Activated Peroxisomal Fatty Acid Metabolism Improves Cardiac Recovery in Ischemia-Reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 386(6), 541–550.
 34. Luiken, J. J. F. P., Niessen, H. E. C., Coort, S. L. M., Hoebbers, N., Coumans, W. A., et al. 2009. Etomoxir-Induced Partial Carnitine Palmitoyltransferase-I (CPT-I) Inhibition in Vivo Does Not Alter Cardiac Long-Chain Fatty Acid Uptake and Oxidation Rates. *The Biochemical Journal*. 419(2), 447–455.
 35. Magoulas, P. L. and El-Hattab, A. W. 2012. Systemic Primary Carnitine Deficiency: An Overview of Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 7(1), 68.
 36. Makrecka-Kuka, M., Krumschnabel, G., and Gnaiger, E. 2015. High-Resolution Respirometry for Simultaneous Measurement of Oxygen and Hydrogen Peroxide Fluxes in Permeabilized Cells, Tissue Homogenate and Isolated Mitochondria. *Biomolecules*. 5(3), 1319–1338.
 37. Makrecka, M., Kuka, J., Volska, K., Antone, U., Sevostjanovs, E., et al. 2014. Long-Chain Acylcarnitine Content Determines the Pattern of Energy Metabolism in Cardiac Mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 395(1–2).
 38. Martins, A. R., Nachbar, R. T., Gorjao, R., Vinolo, M. A., Festuccia, W. T., et al. 2012. Mechanisms Underlying Skeletal Muscle Insulin Resistance Induced by Fatty Acids: Importance of the Mitochondrial Function. *Lipids in Health and Disease*. 11(1), 30.
 39. McCoin, C. S., Knotts, T. A., and Adams, S. H. 2015. Acylcarnitines--Old Actors Auditioning for New Roles in Metabolic Physiology. *Nature Reviews. Endocrinology*. 11(10), 617–625.
 40. McGrath, J., Drummond, G., McLachlan, E., Kilkenny, C., and Wainwright, C. 2010. Guidelines for Reporting Experiments Involving Animals: The ARRIVE Guidelines. *British Journal of Pharmacology*. 160(7), 1573–1576.
 41. Mihalik, S. J., Goodpaster, B. H., Kelley, D. E., Chace, D. H., Vockley, J., et al. 2010. Increased Levels of Plasma Acylcarnitines in Obesity and Type 2 Diabetes and Identification of a Marker of Glucolipototoxicity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 18(9), 1695–1700.

42. Moller, D. E. 2001. New Drug Targets for Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome. *Nature*. 414(6865), 821–827.
43. Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., and Ross, R. 1994. ApoE-Deficient Mice Develop Lesions of All Phases of Atherosclerosis throughout the Arterial Tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 14(1).
44. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). 2016. Worldwide Trends in Diabetes since 1980: A Pooled Analysis of 751 Population-Based Studies with 4.4 Million Participants. *Lancet (London, England)*. 387(10027), 1513–1530.
45. Odden, M. C., Shlipak, M. G., Whitson, H. E., Katz, R., Kearney, P. M., et al. 2014. Risk Factors for Cardiovascular Disease across the Spectrum of Older Age: The Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 237(1), 336–342.
46. Peters, S. A. E., Huxley, R. R., Sattar, N., and Woodward, M. 2015. Sex Differences in the Excess Risk of Cardiovascular Diseases Associated with Type 2 Diabetes: Potential Explanations and Clinical Implications. *Current Cardiovascular Risk Reports*. 9(7), 36.
47. Rodríguez-Gutiérrez, R., Lavalle-González, F. J., Martínez-Garza, L. E., Landeros-Olvera, E., López-Alvarenga, J. C., et al. 2012. Impact of an Exercise Program on Acylcarnitines in Obesity: A Prospective Controlled Study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 9(1), 22.
48. Ruderman, N. B., Saha, A. K., Vavvas, D., and Witters, L. A. 1999. Malonyl-CoA, Fuel Sensing, and Insulin Resistance. *The American Journal of Physiology*. 276(1), E1–18.
49. Rutkowsky, J. M., Knotts, T. A., Ono-Moore, K. D., McCoin, C. S., Huang, S., et al. 2014. Acylcarnitines Activate Proinflammatory Signaling Pathways. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*. 306(12).
50. Ryu, S.-Y., Beutner, G., Kinnally, K. W., Dirksen, R. T., and Sheu, S.-S. 2011. Single Channel Characterization of the Mitochondrial Ryanodine Receptor in Heart Mitoplasts. *Journal of Biological Chemistry*. 286(24), 21324–21329.
51. Saha, J. K., Xia, J., Grondin, J. M., Engle, S. K., and Jakubowski, J. A. 2005. Acute Hyperglycemia Induced by Ketamine/Xylazine Anesthesia in Rats: Mechanisms and Implications for Preclinical Models. *Experimental Biology and Medicine*. 230(10), 777–784.
52. Samuel, V. T. and Shulman, G. I. 2012. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*. 148(5), 852–871.
53. Schooneman, M. G., Vaz, F. M., Houten, S. M., and Soeters, M. R. 2013. Acylcarnitines: Reflecting or Inflicting Insulin Resistance? *Diabetes*. 62(1), 1–8.
54. Siliprandi, D., Biban, C., Testa, S., Toninello, A., and Siliprandi, N. 1992. Effects of Palmitoyl CoA and Palmitoyl Carnitine on the Membrane Potential and Mg²⁺ Content of Rat Heart Mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 116(1–2), 117–123.
55. Soeters, M. R., Sauerwein, H. P., Duran, M., Wanders, R. J., Ackermans, M. T., et al. 2009. Muscle Acylcarnitines during Short-Term Fasting in Lean Healthy Men. *Clinical Science (London, England : 1979)*. 116(7), 585–592.
56. Su, X., Han, X., Mancuso, D. J., Abendschein, D. R., and Gross, R. W. 2005. Accumulation of Long-Chain Acylcarnitine and 3-Hydroxy Acylcarnitine Molecular Species in Diabetic Myocardium: Identification of Alterations in

- Mitochondrial Fatty Acid Processing in Diabetic Myocardium by Shotgun Lipidomics. *Biochemistry*. 44(13), 5234–5245.
57. Tars, K., Leitans, J., Kazaks, A., Zelencova, D., Liepinsh, E., et al. 2014. Targeting Carnitine Biosynthesis: Discovery of New Inhibitors against γ -Butyrobetaine Hydroxylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 57(6), 2213–2236.
 58. The Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar, N., Gao, P., Seshasai, S. R. K., Gobin, R., et al. 2010. Diabetes Mellitus, Fasting Blood Glucose Concentration, and Risk of Vascular Disease: A Collaborative Meta-Analysis of 102 Prospective Studies. *The Lancet*. 375(9733), 2215–2222.
 59. Tominaga, H., Katoh, H., Odagiri, K., Takeuchi, Y., Kawashima, H., et al. 2008. Different Effects of Palmitoyl-L-Carnitine and Palmitoyl-CoA on Mitochondrial Function in Rat Ventricular Myocytes. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*. 295(1), H105–112.
 60. Tudor-Locke, C. and Bassett, D. R. 2004. How Many Steps/Day Are Enough? Preliminary Pedometer Indices for Public Health. *Sports Medicine*. 34(1), 1–8.
 61. Valentine, R. J., Coughlan, K. A., Ruderman, N. B., and Saha, A. K. 2014. Insulin Inhibits AMPK Activity and Phosphorylates AMPK Ser^{485/491} through Akt in Hepatocytes, Myotubes and Incubated Rat Skeletal Muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 562, 62–69.
 62. Vilskersts, R., Liepinsh, E., Mateuszuk, L., Grinberga, S., Kalvinsh, I., et al. 2009. Mildronate, a Regulator of Energy Metabolism, Reduces Atherosclerosis in ApoE/LDLR^{-/-} Mice. *Pharmacology*. 83(5), 287–293.
 63. van de Weijer, T., Sparks, L. M., Phielix, E., Meex, R. C., van Herpen, N. A., et al. 2013. Relationships between Mitochondrial Function and Metabolic Flexibility in Type 2 Diabetes Mellitus edited by K. Stadler. *PLoS ONE*. 8(2), e51648.
 64. Whitmer, J. T., Idell-Wenger, J. A., Rovetto, M. J., and Neely, J. R. 1978. Control of Fatty Acid Metabolism in Ischemic and Hypoxic Hearts. *The Journal of Biological Chemistry*. 253(12), 4305–4309.
 65. Zhang, X., Zhang, C., Chen, L., Han, X., and Ji, L. 2014. Human Serum Acylcarnitine Profiles in Different Glucose Tolerance States. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 104(3), 376–382.