

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE

JELIZAVETA SOKOLOVSKA

GLIKOZES TRANSPORTIERU UN SLĀPEKĻA OKSĪDA
PRODUKCIJAS IZMAIŅAS CUKURA DIABĒTA KOMPLIKĀCIJU
PATOĢENĒZĒ UN TO FARMAKOLOĢISKĀS KOREKCIJAS
IESPĒJAS

Promocijas darbs

Doktora grāda iegūšanai medicīnas nozarē

Apakšnozare: medicīniskā bioķīmija

Rīga, 2014

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē, Medicīniskās bioķīmijas katedrā; Latvijas Organiskās sintēzes institūta Bioķīmijas grupā; Paula Stradiņa Klīniskās universitātes slimnīcas Endokrinoloģijas centrā laika posmā no 2008. līdz 2013. gadam.



Šis darbs ir izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu projektā „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē”(Nr.2009/0138/1DP/1.1.2.1.2/09/IPIA/VIAA/004).

Darbs sastāv no ievada, 5 nodaļām, nobeiguma (secinājumiem), literatūras saraksta, promocijas darba rezultātus atspoguļojošo publikāciju un konferenču referātu saraksta, pielikumiem.

Darba forma: disertācija medicīnas nozarē, medicīniskās bioķīmijas apakšnozarē

Darba zinātniskais vadītājs: prof. Dr. habil. chem. Ivars Kalviņš

Darba recenzenti:

- 1) asoc. prof Dr.biol. Una Riekstiņa, Latvijas Universitātes Medicīnas fakultāte
- 2) asoc. prof. Dr.biol. Andrejs Šķesters, Rīgas Stradiņa universitātes Bioķīmijas laboratorija
- 3) prof. Dr.habil.biol. Ilja Zavodniks, Jankas Kupālas Grodņas valsts universitātes bioķīmijas katedra

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2014. gada 26. septembrī plkst. 14:00 Latvijas Universitātes Muzeja zālē Raiņa bulvārī 19, Latvijas Universitātes Medicīnas, farmācijas un bioloģijas promocijas padomes atklātā sēdē

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Medicīnas, farmācijas un bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs _____/Valdis Pīrāgs/

Promocijas padomes sekretāre _____/Kristīne Saleniece

© Latvijas Universitāte, 2014

© Jeļizaveta Sokolovska, 2014

ANOTĀCIJA

Pasaulē palielinās cukura diabēta pacientu skaits. Lielai daļai cukura diabēta slimnieku attīstās komplikācijas, kuru dēļ pieaug invaliditāte un mirstība. Pēdējo gadu pētījumi ir pierādījuši, ka diabētisko komplikāciju patoģenēzē nozīmīgs ir ne tikai neadekvāti kontrolēts glikozes līmenis, būtiski ir arī vairāki ģenētiskie, bioķīmiskie un vides faktori. Hiperglikēmijas izraisītā audu bojājumu izcelsmē ir iesaistītas kā NO[•] biosintēzes intensitātes novirzes, tā arī glikozes transportieru ekspresijas izmaiņas. Tāpēc var sagaidīt, ka šo faktoru modifikācija varētu būt izmantojama kā jauna pieeja diabētisko komplikāciju ārstēšanai.

Šī darba mērķis bija izpētīt slāpekļa oksīda metabolisma un glikozes transportieru ekspresijas izmaiņu patoģenētisko nozīmi cukura diabēta un tā komplikāciju attīstībā un pārbaudīt mildronāta un dažu 1,4-dihidropiridīnu spēju normalizēt tās.

Promocijas darba klīnisko rezultātu sadaļā ir aprakstīti dati par NO[•] metabolisma rādītājiem 2. tipa cukura diabēta pacientiem. Šiem pacientiem mēs konstatējām paaugstinātu NO[•] un tā metabolītu koncentrāciju asinīs, un parādījām, ka tā korelē ar glomerulārās filtrācijas ātrumu, mikroalbuminūriju un HbA1c%.

Diabētiskām žurkām NO[•] biosintēze ir izteikti pastiprināta un to veicina slāpekļa oksīda sintāžu un ksantīna oksidoreduktāzes paaugstināta aktivitāte. Tāpat žurkām ar eksperimentālu diabētu ir pastiprināta GLUT1 ekspresija nierēs, sirdī un aknās. Mūsu iegūtie rezultāti liecina arī par to, ka 1,4-dihidropiridīnu grupas preparāti spēj samazināt patoloģisko NO[•] pārprodukciju vairākos diabētisko žurku orgānos, normalizējot inducējamās slāpekļa oksīda sintāzes, ksantīna oksidoreduktāzes un GLUT1 ekspresiju nierēs. Tāpat ir parādīta mildronāta spēja labvēlīgi ietekmēt glikozes metabolismu žurkām ar streptozotocīna izraisīto eksperimentālo diabētu, kā arī samazināt tā izraisīto GLUT1 hiperekspresiju nierēs, sirdī un aknās.

Kopumā ņemot, iegūtie rezultāti norāda uz to, ka glikozes transportieru ekspresijas un NO[•] biosintēzes regulācija var kļūt par nākotnes pieeju cukura diabēta komplikāciju ārstēšanā. Mildronāts un 1,4-dihidropiridīni ir perspektīvi preparāti šim nolūkam.

Atslēgvārdi: cukura diabēta komplikācijas, NO[•], GLUT1, 1,4-dihidropiridīni, mildronāts.

ANNOTATION

Number of patients with *diabetes mellitus* is rapidly increasing throughout the world. Many patients develop complications, causing increased morbidity and mortality. Actually it is evident, that besides inappropriate glycaemic control a number of genetic, biochemical and environmental factors contribute to the pathogenesis of diabetic complications. Pathological production of NO[•] and changes in glucose transporter expression are implicated in the pathogenesis of hyperglycaemia mediated tissue injury, and modification of these factors could be a novel approach in the treatment of diabetic complications.

The goal of this work was to study the pathogenetical role of changes in nitric oxide metabolism and glucose transporter expression in development of diabetes and its complications, as well as ability of mildronate and some 1,4-dihydropyridines to attenuate these changes.

Our data demonstrate increased concentration of NO[•] and its metabolites in the blood of in type 2 diabetic subjects. Parameters of NO[•] metabolism correlated with glomerular filtration rate, microalbuminuria and HbA1c%.

It was also shown that NO[•] production is increased in diabetic animals due to enhanced activity of nitric oxide synthases and xantine oxidoreductase. GLUT1 expression is increased in kidneys, liver and heart of diabetic rats. 1,4-dihydropyridines can decrease the pathological NO[•] production in several organs of diabetic rats by normalization of the expression of inducible nitric oxide synthase, xanthine oxidase and GLUT1 in kidneys. Our results demonstrate the ability of mildronate to affect beneficially glucose metabolism in rats with experimental streptozotocin diabetes, as well as to decrease diabetes induced GLUT1 hyper expression in kidneys, heart and liver.

In general, these results demonstrate applicability of regulation of glucose transporter expression and NO[•] production for development of a novel approach for treatment of diabetic complications. Mildronate and 1,4-dihydropyridines appear to be prospective candidate compounds for this purpose.

Keywords: diabetic complications, NO[•], GLUT1, 1,4-dihydropyridines, mildronate.

SATURS

ANOTĀCIJA.....	3
ANNOTATION.....	4
APZĪMĒJUMU SARAKSTS.....	8
IEVADS.....	12
DARBA MĒRĶIS.....	13
DARBA UZDEVUMI.....	13
DARBA HIPOTĒZE.....	14
1. LITERATŪRAS APSKATS.....	15
1.1. Cukura diabēts - epidemioloģija un klasifikācija.....	15
1.1.1. 1.tipa cukura diabēts - epidemioloģija, patoģenēze, klīniskā aina un terapijas iespējas.....	17
1.1.2. 2. tipa cukura diabēts - epidemioloģija, patoģenēze, klīniskā aina un terapijas iespējas.....	18
1.2. Cukura diabēta modeļi dzīvniekos.....	20
1.2.1. 1.tipa cukura diabēta modeļi.....	21
1.2.1.1. Ķīmiski ierosināti 1. tipa cukura diabēta modeļi.....	21
1.2.1.2. Spontānie autoimūnie 1. tipa diabēta modeļi.....	23
1.2.1.3. Dzīvnieku modeļi ar endoplazmatiskā tīkla stresa izraisītu pastiprinātu β -šūnu apoptozi.....	24
1.2.1.4. Dzīvnieku modeļi ar samazinātu β -šūnu masu pēc pankreatektomijas.....	24
1.2.1.5. Vīrusu izraisīti 1. tipa cukura diabēta modeļi.....	24
1.2.2. 2. tipa cukura diabēta modeļi.....	25
1.2.2.1. 2. tipa cukura diabēta modeļi ar aptaukošanos.....	25
1.2.2.2. 2. tipa cukura diabēta modeļi bez aptaukošanās.....	27
1.2.3. Transģēnie un <i>knockout</i> cukura diabēta un diabētiskās nefropātijas modeļi.....	28
1.2.3.1. Transģēnās peles ar aizkuņģa dziedzera attīstībai nepieciešamo faktoru deficītu.....	29
1.2.3.2. Transģēnās peles ar β -šūnu augšanu un izdzīvošanu ietekmējošu faktoru deficītu.....	30
1.2.3.3. Diabētiskās nefropātijas modeļi dzīvniekos.....	30
1.3. Oksidatīvais stress un NO biosintēze cukura diabēta apstākļos.....	32
1.3.1. Oksidatīvais stress un diabētisko komplikāciju attīstība.....	32
1.3.2. NO loma diabētisko komplikāciju patoģenēzē.....	35
1.3.2.1. NO veidošanās un metabolisms.....	35
1.3.2.2. NO loma slimību patoģenēzē.....	36
1.3.2.3. NO veidošanās cukura diabēta apstākļos.....	37
1.3.2.4. NO, peroksinitrīts un nitroztatīvais stress diabētisko komplikāciju attīstībā.....	39
1.4. Glikozes transports un glikozes transportētāji cukura diabēta attīstības gaitā.....	40
1.4.1. Na^+ /glikozes kotransportieri.....	40
1.4.2. GLUT un to ekspresijas izmaiņas, diabētam attīstoties.....	41
1.5. Izmantojamās un nākotnes pieejas cukura diabēta komplikāciju novēršanā un ārstēšanā.....	45
1.5.1. Glikēmijas kontrole, insulīns un orālie antidiabētiskie līdzekļi.....	45
1.5.2. Arteriālā spiediena kontrole un renīna-angiotenzīna-aldosterona sistēmas (RAAS) inhibīcija.....	46
1.5.3. Lipīdu līmeņa kontrole, statīni un fenofibrāts.....	47
1.5.4. Jaunās diabētisko komplikāciju terapijas pieejas, kas vērstas uz oksidatīvā stresa samazināšanu un glikozes transportētāju ekspresijas normalizēšanu.....	47
1.5.4.1. Jaunas ārstēšanas pieejas, kuras vērstas uz oksidatīvā stresa mazināšanu.....	47
1.5.4.2. Glikozes transportētāju ekspresijas modificēšana.....	49
2. MATERIĀLI UN METODES.....	51
2.1. Laboratorijas dzīvnieki.....	51
2.1.1. STZ eksperimentālā cukura diabēta ierosināšana.....	51
2.1.2. HS cukura diabēta modeļa ierosināšana.....	52

2.2.	Eksperimentu plānojums un vielu ievadīšana	52
2.3.	Materiāli	55
2.4.	Metodes	56
2.4.1.	Bioķīmisko parametru noteikšana dzīvnieku paraugos	56
2.4.2.	Orālā glikozes tolerances testa veikšana	56
2.4.3.	NO [•] koncentrācijas noteikšana žurku audos	57
2.4.4.	RNS izdalīšana un cDNS sagatavošana	57
2.4.1.	Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija	58
2.4.2.	Audu histoloģiskā un morfoloģiskā izmeklēšana	59
2.4.3.	Imūnhistoķīmiskā izmeklēšana	60
2.5.	Klīniskais pētījums	61
2.5.1.	Pacientu raksturojums	61
2.5.2.	Klīnisko paraugu bioķīmiskās analīzes	61
2.5.3.	Slāpekļa oksīda koncentrācijas noteikšana pacientu asinīs	62
2.5.4.	NO ₂ ⁻ un NO ₃ ⁻ summārās koncentrācijas noteikšana pacientu serumā	62
2.6.	Datu statistiskā apstrāde	62
3.	REZULTĀTI	63
3.1.	Ar streptozotocīnu inducētu žurku eksperimentāla cukura diabēta modeļu metabolo parametru raksturojums un farmakoloģisko līdzekļu ietekme uz tiem	63
3.1.1.	Mildronāta un tā kombināciju ar metformīnu vai glibenklamīdu ietekme uz metabolisma parametriem eksperimentālā diabēta STZ modelī	64
3.1.2.	Mildronāta un tā kombināciju ar metformīnu un glibenklamīdu ietekme uz metabolisma parametriem eksperimentālā diabēta HS modelī	70
3.2.	Glikozes transportētāju ekspresijas izmaiņas cukura diabēta un farmakoloģisko līdzekļu ietekmē	74
3.2.1.	GLUT1 ekspresijas izmaiņas nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu STZ modelī	74
3.2.2.	GLUT1 ekspresijas izmaiņas nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu HS modelī	80
3.2.3.	GLUT4 ekspresijas izmaiņas skeleta muskuļos un sirdī dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu STZ modelī	84
3.2.4.	1,4 dihidropiridīnu ietekme uz GLUT1 ekspresijas izmaiņām nierēs dzīvniekiem ar eksperimentālo STZ diabētu	87
3.3.	Terapijas ietekme uz NO [•] veidošanās intensitāti audos dzīvniekiem ar eksperimentālo cukura diabētu	88
3.3.1.	NO [•] veidošanās sešu nedēļu dinamika audos dzīvniekiem ar eksperimentālo STZ diabētu	88
3.3.2.	NO [•] biosintēzes inhibitoru ietekme uz NO [•] veidošanos audos žurkām ar eksperimentālo STZ diabētu	91
3.3.3.	Dihidropiridīnu grupas preparātu cerebrokrasta, etaftorona un fenoflorona ietekme uz NO [•] biosintēzes procesu STZ diabētisko dzīvnieku nierēs	96
3.3.4.	iNOS, eNOS un ksantīna oksidoreduktāzes (XOR) mRNS un proteīnu ekspresija STZ cukura diabēta un etaftorona terapijas ietekmē	98
3.4.	NO [•] un to metabolītu biosintēze 2. tipa cukura diabēta slimniekiem	102
3.4.1.	Pētījumā iesaistīto personu raksturojums	102
3.4.2.	NO [•] un tā stabilo metabolītu NO ₂ ⁻ un NO ₃ ⁻ līmenis kontroles un pētījuma grupās	103
4.	DISKUSIJA	107
4.1.	Pētījumā izmantoto farmakoloģisko preparātu ietekme uz metabolisma parametriem žurkām ar STZ un HS eksperimentālajiem diabēta modeļiem	107

4.1.1.	Mildronāta un mildronāta kombināciju ar metformīnu un glibenklamīdu ietekme uz ogļhidrātu un lipīdu metabolisma parametriem žurkām ar STZ un HS eksperimentālajiem modeļiem	107
4.1.2.	Iespējamie mildronāta darbības mehānismi pie cukura diabēta.....	109
4.1.3.	1,4-dihidropiridīnu ietekme uz glikozes līmeni	111
4.2.	Glikozes transportieru ekspresijas un NO [•] biosintēzes izmaiņas eksperimentālā diabēta modeļos	112
4.2.1.	GLUT1 ekspresijas un NO [•] koncentrācijas izmaiņas nierēs un to loma diabētiskās nefropātijas patoģenēzē.....	113
4.2.2.	GLUT1 ekspresijas un NO [•] koncentrācijas izmaiņas aknās un to loma nealkoholiskā steatohepatīta sākumstadijā	115
4.2.3.	NO [•] koncentrācijas izmaiņas asinīs un aortas sienīņā un to loma diabēta makrovaskulāro komplikāciju patoģenēzē	117
4.2.4.	GLUT1 un GLUT4 ekspresijas izmaiņas sirdī un to iespējamā saistība ar diabētiskās kardiomiopātijas attīstību	118
4.2.5.	GLUT1, GLUT4 ekspresijas un NO [•] koncentrācijas izmaiņas skeleta muskulatūrā un to iespējamā saistība ar insulīna rezistenci.....	119
4.3.	Farmakoloģisku preparātu ietekme uz NO [•] veidošanos un glikozes transportētāju ekspresiju dzīvniekiem ar eksperimentālo STZ un HS diabētu.....	120
4.3.1.	Mildronāta ietekme uz GLUT1 un GLUT4 koncentrāciju nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos	120
4.3.2.	Mildronāta kombināciju ar metformīnu vai glibenklamīdu ietekme uz GLUT1 ekspresiju	123
4.3.3.	Glibenklamīda ietekme uz GLUT1 un GLUT4 ekspresiju nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos	123
4.3.4.	Metformīna ietekme uz GLUT1 un GLUT4 ekspresiju nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos	125
4.3.5.	1,4-Dihidropiridīnu ietekme uz NO [•] veidošanos dažādos orgānos, kā arī uz iNOS, eNOS, XOR un GLUT1 ekspresiju nierēs	127
4.4.	NO [•] un tā metabolītu biosintēze 2. tipa cukura diabēta slimniekiem.....	129
4.4.1.	NO [•] , NO ₂ ⁻ un NO ₃ ⁻ koncentrācijas cukura diabēta pacientiem.....	129
4.4.2.	NO [•] , NO ₂ ⁻ un NO ₃ ⁻ koncentrācijas korelācija ar glomerulārās filtrācijas ātrumu, HbA1c% un mikroalbuminūriju	131
4.4.3.	NO [•] , NO ₂ ⁻ un NO ₃ ⁻ koncentrācijas korelācija ar diabēta stāžu un diabētiskām komplikācijām, kā arī diabēta ārstēšanas veidiem pētījumu grupā.....	132
4.4.4.	NO [•] , NO ₂ ⁻ un NO ₃ ⁻ koncentrācijas korelācija ar arteriālo hipertensiju, koronāro sirds slimību, smēķēšanas ieradumu, nespēcificisko radiācijas ietekmi, kardiovaskulārā profila terapiju, asins lipīdu frakcijām un C-peptīda līmeni pacientiem	132
5.	SECINĀJUMI.....	134
6.	PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU.....	135
7.	PATEICĪBAS	137
8.	IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	138
9.	PIELIKUMI	149

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

- $O^{2\cdot}$ superoksīda radikālis
- $OH\cdot$ – hidroksilradikālis
- 0,9% NaCl – 0,9% nātrija hlorīda šķīdums
- 1,4-DHP – 1,4-dihidropiridīnu grupas preparāti
- ABL – augsta blīvuma lipoproteīdi
- ADA – Amerikas Diabēta asociācija
- ADMA – asimetriskais dimetilarginīns
- AGE (advanced glycation end products) – paātrinātās glikozilēšanas gala produkti
- AKEI – angiotenzīna konvertējošā enzīma inhibitori
- ALAT – alanīna transamināze
- AMG – aminoguanidīns
- AMP – adenozinmonofosfāts
- AMPK – AMP aktivētā proteīnkināze
- ANG II – angiotenzīns II
- ARB – angiotenzīna II receptoru blokatori
- ATF – adenozīna trifosfāts
- BB žurka – *bio-breeding* diabētiskā žurka
- BLK (mutated B-lymphocyte tyrosin kinase) – mutējusī B-limfocītu tirozīnkināze
- BMI (body mass index) – ķermeņa masas indekss
- bp – bāzu pāri
- cAMP – cikliskais 3', 5'-adenozinmonofosfāts
- CD – cukura diabēts
- CEL – žultskābju atkarīgā lipāze
- cGMP – cikliskais 3', 5'-guanozinmonofosfāts
- CoQ – koenzīms Q
- CRB – cerebrokrasts
- CREB (cAMP response element-binding protein) – c-AMF atbildes elementu saistošais proteīns
- CRO – C-reaktīvais olbaltums
- DAG – diacilglicerīns
- DDAH – dimetilarginīna dimetilaminohidrolāze
- DETC – dietiltiokarbamīds
- DMSO – dimetilsulfoksīds
- DNS – dezoksiribonukleīnskābe
- DPP-4 – dipeptidilpeptidāze-4
- DTA – diastoliskais arteriālais spiediens

EASD – (European Association of study of diabetes) Eiropas diabēta izpētes asociācija
EGĀ – eritrocītu grimšanas ātrums
eNOS – endoteliālā slāpekļa oksīda sintāze
EPR - elektronparamagnētiskā rezonance
ER – endoplazmatiskais tīkls
ET-1 – endotelīns 1
ETF – etaftorons
FNF – fenofitorons
Foxo-1 – transkripcijas faktors
G6PDH – glikozes-6-fosfāta dehidrogenāze
GBB – γ -butirotbetaīns
GdCl₃ – gadolīnija hlorīds
GFĀ – glomerulārās filtrācijas ātrums
GK žurka – Goto-Kakizaki žurka
Glib – glībenklamīds
GLP-1 – glikagonam līdzīgais peptīds-1
GLUT – glikozes transportētājproteīns
H₂O₂ – ūdeņraža peroksīds
HAI – histoloģiskās aktivitātes indekss
HbA1c – glikozētais hemoglobīns
HK-2 – heksokināze-2
HLA – cilvēka leukocītu antigēns
HMG CoA reductāze – 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzīma A reductāze
HNF-1- α (hepatocyte nuclear factor 1- α) – hepatocītu kodola factors 1 α
HNF-1- β (hepatocyte nuclear factor 1- β) – hepatocītu kodola factors 1- β
HNF-4- α (hepatocyte nuclear factor 4- α) – hepatocītu kodola factors 4- α
HS modelis – promocijas darbā izmantotais eksperimentālā diabēta modelis, kurš izveidots, barojot žurkas ar treknu barību un zemās devās injicējot STZ
i.p. – intraperitoneāli
i.v. – intravenozi
IAPP – fizioloģiskais salīņu amiloīda polipeptīds
IGF-2 – insulīnam līdzīgais augšanas faktors-2
iNOS – inducējamā slāpekļa oksīda sintāze
INS – insulīna gēns
INSR – insulīna receptors
IPF-1 – insulīna promotera faktors-1
IRS-2 – insulīna receptora substrāts-2
Jak/STAT – Janus kināze (JAK) un signāla pārnese un transkripcijas aktivators (STAT)

KH – kopējais holesterīns
KLF11 (Kruppel-like factor 11) – transkripcijas faktors KLF11
KMI – ķermeņa masas indekss
KSS – koronārā sirds slimība
LDL – zema blīvuma lipoproteīdi
Metf – metformīns
MHC (major histocompatibility complex) – galvenais audu saderības komplekss
Mildr – mildronāts
Mildr+glib – mildronāta un glibenkalimīda kombinācija
Mildr+metf – mildronāta un metformīna kombinācija
MODY – (maturity onset diabetes of the young) MODY diabēts
mRNS – matrices ribonukleīnskābe
NA – nikotīnamīds
NAD – nikotinamīdadenīdinukleotīds
NADPH oksidāze – nikotinamīdadenīdinukleotīdfosfāta oksidāze
NADPH oksidāze – nikotinamīdadenīdinukleotīdfosfāta oksidāze
NeuroD1 (transcription factor of neurogenic differentiation 1) – neiroloģiskās diferenciacijas transkripcijas faktors D1
NF-κB – kodola faktors kappa B
Nfr2 – transkripcijas faktors
nNOS – neironālā slāpekļa oksīda sintāze
NO[·] – slāpekļa oksīds
NO₂⁻ – nitrītsjons
NO₃⁻ – nitrātsjons
NOD pele – neaptaukušies diabētiska pele
NOX4 – gēns, kurš kodē NADPH oksidāzes NOX4 subvienību
NRI – neprecizēta radiācijas ietekme
ONOO⁻ – peroksinitrīts
p.o. – perorāli
P38-MAPK – mitogēnaktivētā proteīnkināze p-38
PAH – primārā arteriālā hipertensija
PARP – poli-ADF-ribozes polimerāze
PAX4 (paired box gene-4) – transkripcijas faktors
Pdx-1 – aizkuņģa dziedzera un duodēna transkripcijas faktors-1
PKB – proteīnkināze B
PKC – proteīnkināze C
PPAR – peroksisomu proliferāciju aktivējošais receptors
RAAS – renīna-angiotenzīna-aldosterona sistēma

RAGE – paātrinātās glikozilēšanas gala produktu receptors
ROS (reactive oxygen species) – aktivētās skābekļa formas
S.E.M. – vidējās aritmētiskās vērtības standartklūda
SD – standartnovirze
SGLT – nātrija-glikozes kotransporteri
STA – sistoliskais arteriālais spiediens
STZ – streptozotocīns
STZ modelis – eksperimentālā diabēta modelis, kurš veidots, injicējot žurkām STZ
TA – arteriālais spiediens
TBS – TRIS-buferētais sāls šķīdums
TGF β – transformējošais augšanas faktors- β
TRIS – Tris[hidroksimetil]aminometāna buferšķīdums
USG – ultrasonogrāfija
XOR – ksantīna oksidoreduktāze
ZBL – zema blīvuma lipoproteīdi

IEVADS

Pēc jaunāko pētījumu datiem, adekvāta cukura diabēta kontrole pasargā pacientus no cukura diabēta komplikāciju attīstības tikai 11% gadījumu (Lachin *et al.*, 2008). Tas nozīmē, ka šādu komplikāciju attīstību ietekmē arī citi ģenētiskie, bioķīmiskie un vides faktori, kuru izpēte mūsdienās turpinās. Ir zināms, ka hiperglikēmija veicina diabētisko komplikāciju attīstību caur dažādiem mehānismiem, ieskaitot poliolu ceļa aktivāciju, glikozes autooksidāciju, pastiprinātu diacilglicerīna veidošanos un PKC aktivāciju, paātrinātās glikozilēšanas gala produktu veidošanos. Visi šie mehānismi veicina oksidatīvā stresa attīstību (Pacher *et al.*, 2007).

Arī slāpekļa oksīda paaugstināts līmenis veicina oksidatīvā stresa attīstību, tāpēc NO[•] patogēnā iedarbība ir lielā mērā atbildīga par cukura diabēta komplikāciju attīstību. Anomāla augsta NO[•] koncentrācija korelē ar cukura diabētam raksturīgo asinsvadu patoloģisko izmaiņu, diabētiskās nefropātijas, retinopātijas, kardiopātijas un citu diabētisko komplikāciju attīstību (Yamagashi *et al.*, 2011). Saskaņā ar pētījumu datiem tiek uzskatīts, ka diabēta sākumposmā notiek NO[•] biosintēzes pārlika aktivācija, kas izraisa DNS bojājumus un iekaisuma reakciju, par ko pārsvarā ir atbildīgs peroksinitrīts. (Pacher *et al.*, 2007).

Dati par NOS[•] izoformu aktivitāti diabētisko komplikāciju patoģenēzes gaitā ir pretrunīgi: tiek ziņots par iNOS, eNOS, nNOS vai visu šo izoformu iesaistīšanos, kā arī par NOS-neatkarīgo NO[•] biosintēzi (Veelken *et al.*, 2000, Stadler *et al.*, 2008, Yamagashi *et al.*, 2011, Cantu-Medellin *et al.*, 2013). Līdz šim NO[•] koncentrācijas izmaiņas eksperimentālā diabēta modeļos antidiabētisko medikamentu ietekmē ir maz pētītas.

Cukura diabēta un tā komplikāciju patoģenēzē nozīmīga loma ir arī bojājumiem glikozes transporta sistēmā, kurus izraisa glikozes transportieru ekspresijas un aktivitātes izmaiņas. GLUT4, GLUT5 un GLUT9 ekspresijas izmaiņas ir iesaistītas insulīna rezistences attīstībā (Mueckler *et al.*, 2013), bet palielinātai GLUT1 ekspresijai ir nozīme mikroangiopātisko komplikāciju patoģenēzē (Carruthers *et al.*, 2009).

Daži GLUT1 gēna polimorfismi tiek saistīti ar palielinātu diabētiskās nefropātijas risku cilvēkiem (Cui *et al.*, 2012). Vairāki pētījumi ar šūnu kultūrām un *in vivo*, izmantojot eksperimentālos diabēta modeļus, norāda uz to, ka GLUT1 hiperekspresija ir saistīta ar iekaisuma un oksidatīvā stresa attīstību nieru audos un tīklenē (Heilig *et al.*, 2013). Tomēr

literatūras dati par GLUT1 ekspresijas izmaiņām cukura diabēta eksperimentālajos cukura diabēta modeļos un farmakoloģisko preparātu ietekmē bieži vien ir pretrunīgi.

Pēdējos gados intensīvi tiek meklēti preparāti, kas spētu vienlaikus uzlabot glikozes metabolismu un kavēt diabētisko komplikāciju attīstību. Pašlaik šajā kontekstā tiek aktīvi pētīti dipeptidilpeptidāzes-4 inhibitori, glikagonam līdzīgā peptīda-1 receptoru agonisti, metformīns un citi preparāti.

Latvijas Organiskās sintēzes institūtā radītajiem preparātiem – mildronātam un dažiem 1,4-dihidropiridīnu grupas savienojumiem – tika atklātas spējas uzlabot glikozes metabolismu eksperimentālajos cukura diabēta modeļos, kā arī tiem ir novērotas antioksidatīvās īpašības *in vitro* (Liepins *et al.*, 2008, Liepins *et al.*, 2011, Briede *et al.*, 2007, Ryabokon *et al.*, 2008). Tomēr šo preparātu ietekme uz glikozes transportieru ekspresiju un NO[•] produkciju attiecībā uz diabētiskām komplikācijām ir maz pētīta.

Šī pētījuma rezultāti sniedz jaunu informāciju par glikozes transportieru un NO[•] iesaisti diabētisko komplikāciju, it īpaši diabētiskās nefropātijas patoģenēzē.

Promocijas darba eksperimentālā daļa izstrādāta Latvijas Universitātes Medicīniskās bioķīmijas katedrā un Latvijas Organiskās sintēzes institūta Bioķīmijas grupā.

DARBA MĒRĶIS

Izpētīt slāpekļa oksīda metabolisma un glikozes transportieru ekspresijas izmaiņu patoģenētisko nozīmi cukura diabēta un tā komplikāciju attīstībā un pārbaudīt mildronāta un dažu 1,4-DHP spēju normalizēt tās.

DARBA UZDEVUMI

1. Izpētīt NO[•] un tā metabolītu (NO₂⁻ un NO₃⁻) koncentrāciju pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu un kontroles grupas pacientiem, kā arī to korelāciju ar mikroalbuminūriju, glomerulārās filtrācijas ātrumu un glikolizētā hemoglobīna saturu.

2. Izmantojot žurku eksperimentālā diabēta modeli, raksturot NO[•] biosintēzes izmaiņas eksperimentālā diabēta attīstības gaitā, NO[•] koncentrācijas izmaiņas dažādos orgānos un NO[•] produkciju modificējošos mehānismus nierēs.

3. Noteikt 1,4-dihidropiridīnu klases preparātu cerebrokrasta, etaftorona, fenoflorona, AV153 (0,5 mg/kg, *p.o.*, no 9. līdz 12. dienai pēc STZ injekcijas) ietekmi uz NO[•] biosintēzi un tās mehānismiem nierēs žurkām ar 1. tipa (STZ) cukura diabēta modeli.

4. Izmantojot žurku 1. tipa (STZ) un 2. tipa (HS) diabēta eksperimentālos diabēta modeļus, raksturot glikozes transportieru GLUT1 un GLUT4 ekspresijas izmaiņas dažādos orgānos diabēta attīstības gaitā.

5. Izpētīt mildronāta (100 mg/kg, *p.o.*, 6 nedēļas) un tā kombinācijas ar glibenklamīdu vai metformīnu ietekmi uz ogļhidrātu un taukvielu metabolismu, kā arī glikozes transportieru (GLUT1 un GLUT4) ekspresiju žurku 1. tipa (STZ) un 2. tipa (HS) diabēta eksperimentālajos modeļos.

DARBA HIPOTĒZE

Diabētisko komplikāciju patoģenēzes sākumposmā notiek glikozes transportieru ekspresijas izmaiņas un veidojas slāpekļa oksīda pārprodukcija. Šos procesus normalizējot, iespējams kavēt diabētisko komplikāciju veidošanos.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Cukura diabēts - epidemioloģija un klasifikācija

Cukura diabēta pacientu skaits visā pasaulē nemitīgi pieaug. Pēc Starptautiskās Diabēta federācijas datiem pasaulē 2013. gadā bija 382 miljoni jeb 8,3 %, cilvēku ar cukura diabētu. 90% no tiem ir pacienti ar 2. tipa cukura diabētu. Eiropā ir 55,5 miljoni diabēta pacienti (8.5%). Pēc aplēsēm, 2030. gadā pasaulē būs 552 miljoni cukura diabēta pacientu (International Diabetes Federation, Atlas of Diabetes, 6th edition, 2013). Latvijā 2007. gadā bija 58534 pacienti ar cukura diabētu, bet 2012. gadā jau bija 79122 šādi slimnieki, no kuriem ar 1. tipa cukura diabētu slimoja 4371 cilvēks, bet 74247 - ar 2. tipa cukura diabētu. Jāsecina, ka Latvijā katru gadu diabēta pacientu skaits pieaug par 5,2% (Latvijas veselības aprūpes statistikas gadagrāmata 2012).

Cukura diabēts ir metabola slimība, kuru raksturo paaugstināts glikozes līmenis asinīs (hiperglikēmija). Hiperglikēmija pie cukura diabēta rodas insulīna sekrēcijas vai tā iedarbības defektu dēļ. Abi šie patofizioloģiskie mehānismi var darboties arī vienlaicīgi.

Ilgstoša hiperglikēmija pie cukura diabēta izraisa dažādu orgānu bojājumus, it īpaši - acu, nieru, nervu, sirds un asinsvadu bojājumus. Lielākā daļa cukura diabēta pacientu sirgst ar 2. tipa cukura diabētu, kura viens no cēloņiem ir perifēro audu rezistence pret insulīna iedarbību, kuru nespēj kompensēt endogēnā insulīna sekrēcijas pieaugums.

Otrs biežākais cukura diabēta veids ir 1. tipa cukura diabēts, kas ir autoimūna slimība, un tā ir saistīta ar insulīna deficītu aizkuņģa dziedzera saliņu β -šūnu bojāejas dēļ. Samērā bieži sastop arī gestācijas cukura diabētu, kurš attīstās grūtniecēm un visbiežāk izzūd pēc dzemdībām. Retāk ir sastopami specifiski cukura diabēta tipi. Tie var būt saistīti ar noteiktām mutācijām tajos gēnos, kuri nodrošina insulīna sekrēciju un darbību (piemēram, MODI, neonatālais cukura diabēts un citi).

Cukura diabēts var attīstīties arī sekundāri - citu patoloģiju kontekstā: piemēram, hroniska pankreatīta gadījumā vai pie endokrinopātijām (akromegālija, feohromocitoma, Kušinga sindroms u.c.). Tāpat cukura diabēta veidošanos var provocēt arī medikamenti: glikokortikoīdi, γ -interferons, diazoksīds, β -adrenoreceptoru agonisti un citi. Dažu ģenētisko sindromu gadījumā arī attīstās cukura diabēts (piemēram, pie Dauna sindroma, Klainfeltera sindroma, Prader-Villi sindroma, porfīrijas un citiem) (ADA position statement: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2010).

1.1. tabula. Cukura diabēta etioloģiska klasifikācija

I. 1.tipa cukura diabēts (parasti noved pie pilnīga insulīna deficīta): A. Autoimūns B. Idiopātisks	
II. 2.tipa cukura diabēts	
III. Gestācijas cukura diabēts	
IV. Citi specifiski diabētaveidi	
1.β-šūnu funkcijas ģenētiski defekti	5. Medikamentu vai ķīmisku savienojumu izraisīts
1.1. 12. hromosoma, HNF-1-α (MODY3)	5.1. Alfa-interferons
1.2. 7 hromosoma, glikokināze (MODY2)	5.2. Atipiskie antopsihotiķi
1.3. 20. hromosoma, HNF-4-α (MODY1)	5.3. β-adrenoreceptoru agonisti
1.4. 13. hromosoma, insulīna promotera faktors-1 (IPF1; MODY4)	5.4. Diazoksīds
1.5. 7. hromosoma, HNF-1-β- (MODY5)	5.5. Dilantīns
1.6. 2. hromosoma, NeuroD1 (MODY6)	5.6. Glikokortikoīdi
1.7. 7. hromosoma, KLF11 (MODY7)	5.8. Augstas aktivitātes antiretrovirāla terapija (HAART)
1.8. 2. hromosoma, CEL (MODY8)	5.9. HMG-CoA-reduktāzes inhibitori (statīni)
1.9. 7. hromosoma, PAX4 (MODY9)	5.10. Nikotīnskābe
1.10. 11. hromosoma, INS (MODY10)	5.11. Pentamidīns
1.11. 8. hromosoma, BLK (MODY11)	5.12. Tiazīdi
1.12. Mitohondriālais DNS	5.13. Tiroksīns
1.13. Pastāvīgais neonatālais cukura diabēts	5.14. Citi
1.14. Tranzitorais neonatālais cukura diabēts	6. Infekcijas
1.15. Citi	6.1. Iedzimtas masaliņas
2.Ģenētiski defekti β-šūnu darbībā	6.2. Citomegalovīruss
2.1. Leprehaunisms	6.3. Citi
2.2. Lipoatrofiskais diabēts	7. Retas autoimūnā diabēta formas
2.3. Rabsona-Mendelhalā sindroms	7.1. Anti-insulīna receptora antivielas
2.4. A-tipa insulīna rezistence	7.2. „Stiff man” sindroms
2.5. Citi	7.3. Citi
3.Eksokrīnās aizkuņģa dziedzera daļas slimības	8. Citi ģenētiski sindromi, kas dažreiz asociējas ar diabētu
3.1. Cistiskā fibroze	8.1. Dauna sindroms
3.2. Fibrokalkulozais pankreatīts	8.2. Fridriha ataksija
3.3. Hemohromatoze	8.3. Hantingtona horeja
3.4. Neoplāzija	8.4. Klainfeltera sindroms
3.5. Pankreatīts	8.5. Porfirija
3.6. Trauma/pankreatektomija	8.6. Miotoniskā distrofija
3.7. Citi	8.7. Prader-Villi sindroms
4.Endokrinopātijas	8.8. Ternera sindroms
4.1. Akromegālija	8.9. Volfrāma sindroms
4.2. Aldosteronoma	8.10. Citi
4.3. Kušinga sindroms	
4.4. Glukagonoma	
4.5. Hipertireoze	
4.6. Feohromocitoma	
4.7. Somatostatīnoma un citi	

Adaptēts no: Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada Can J Diabetes 37 (2013), Appendix 1, S197.
Papildināts no <http://ghr.nlm.nih.gov/>, www.moldiag.com

1. tabulā ir atspoguļota cukura diabēta klasifikācija. Tālāk atsevišķi apskatīsim 1. un 2. tipa cukura diabēta etioloģiju, patoģenēzi, klīniskās izpausmes un ārstēšanas iespējas.

1.1.1. 1.tipa cukura diabēts - epidemioloģija, patoģenēze, klīniskā aina un terapijas iespējas.

1. tipa cukura diabēts ir autoimūna slimība, kas rodas mijiedarbojoties ģenētiskiem un vides faktoriem. Šai slimībai ir raksturīgs aizkuņģa dziedzera Langerhansa saliņu β -šūnu funkcionētspējas zudums, kas noved pie absolūta insulīna deficīta. Līdz XX gadsimta 20. gadiem, kad tika atklāts insulīns un bija uzsākta eksogēnā insulīna ievadīšana 1. tipa cukura diabēta pacientiem, šī bija nāvējoša slimība. Saslimšanas biežums ar 1. tipa cukura diabētu krasi atšķiras dažādās valstīs – no 0,1 Venecuēlā līdz 64 uz 100000 iedzīvotājiem gadā Somijā (DIAMOND Project Group, 2006).

XX gadsimta otrajā pusē, un it īpaši - pēdējās desmitgadēs, 1. tipa cukura diabēta izplatība pieaug visā pasaulē (Egros *et al.*, 2013; Knips *et al.*, 2012). 1. tipa cukura diabēta patofizioloģija nav pilnībā izpētīta, tomēr nepārprotama ir iedzimtības loma šīs slimības izcelsmē (Hyttinen *et al.*, 2003, Ziegler *et al.*, 2010). No identificētiem gēniem lielu daļu riska nosaka cilvēka leikocītu antigēna (human leukocyte antigen-HLA) gēni. Ņemot vērā daudzveidīgas HLA gēnu funkcijas T šūnu selekcijā, antigēnu prezentācijā un imūnajās atbildēs, ir daudz iespējamo variantu, kā HLA ietekmē saslimšanas risku un diabēta progresēšanu. HLA DR un HLA DQ II klases lokusi ir prognostiski visnoderīgākās pārmantotā riska determinantes.

1. tipa cukura diabēta risks var pieaugt no 0,3 līdz 30% atkarībā no viņa/viņas HLA II klases genotipa. Piemēram, *HLA DRB1*03,*04; DQB1*0302* genotips, kurš nosaka visaugstāko CD1 risku, ir atrodams 2,3% ASV dzimušiem baltajiem bērniem, un 39% tādu pacientu, kuriem attīstās 1. tipa CD pirms 20 gadu vecuma (apkopojis Ziegler *et al.*, 2010).

Ne tikai ģenētiskie faktori nosaka 1. tipa CD risku. Ir parādīta 1. tipa cukura diabēta saslimstības saistība ar tādiem vides faktoriem kā pārmērīgs higiēnas līmenis (tai skaitā salīdzinoši retākas helmintozes bērniem), vīrusu slimības (enterovīruss, masalu vīruss, masaliņu vīruss, rotavīruss un citomegalovīruss), D vitamīna deficīts, nepietiekama krūts barošana zīdaiņa vecumā un citi faktori (Egros *et al.*, 2013).

1. tipa cukura diabēta patoģenēzes pamatā ir autoimūns process, kurš tiek iniciēts aktivējošo faktoru ietekmē un rezultējas β -šūnu destrukcijā, Langerhansa saliņu autoimūnajā iekaisumā (insulītā). Šo procesu pavada auto-antivielu parādīšanās, pakāpeniska β -šūnu funkcijas izsīkšana un slimības klīniskās izpausmes. 1. tipa cukura diabēta autoimūno dabu

apstiprina arī tā bieža koincidence ar citām autoimūnām slimībām, piemēram, autoimūno tireoidītu (Huber *et al.*, 2008).

1. tipa cukura diabēta klīniskie simptomi izriet no hiperglikēmijas un tās radītiem osmotiskās regulācijas traucējumiem: slāpes, hipotensija, nespēks, poliūrija, redzes traucējumi, parestēzijas. Slimībai parasti ir akūts sākums. Akūta 1. tipa cukura diabēta komplikācija ir ketoacidotiskā koma – smaga insulīna deficīta rezultāts un tā veidojas tāpēc, ka notiek ātra enerģijas krājumu mobilizācija no muskuļiem un taukaudiem, kas noved pie palielināta aminoskābju pieplūduma aknām ar sekojošu glikoneoģenēzi vai ketonvielu (acetoacetāta, β -hidroksibutirāta, acetona) veidošanos aknās no taukskābēm. Tā rezultātā palielinās plazmas osmolaritāte, notiek dehidratācija, pazeminās plazmas pH, kas kopumā izraisa nervu sistēmas nomākumu, kardiovaskulārās sistēmas kolapsu un komu (Greenspan FS, Gardner DG. Basic and Clinical Endocrinology, 2004).

1. tipa cukura diabēta ārstēšana nav iedomājama bez insulīna eksogēnas pievades. Mūsdienās to var panākt ar dažādu veidu insulīna injekcijām un insulīna sūkņiem. Dažās valstīs tiek veikta aizkuņģa dziedzera vai Langerhansa saliņu, β -šūnu vai cilmes šūnu transplantācija (Dufrane *et al.*, 2012).

1.1.2. 2. tipa cukura diabēts - epidemioloģija, patoģenēze, klīniskā aina un terapijas iespējas

2. tipa diabēta tips veido 90-95% visu cukura diabēta gadījumu. Šo diabēta tipu pārsvarā raksturo insulīna rezistence perifērajos insulīnatkarīgajos audos (pamatā skeleta muskuļos, taukaudos un aknās), kā arī insulīna sekrēcijas deficīts – visbiežāk relatīvs. 2. tipa cukura diabēta izplatība atšķiras dažādās populācijās: no 5-10% Eiropas populācijās, 15-20% spāņu izcelsmes amerikāņiem, un vairāk nekā 50% - Pima indiāņiem (King *et al.*, 1993).

2. tipa cukura diabēta etioloģiskie faktori nav līdz galam izpētīti, tomēr epidemioloģisku pētījumu gaitā ir kļuvis skaidrs, ka šīs slimības izcelsmē nozīmīgi ir ģenētiskie un vides faktori. 2. tipa cukura diabēts bieži izpaužas vienas ģimenes locekļiem, un tā sastopamība monozigotiem dvīņiem (~70%) ir daudz augstāka, salīdzinot to ar dizigotiem dvīņiem (20–30%).

Tāpat tiek uzskatīts, ka etniskās atšķirības 2. tipa CD pārsvarā varētu tikt izskaidrotas ar ģenētiskiem faktoriem. Pēdējo gadu laikā, pateicoties Genome Wide Association Study (GWAS), tika identificēti 58 saslimšanu ar 2. tipa diabētu veicinoši ģenētiskie lokusi, no kuriem 39 tika identificēti Eiropas populācijās un 19 Āzijas populācijās. Lielākā daļa iesaistīto gēnu ietekmē aizkuņģa dziedzera β -šūnu funkciju (apkopojis Qi *et al.*, 2012).

Vienlaikus ar 2. tipa cukura diabētu bieži attīstās aptaukošanās un metabolais sindroms, kuri abi ir uzskatāmi par riska faktoriem 2. tipa cukura diabēta nelabvēlīgākai attīstībai (Beck-Nielsen *et al.*, 1994, Carey *et al.*, 1997). Arī zems fiziskās aktivitātes līmenis veicina noslieci uz 2. tipa cukura diabēta attīstību (Perry *et al.*, 2005).

2. tipa cukura diabēta patofizioloģisko faktoru pamatā ir perifēro audu rezistence pret insulīnu, kā arī insulīna sekrēcijas defekts (sākotnēji – relatīvs, vēlāk – absolūts). Glikēmijas pieaugums notiek, kad asins plazmā ieplūstošās glikozes daudzums pārsniedz glikozes utilizācijas līmeni perifērajos audos. Tukšā dūšā hiperglikēmija diabēta slimniekiem ir tiešā veidā saistīta ar palielinātu glikoneoģenēzi (glikozes biosintēzi aknās). Pēc ēšanas glikozes līmeņa svārstības notiek tāpēc, ka glikoneoģenēze netiek efektīvi nomākta, kā arī tāpēc, ka nepietiekamas insulīna sekrēcijas rezultātā glikoze netiek pietiekoši intensīvi absorbēta mērķa audos, pārsvarā skeleta muskuļos. Kad tiek pārsniegts glikozes transporta maksimums nieru kanālīšos, tālāko glikēmijas pieaugumu daļēji ierobežo glikozūrija.

Traucēta aizkuņģa dziedzera saliņu funkcija ir galvenā un vadošā un nepieciešamā 2. tipa cukura diabēta pazīme. Agrīnajos slimības posmos insulīna produkcija ir normāla vai palielināta, tomēr tā ir neproporcionāli zema attiecībā pret insulīna jutības līmeni, kurš ir būtiski pazemināts. Turklāt insulīna kinētika, kā arī aizkuņģa dziedzera β -šūnu spēja sekretēt adekvātu hormona daudzumu pieaugošas glikēmijas apstākļos, ir patoloģiski izmainīta. Funkcionālā saliņu mazspēja ir galvenais kvantitatīvais hiperglikēmijas noteicējs un ar laiku tas progresē.

Papildus, pie 2. tipa cukura diabēta aizkuņģa dziedzera alfa šūnas hipersekretē glikagonu, tālāk veicinot glikozes veidošanos aknās. Svarīgi, ka saliņu disfunkcija ne vienmēr ir neatgriezeniska. Uzlabojot insulīna darbību, tiek atvieglota β -šūnu sekretorā nasta, kā arī jebkura darbība, kas samazina glikēmiju — no uzņemtās enerģijas daudzuma līdz bariatriskai ķirurģijai – var uzlabot β -šūnu funkciju. Ne tik sen atklātie traucējumi inkretīnu sistēmā (kuru pārstāv zarnu hormoni: glikagonam līdzīgais peptīds 1 (GLP-1) un glikozes atkarīgais insulīnotropais peptīds 1) arī pastāv pie 2. tipa cukura diabēta, tomēr nav skaidrs, vai tie pieder pie primāriem vai sekundāriem defektiem.

2. tipa diabēta pacientu pārkumam, īpaši pacientiem ar aptaukošanos, insulīna rezistence mērķa orgānos (aknas, muskuļi, taukaudi, miokards) ir nozīmīga pazīme. Tā veidojas kā glikozes pārprodukcijas, tā arī tās nepietiekamas utilizācijas dēļ. Turklāt palielināta taukskābju pieplūde aknām veicina to oksidāciju, kas sekmē glikoneoģenēzi. Tajā pašā laikā lipīdu palielinātā pieejamība veicina hepatosteatozi (apkopojis Enzucchi *et al.*, 2013).

Insulīna rezistenci veicina arī iekaisums, kas attīstās organismā, uzkrājoties taukiem ektopiskajās vietās – viscerālajā tauku slānī un aknās (van Greevenbroek *et al.*, 2013). Perorālo antidiabētisko līdzekļu darbība pie 2. tipa cukura diabēta tiek mērķēta uz vienu vai vairākiem patofizioloģiskiem defektiem, vai arī modificē fizioloģiskos procesus, kas saistās ar apetīti, barības vielu uzsūkšanu vai ekskrēciju (apkopojā Enzucchi *et al.*, 2013).

2. tipa cukura diabētam ir raksturīgi tādi klasiski diabēta simptomi kā slāpes, poliūrija, redzes traucējumi, parestēzijas un nogurums, kuri parasti attīstās pakāpeniski. Hroniska hiperglikēmija noved pie persistējošas ādas niezes, ādas infekcijām vai sievietēm – hroniska vaginīta. Pie 2. tipa cukura diabēta un aptaukošanās tauki visbiežāk novietojas augšējās ķermeņa daļās (krūtīs, vēders, kakls, seja), kā arī viscerālo tauku slānī un aknās. Laboratoriskajos izmeklējumos konstatē hiperglikēmiju, glikozūriju un bieži vien arī dislipidēmiju (Greenspan FS, Gardner DG. Basic and Clinical Endocrinology, 2004).

2. tipa cukura diabēta ārstēšanu uzsāk ar diētas korekciju un fiziskās aktivitātes ieviešanu ikdienas režīmā ar mērķi samazināt svaru un tādējādi samazināt insulīna rezistenci. Ja glikozes līmeni neizdodas normalizēt, tiek uzsākta hipoglikemizējoša ārstēšana. Gadījumos, kad insulīna sekrēcija nav būtiski samazināta, to uzsāk ar perorāliem antidiabētiskiem līdzekļiem: biguanīdiem (metformīns), sulfonilurīnvielām, DPP-4 inhibitoriem, tiazolidindioniem, meglitinīdiem, α -glikozidāzes inhibitoriem, SGLT-2-inhibitoriem. Pie izteiktas adipozitātes apsverama arī ārstēšana ar GLP-1 receptoru agonistiem (injicējami neinsulīna preparāti) vai bariatrisko ķirurģiju. Ja nepieciešams, terapijai tiek pievienots insulīns (apkopojis Inzucchi *et al.*, 2013).

1.2. Cukura diabēta modeļi dzīvniekos

Eksperimentālie cukura diabēta modeļi dzīvniekos ļauj analizēt šīs slimības izraisītās bioķīmiskās, hormonālās un morfoloģiskās izmaiņas dzīvnieka organismā (*in vivo*) un arī pēc tā nāves. Šai stratēģijai ir lielas priekšrocības, tomēr nedrīkst aizmirst, ka neviens dzīvnieku cukura diabēta modelis pilnībā neatkārtō cilvēka 1. vai 2. tipa cukura diabēta patofizioloģiskos mehānismus.

XX un XXI gadsimtā tika izgudroti un pielietoti vairāki dzīvnieku cukura diabēta modeļi: β -šūnu ķīmiska destrūcija, β -šūnu masas ķirurģiska ekstirpācija vai pat daļēja pankreatektomija, ventromediāla hipotalāma bojājums, barošana ar modificētiem barības veidiem (ar paaugstinātu tauku vai cukuru saturu), nepietiekoša barošana *in utero*, lielas kontregulatoro hormonu - īpaši glikokortikoīdu – devas, ilgstoša pakļaušana

hiperinsulinēmijai. Liela daļa no eksperimentālajiem cukura diabēta modeļiem balstās uz transgēno dzīvnieku vai dzīvnieku ar „izslēgtiem” (knock-out) gēniem izmantošanu (Islas-Andrade *et al.*, 2000).

1.2.1. 1.tipa cukura diabēta modeļi

1.2. tabulā ir apkopoti 1. tipa cukura diabēta modeļu veidi.

1.2.tabula. 1.tipa diabēta modeļu apkopojums

Ierosināšanas mehānisms	Modelis
Ķīmiska ierosināšana	Streptozotocīns dažādās devās Aloksāns
Spontāns autoimūns diabēts	NOD peles BB žurkas LEW.1.AR1/-iddm žurkas
Ģenētiski ierosināts diabēts	AKITA peles PERK $-/-$ peles
Aizkuņģa dziedzera masas samazināšana	Dzīvnieki pēc pankreatektomijas
Vīrusu inducēts diabēts	Koksaki B vīruss Encefalomiokardīta vīruss Kilhama žurkas vīruss

1.2.1.1. Ķīmiski ierosināti 1. tipa cukura diabēta modeļi

Aloksāna CD modelis. Aloksāns kļuva par pirmo diabetogēno vielu, kad, pētot urīnvielas atvasinājumu nefrotoksicitāti, nejauši tika konstatēta Langerhansa saliņu nekroze. Aloksāns ir hidrofila un nestabila viela, tā pussabrukšanas periods pie neitrālā pH un 37 °C ir apmēram 1,5 minūte, bet pie zemākām temperatūrām – ilgāks. Tomēr, lietojot diabetogēnā devā, aloksāna farmakokinētiskie rādītāji atļauj tam sasniegt aizkuņģa dziedzera kaitīgu koncentrāciju. Aloksāns šķīst ūdenī un tam piemīt augsta afinitāte pret tiola grupām un Zn^{2+} , tas inhibē heksokināzi un citus enzīmus. *In vitro* aloksāns uzrāda specifisku citotoksisku un inhibējošu iedarbību uz β -šūnām. Aloksāna darbības mehānismi uz β -šūnām ietver sevī stabilizējošo SH grupu oksidāciju insulīna molekulā, glikokināzes inhibīciju, brīvo radikāļu ģenerēšanu un šūnas kalcija homeostāzes traucējumus (Szkudelski *et al.*, 2001). Dažu

pētnieku dati liecina par to, ka aloksāns specifiskā veidā iedarbojas uz β -šūnu membrānu, izraisot šo šūnu nekrozi. Ir dati, kas liecina, ka DNS fragmentācija β -šūnās var būt atbildīga par aloksāna diabetogenu iedarbību, un to var izraisīt superoksīda vai hidroksilradikālu, kā arī H_2O_2 akumulācija (Islas-Andrade *et al.*, 2000). Dzīvniekiem aloksāna ievadīšana izraisa smagu insulīna deficītu ar ketozi. Aloksānu zemās devās joprojām izmanto CD ierosināšanai dzīvniekiem, un šim modelim ir raksturīga mērena hiperglikēmija, daļējs insulīna deficīts un insulīna rezistence, taču - bez ketozes. Tāpat tika ziņots, ka organisma jutība pret šo savienojumu ir atkarīga no dzīvnieka sugas, dzimtas, vecuma, dzimuma un barojuma. Daži zinātnieki ir ziņojuši par diabētiskā stāvokļa atgriezenisko raksturu pie aloksāna inducētā diabēta, kā arī par samērā lielu dzīvnieku mirstību. Cilvēka aizkuņģa dziedzerā salinās ir daudz vairāk izturīgas pret aloksānu nekā peles vai žurkas salinās (Lenzen *et al.*, 2008). Visbiežāk izmantotā intravenozā aloksāna deva žurkām ir 65 mg/kg, bet pie intraperitoneālās ievadīšanas efektīvai devai jābūt ap 150 mg/kg, pie kam neēduši dzīvnieki ir vairāk uzņēmīgi pret aloksānu. Aloksāna diabētu izmanto arī eksperimentos ar lielajiem dzīvniekiem – suņiem, primātiem, cūkām (King *et al.*, 2012).

Streptozotocīna diabēta modelis. Streptozotocīns (STZ) ir nitrozourīnvielas atvasinājums, kuru izolēja no aktinomicētu baktērijas *S. Achromogenes* (King *et al.*, 2012). Tas var izraisīt smagu insulīna deficīta izraisītu diabētu grauzējiem un citām sugām, ja to ievada vai nu vienreizēji devā 50-100 mg/kg, vai atkārtoti zemās devās; pēdējā gadījumā diabēts attīstās lēnāk un tam ir vairāk autoimūns, nevis toksisks izcelsmes mehānisms. Vienas streptozotocīna *i/v* vai *i/p* devas izraisīts cukura diabēts ir droši vien vispopulārākais cukura diabēta modelis. Devā, kas nepārsniedz 50-60% no maksimālās, STZ ietekmē insulīna produkciju krītas līdz 10-30% no normālās, rezultātā attīstas hiperglikēmija, poliūrija, svara zudums un slāpes, tomēr visbiežāk ketoze neattīstās, un dzīvnieki var izdzīvot vairāku nedēļu garumā bez insulīna injekcijām. Pie lielākām insulīna devām rodas pilnīgs insulīna deficīts, ketoze, un dzīvnieki nespēj izdzīvot bez insulīna ievadīšanas.

STZ nokļūst β -šūnās ar glikozes transportiera GLUT2 palīdzību. STZ izraisa β -šūnu nekrozi, bojājot to membrānu un izraisot DNS pārrāvumus, kā arī poli(ADP-ribozes) polimerāzes (PARP) aktivāciju un NAD resursu izsīkumu. Pēc literatūras datiem, galvenais STZ-izraisītais β -šūnu nāves iemesls ir DNS alkilēšana. STZ alkilējoša aktivitāte ir saistīta ar tā nitrozurīnvielas atlikumu, īpaši guanīnu O⁶ pozīcijā.

Iespējams, ka STZ ir NO[•] donors, un NO[•] varētu būt iesaistīts aizkuņģa dziedzerā β -šūnu destrukcijā. Tika izteikta hipotēze, ka tieši šī molekula - radikāls veicina STZ-ierosināto DNS bojājumu veidošanos. NO[•] iesaiste STZ citotoksiskās iedarbības mehānismā tika apstiprināta eksperimentāli, jo pēc STZ ievadīšanas β -šūnās konstatēja palielinātu

guanilātciklāzes aktivitāti un pastiprinātu cGMP veidošanos. Tomēr pastāv arī iespēja, ka STZ nav NO[•] donors, un NO[•] veidojas STZ inducēto metabolo procesu izmaiņu rezultātā šūnās, no NOS neatkarīga procesa rezultātā (Szkudelski *et al.*, 2001).

Ir parādīts, ka NO[•] saistītāji var samazināt STZ-izraisītu DNS bojājumu. Arī citi brīvie radikāļi, kuri veidojas STZ ietekmē, ir iesaistīti STZ-izraisītajā DNS fragmentācijā: superoksīda anjons, kurš veidojas mitohondriālās disfunkcijas un palielinātas ksantīna oksidāzes aktivitātes dēļ, un veicina ūdeņraža peroksīda un hidroksilradikāļu veidošanos (Islas-Andrade *et al.*, 2000). Ksantīna oksidoreduktāzes kavēšana ar allopurinolu spēja daļēji kupēt STZ-izraisītu insulīna sekrēcijas samazinājumu, iespējams - pateicoties NO[•] un augsti toksiskā peroksinitrīta veidošanās kavēšanai. Varētu pieņemt, ka intracelulārie antioksidanti un NO[•] saistītāji lielā mērā spēj novērst STZ citotoksisko efektu inhibējot PARP. Šis apgalvojums tika apstiprināts eksperimentos ar PARP inhibitoriem - 3-aminobenzamīdu un nikotinamīdu. Ja šīs vielas ievada dzīvniekiem īsi pēc STZ ievadīšanas, hiperglikēmijas attīstība tiek daļēji vai pilnībā novērsta. Tādējādi jāsecina, ka DNS ribozilēšana ir svarīgs STZ citotoksiskā efekta mediators (Szkudelski *et al.*, 2001).

STZ izraisīto cukura diabēta modeli raksturo diabētiskā stāvokļa stabilitāte vairāku nedēļu garumā un samērā zema dzīvnieku mirstība. Šo diabēta modeli var pielietot ne tikai diabētam līdzīgu simptomu izraisīšanai grauzējiem, bet arī cūkām un primātiem (Lenzen *et al.*, 2008).

1.2.1.2. Spontānie autoimūnie 1. tipa diabēta modeļi

Visbiežāk izmantojamie autoimūnie 1. tipa cukura diabēta modeļi ir neaptaukojušies diabētiska pele (NOD mouse - non-obese diabetic mouse) un „Biovairotā” (*Bio-breeding*, BB) žurka. NOD pelēm insulīts attīstās 3-4 nedēļu vecumā, un tam ir raksturīga CD4⁺ un CD8⁺ limfocītu, β-šūnu un NK šūnu infiltrācija. Šis process noved pie β-šūnu bojāejas, un diabēts pilnībā izpaužas 10-14 nedēļu vecumā, kad jau ir nepieciešams uzsākt insulīna injekcijas. Šis ir dārgs diabēta modelis, jo NOD peles nepieciešams uzturēt sterilos apstākļos, kā arī diabēta izpausmes vecums tām variē. Tiek pētītas NOD modeļa ģenētiskās un citas modifikācijas. BB žurkas tika selekcionētas no Wistar žurkām, atlasot kolonijas ar spontānu autoimūnu diabētu. Šīm žurkām diabēts attīstās pēc dzimumbrieduma iestāšanās (starp 8 un 16 vecuma nedēļi). BB žurkām diabēts ir diezgan smags, tas attīstās insulīta dēļ, un tā ārstēšanai ir nepieciešamas insulīna injekcijas. Tomēr atšķirībā no 1. tipa CD cilvēkiem un NOD pelēm,

BB žurkām novēro arī limfopēniju, kas nav vēlama pazīme 1. tipa CD patoģenēzes izpētes kontekstā.

Vēl viens autoimūns 1. tipa cukura diabēta modelis ir izveidots, lietojot LEW.1.AR1/-iddm žurkas, kuras tika selekcionētas, izmantojot spontānas Lewis žurku kolonijas ar noteiktu MHC haplotipu (LEW.1.AR1). Šīm žurkām arī veidojas insulīts, un smags diabēts tām attīstās 8-9 nedēļu vecumā. Pretēji NOD pelēm un BB žurkām, LEW-iddm žurkām neattīstās citas autoimūnās slimības, tās labi izdzīvo arī smaga diabēta apstākļos un tādējādi tās var tikt izmantotas diabētisko komplikāciju izpētē (King *et al.*, 2012).

1.2.1.3. Dzīvnieku modeļi ar endoplazmatiskā tīkla stresa izraisītu pastiprinātu β-šūnu apoptozi

Akita peles. Akita pelēm ir spontāna mutācija INS 2 gēnā, kura noved pie proinsulīna 2 mutantās formas produkcijas, un izraisa agrīnu diabētu bez aptaukošanās un ar samazinātu β-šūnu daudzumu (Masiello *et al.*, 2006). Uzskata, ka β-šūnu daudzuma samazināšanās notiek ER stresa dēļ, jo tajā uzkrājas anomāls proinsulīns 2, kas izraisa šūnas disfunkciju un nāvi (King *et al.*, 2012). Līdzīga situācija varētu rasties pie Volframa sindroma - retas cukura diabēta ģenētiskās formas cilvēkiem. Ar endoplazmatiskā tīkla stresu saistīta β-šūnu bojāeja vērojama arī PERK -/- pelēm un Wolcott-Rallison sindromā slimniekiem (diabēts bērnībā ar agrīnu aizkuņģa dziedzera β-šūnu destruktiju un osteodistrofiju) (Rees *et al.*, 2004).

1.2.1.4. Dzīvnieku modeļi ar samazinātu β-šūnu masu pēc pankreatektomijas

Lai izraisītu mērenu hiperglikēmiju, dažādām sugām ir nepieciešama atšķirīga apjoma pankreatektomija: 50–75% cilvēkam, 60–70% cūkām, vairāk kā 80% žurkām (Masiello *et al.*, 2006). Šo diabēta modeli biežāk izmanto lielajiem dzīvniekiem – suņiem, primātiem, cūkām.

Ja žurkām iznīcina 95% pankreasa, attīstās smaga hiperglikēmija (Chen *et al.*, 2005). Dzīvnieki pēc pankreatektomijas ir labs modelis, lai pētītu atlikušo β-šūnu adaptācijas mehānismus (King *et al.*, 2012).

1.2.1.5. Vīrusu izraisīti 1. tipa cukura diabēta modeļi

Vīrusu loma 1. tipa cukura diabēta patoģenēzē tiek plaši pētīta, veidojot diabēta modeļus, kuros vīrusi izraisa β-šūnu destruktiju. Šie bojājumi sākas vai nu tiešas vīrusa

iedarbības rezultātā, vai arī kā autoimūnās atbildes pret vīrusa-inficēto β -šūnu sekas. Šiem mērķiem tiek izmantoti Koksaki B vīruss, encefalomiokardīta vīruss, Kilham žurkas vīruss un transgēnie vīrusa modeļi, kuros virālais antigēns tiek ekspressēts žurkas insulīna promoterī. Šīm žurkām β -šūnu destrukcija nesākas spontāni, bet to var inducēt, injicējot žurkām vīrusu antigēnus un ierosinot imūno krustenisko reakciju, kura tiek vērsta pret β -šūnām. Diabēta attīstības ātrumu un efektivitāti ir grūti paredzēt, jo tā ir atkarīga no vīrusa replicēšanās efektivitātes β -šūnās (King *et al.*, 2012).

1.2.2. 2. tipa cukura diabēta modeļi

Dzīvnieku 2. tipa cukura diabēta modeļu apkopojums dots 1.3. tabulā.

1.3.tabula. **Apkopojums par 2.tipa diabēta modeļiem**

Ierosināšanas mehānisms	Modelis
Monogēnie aptaukošanās modeļi	Lep ^{ob/ob} peles LEPR ^{db/db} peles Zucker diabētiskās žurkas ar aptaukošanos
Poligēnie aptaukošanās modeļi	KK peles OLETF žurkas NZO peles TallyHo/Jng peles NoncNZO10/LtJ peles
Modeļi ar ierosinātu aptaukošanos	Peles un žurkas, kuras saņem barību ar paaugstinātu tauku saturu Tuksneša smilšu peles - aptaukojas vivārija standartapstākļos Nīla zāles žurkas - aptaukojas vivārija standartapstākļos
Modeļi bez aptaukošanās	Goto-Kakizaki žurkas Dzīvnieki ar samazinātu β -šūnu daudzumu, ko izsaukusi aizkavēta intrauterīnā augšana Streptozotocīna nikotinamīda diabēta modelis
Ģenētiski β -šūnu disfunkcijas modeļi	hIAPP peles AKITA peles

1.2.2.1. 2. tipa cukura diabēta modeļi ar aptaukošanos

2. tipa cukura diabēta monogēnie modeļi ar aptaukošanos: Zucker diabētiskās žurkas, Lep^{ob/ob} peles, LEPR^{db/db} peles

Zucker diabētiskās žurkas stipri aptaukojas leptīna receptora ģenētiska defekta rezultātā. Zucker tuklās žurkas kompensē ar aptaukošanos saistīto insulīna rezistenci, ģenerējot vairāk

β -šūnu un palielinot insulīna sekrēciju. Ar selekcijas palīdzību izdevās izveidot diabētisko tuklo Zucker žurku tēviņu koloniju, kurām diabēts attīstās intensīvākas β -šūnu apoptozes rezultātā, ko izsauc kāds cits ģenētisks defekts (Masiello *et al.*, 2006). Šīm žurkām novēro glikotoksicitātes un lipotoksicitātes izraisītu Pdx-1 nomākumu. Ar leptīna deficītu ir saistīti arī divi peļu aptaukošanās modeļi - Lep^{ob/ob} peles (ob/ob peles), kurām ir novērots leptīna deficīts, un LEPR^{db/db} peles (db/db peles), kurām ir raksturīgs leptīna receptora deficīts (King *et al.*, 2012).

2. tipa cukura diabēta grauzēju poligēnie modeļi ar aptaukošanos: KK peles, OLETF žurkas, NZO peles, TallyHo/Jng peles, NoncNZO10/LtJ peles

Šie modeļi tiek izmantoti 2. tipa CD patoģenēzes pētījumos, un tiem ir dažādi genotipi. Tomēr, pretēji monogēniem modeļiem, tiem nav atbilstošo savvaļas dzīvnieku, kas būtu nepieciešami adekvātu kontroles grupu veidošanai. Šiem modeļiem izmanto KK peles, OLETF žurkas, Jaunzēlandes tuklās peles (NZO peles), TallyHo/Jng peles, NoncNZO10/LtJ peles (King *et al.*, 2012).

2. tipa cukura diabēta modeļi ar ierosinātu grauzēju aptaukošanos

Aptaukošanos laboratorijas apstākļos ierosina, izmantojot barību ar augstu tauku saturu. Šāda diēta grauzējiem izsauc hiperinsulinēmiju, aptaukošanos un izmaina glikozes homeostāzi, iespējams tāpēc, ka aizkuņģa dziedzerā Langerhansa saliņu kompensatorās funkcijas nav pietiekamas. Standarta barību (kuras enerģētisko vērtību nosaka apmēram 26% proteīna, 63% ogļhidrātu un 11% tauku) šajā gadījumā aizvieto ar diētu, kurā tauku ieguldījums enerģijas ražošanai ir ievērojami palielināts (parasti līdz 58%) (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009). Lietojot šo diētu vairākas nedēļas, grauzēji aptaukojas, viņiem attīstās insulīna rezistence un glikozes tolerances traucējumi. Barošanu ar trekno barību dažkārt kombinē ar streptozotocīna injekcijām mazās devās (Zhang *et al.*, 2008) vai palielinātu ogļhidrātu (saharozes vai fruktozes) daudzumu barībā.

Spontāns metabolais sindroms ir novērojams tuksneša smilšu pelēm un Nīla zāles žurkām, kurām aptaukošanās un hiperglikēmija attīstās, tās laboratorijas apstākļos ilgstoši barojot ar standarta barību, taču šiem dzīvniekiem nenovēro hiperfāģiju (King *et al.*, 2012).

Uzskata, ka šie dzīvnieki ir labs modelis „taupīgā genotipa”(„thrifty genotype”) izpētei (Chen *et al.*, 2005).

1.2.2.2. 2. tipa cukura diabēta modeļi bez aptaukošanās

Goto-Kakizaki (GK) žurkas

Goto-Kakizaki (GK) žurkas ir spontāni diabētiskas, tās var tikt izmantotas, lai imitētu ģenētiski izraisītu 2. tipa CD neaptaukojušos grauzēju modelī. Šī žurku līnija tika iegūta ilgstošas mērķtiecīgas selekcijas rezultātā, atlasot Wistar žurkas bez diabēta, bet ar samazinātu toleranci pret glikozi (Masiello *et al.*, 2006). GK žurkām prenatāli ir samazināta β -šūnu proliferācija un pastiprināta apoptoze, jo tām ir traucēta jaunu Langerhansa saliņu veidošanās. Tā rezultātā šiem dzīvniekiem β -šūnu masa ir samazināta jau no dzimšanas. Šis efekts, šķiet, ir saistīts ar traucētu IGF-2 biosintēzi. Pieaugušajām GK žurkām β -šūnu masa ir samazināta par 50%. Tām novēro mērenu hiperglikēmiju, samazinātu glikozes toleranci un insulīna sekrēciju (King *et al.* 2012).

2.tipa CD modelis ar samazinātu β -šūnu daudzumu, ko izraisa aizkavēta intrauterīnā augšana

CD modeļi ar samazinātu β -šūnu daudzumu žurkām ierosina, ligējot dzemdes artērijas bilaterāli 19. grūtniecības dienā (3 dienas pirms dzemdībām). Tādējādi tiek simulēta nelabvēlīga intrauterīnā vide, kas cilvēkiem izraisa samazinātu jaundzimušo masu, un vēlāk - pieaugušo vecumā - palielina 2. tipa CD attīstības risku. Šīm žurkām, salīdzinot ar kontroli, jaundzimušo masa ir mazāka, bet 26 nedēļu vecumā to masa jau ir lielāka kā kontroles dzīvniekiem. Pieaugot, tās kļūst tuklas un hiperglikēmiskas, kā arī tām ir samazināta β -šūnu masa. Insulīna sekrēcijas traucējumus novēro arī žurkām, kuras piedzimušas mātītēm, kuras barotas ar proteīniem nabadzīgu barību (Masiello *et al.*, 2006).

Streptozotocīna- nikotīnamīda (STZ-NA) diabēta modelis

STZ-NA modelim ir līdzība ar cilvēka 2. tipa CD ar samazinātu β -šūnu masu. Šis cukura diabēta modelis tiek ierosināts, kombinējot STZ, kurš ir citotoksisks aizkuņģa dziedzera β -šūnām, ar nikotīnamīdu, kurš spēj daļēji aizsargāt β -šūnas no STZ iedarbības. Atkarībā no STZ un nikotīnamīda devu attiecībām, šīs kombinācijas ievadīšanas rezultātā eksperimentālajiem dzīvniekiem novēro nedaudz, mēreni vai izteikti samazinātu insulīna

sekrēciju (Szkudelski *et al.*, 2013). STZ-NA dzīvnieku β -šūnas ir tikai daļēji bojātas un spēj sekretēt insulīnu, reaģējot uz glikozi vai citiem stimuliem. Tādējādi šo modeli bieži vien izmanto, lai testētu medikamentu vai endogenu vielu glikozes pazeminošo aktivitāti, kā arī - lai pētītu aizkuņģa dziedzera reģenerācijas spējas. (Masiello *et al.*, 2006).

Dzīvnieku modeļi ar pastiprinātu β -šūnu apoptozi Langerhansa saliņu amiloīda IAPP ietekmē

Amiloīda depozīti, kurus veido saliņu amiloīdais polipeptīds (IAPP), kurš tiek sekretēts kopā ar insulīnu, tiek novēroti gandrīz visiem pacientiem ar 2. tipa CD. IAPP amiloīdu izgulsnēšanās korelē ar samazinātu β -šūnu masu. Tomēr to loma cukura diabēta patofizioloģijā tiek pretrunīgi vērtēta (Masiello *et al.*, 2006).

Ir zināmi daži spontāni radušies vai ģenētisku modifikāciju inducēti saliņu amiloīda palielinātas produkcijas dzīvnieku modeļi. Primātiem ir novērots palielināts amiloīda nogulšņu daudzums saliņās, un tas pozitīvi korelē ar β -šūnu bojāeju. Arī mājas kaķiem pie diabēta attīstības novēro saliņu IAPP deozītu (King *et al.*, 2012). Grauzējiem ar transgēno IAPP ekspresiju novēro saliņu amiloidozi tikai metabolo noviržu gadījumos, t.i. ja dzīvnieki tiek baroti ar treknu barību, vai arī grauzēju aptaukošanās, insulīna rezistences un β -šūnu disfunkcijas modeļos (piemēram, ob/ob peles) (Chen *et al.*, 2005). 2004. gadā tika iegūta cilvēka IAPP transgēnās žurkas, kurām spontāni ar vecumu attīstās diabēts kopā ar saliņu amiloidozi un samazinātu β -šūnu masu (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009).

1.2.3. Transgēnie un *knockout* cukura diabēta un diabētiskās nefropātijas modeļi

Transgēnie un *knockout* dzīvnieki tiek izmantoti, lai veidotu specifiskus 1. un 2. tipa cukura diabēta modeļus, lai varētu pētīt noteiktu gēnu ietekmi uz glikozes metabolismu un diabēta patoģenēzi, ieskaitot aizkuņģa dziedzera attīstībā iesaistīto transkripcijas faktoru lomu un insulīna signālpārvades ceļus. Šos modeļus bieži izmanto kombinācijā ar izmainītu pārtiku – piemēram, treknu barību. Tabulā 1.4. ir dots pārskats par literatūrā visbiežāk aprakstītajiem transgēnajiem un *knockout* cukura diabēta modeļiem, kā arī dažiem diabētiskās nefropātijas modeļiem.

1.4.tabula. **Apkopojums par transgēniem un *knockout* cukura diabēta un diabētiskās nefropātijas modeļiem**

Ierosināšanas mehānisms	Modelis
Transgēnās peles ar aizkuņģa dziedzera attīstībai nepieciešamo faktoru deficītu	Pdx-1 +/- peles HFN-1 α -/- peles
Transgēnās peles ar β -šūnu augšanu un izdzīvošanu ietekmējošo faktoru deficītu	Insulīna receptora substrāta-2 (IRS-2) -/- peles Transgēnās peles ar dominanti-negatīvo CREB β -šūnās PKB- β -/-peles
Transgēnie diabētiskās nefropātijas modeļi	eNOS <i>knockout</i> peles Nfr2 <i>knockout</i> peles GLUT1 transgēnās peles

1.2.3.1. Transgēnās peles ar aizkuņģa dziedzera attīstībai nepieciešamo faktoru deficītu

Pdx-1 +/- peles. Aizkuņģa dziedzera un divpadsmit pirkstu zarnas transkripcijas faktors 1 (Pdx-1), pazīstams arī kā cilvēku IPF-1, ir transkripcijas faktors, kas nepieciešams aizkuņģa dziedzera un citu priekšējās zarnas struktūru attīstībai. Cilvēkiem un pelēm, kuras neekspresē Pdx-1, novēro neattīstītu aizkuņģa dziedzeri un iedzimtu diabētu. Pdx-1/IPF-1 mutācijas heterozigotā stāvoklī ir asociētas ar vienu no sešām MODY ģenētiskām formām – MODY4 (*maturity onset diabetes in the young*). Pdx-1 spēlē svarīgu lomu arī vēlākā β -šūnu β -diferenciācijā. Transgēnām pelēm Pdx-1+/-, pieaugot vecumam, β -šūnu apoptozes dēļ novēro glikozes tolerances pasliktinājumu, nepietiekamu insulīna sekrēciju, samazinātu β -šūnu masu un Langerhansa saliņu daudzumu. Iespējams, ka β -šūnu apoptoze šajā gadījumā ir saistīta ar IRS-2 (insulin receptor substrate 2) signālpārneses ceļiem (Masiello *et al.*, 2006).

HFN-1 α -/- peles. Transgēnās peles ar izgrieztu hepatocītu nukleāro faktoru 1 α (HFN-1 α) atkārti MODY-3 gadījumā novēroto mutāciju. HFN-1 α -/- pelēm, tāpat kā MODY-3 pacientiem, novēro defektīvu sekretoro atbildi uz glikozes un arginīna stimulāciju, tomēr β -šūnu masa neatšķiras no kontroles dzīvniekiem. Tādējādi šķiet, ka HFN-1 α vairāk ir iesaistīts β -šūnu diferenciācijā, nevis to masas regulācijā (Masiello *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Transgēnās peles ar β -šūnu augšanu un izdzīvošanu ietekmējošu faktoru deficītu

Insulīna receptora substrāta-2 (IRS-2) $-/-$ peles. Insulīna substrāta-1 (IRS-1) vai IRS-2 gēna izgriešana izraisa smagu insulīna rezistenci, kas bija sagaidāms, ņemot vērā šīs molekulas lomu insulīna signālpārvades ceļos insulīna mērķaudos. Tomēr IRS-1 $-/-$ peles nekļūst diabētiskas, jo pieaug β -šūnu masa, kas kompensē insulīna rezistenci. Pretēji tam, IRS-2 $-/-$ pelēm 12-16 nedēļu vecumā attīstas smags diabēts ar progresējošu hiperglikēmiju - līdz pat 400 mg/dl, jo šo dzīvnieku β -šūnu masa nespēj kompensatori palielināties un ir pakļautas pastiprinātai apoptozei. Pdx-1 ekspresija nav izmainīta IRS-1 $-/-$ pelēm, bet ir samazināta IRS-2 $-/-$ pelēm, domājams, transkripcijas faktora Foxo-1 inhibējošās iedarbības dēļ, kas, pateicoties traucējumiem IRS-2 signālpārvades ceļos, netiek fosforilēts un paliek kodolā (Chen *et al.*, 2005, Masiello *et al.*, 2006).

Transgēnās peles ar dominanti-negatīvo CREB β -šūnās. CREB fosforilēšana, kuru ierosina glikagonam līdzīgais peptīds 1 (GLP-1) vai citi cAMP agonisti, veicina insulīna un IRS-2 gēna ekspresiju. Transgēnām pelēm, kuras β -šūnās ekspresē dominanti-negatīvo CREB inhibitoru A-CREB, IRS-2 ekspresija ir traucēta, un palielinātas apoptozes rezultātā tām novēro samazinātu β -šūnu masu, ar sekojošu seruma glikozes koncentrācijas pieaugumu un insulīna līmeņa samazinājumu (Chatzigeorgiou *et al.*, 2009, Masiello *et al.*, 2006).

PKB $-/-$ peles. β -šūnu izdzīvošanai svarīga ir IRS-2 kontrolēto signālpārvades ceļu aktivācija. PKB- β - $-/-$ pelēm novēro perifēro insulīna rezistenci, mērenu hiperglikēmiju un bazālo hiperinsulīnēmiju, kā arī palielinātu β -šūnu masu. Arī PKB substrāti ietekmē β -šūnu daudzumu, replicēšanos, izdzīvošanu un diferenciāciju. To ablācijas rezultātā dzīvniekiem novēro zemu glikozes toleranci un samazinātu β -šūnu masu (King *et al.*, 2012).

1.2.3.3. Diabētiskās nefropātijas modeļi dzīvniekos

Šajā darbā uzsvars ir likts uz diabētisko komplikāciju, it īpaši diabētiskās nefropātijas, patoģenēzes izpēti. Tādējādi apskatīsim diabētiskās nefropātijas modeļus dzīvniekos.

Diabētiskā nefropātija ir diabēta izraisīts nieru bojājums. Cilvēkiem tā izpaužas kā klīnisks sindroms, kuru veido albumīnūrija, progresējošs glomerulu filtrācijas ātruma samazinājums un palielināts kardiovaskulāro slimību risks. Dzīvnieku diabētiskās nefropātijas modeļi ļautu labāk izprast šīs diabēta komplikācijas iemeslus un attīstības faktoros.

Labā diabētiskās nefropātijas modeļa izveidošanu ierobežo vairāki faktori. Pirmkārt, cilvēkiem diabētiskā nefropātija ir vēlīna cukura diabēta komplikācija, taču dzīvnieku modeļos izmaksu un laika trūkuma dēļ izmanto jaunus dzīvniekus ar svaigi ierosinātu cukura diabētu. Tādējādi, šiem dzīvniekiem nav nieru mazspējas.

Bieži vien pretrunīga ir arī nieru funkcijas novērtēšana dzīvniekiem. Problemātiska ir gan seruma kreatinīna novērtēšanas metožu adaptācija dzīvnieku fizioloģijai, glomerulu filtrācijas ātruma novērtēšanas metodes, albuminūrijas kritēriji un nieru histoloģisko izmaiņu izvērtēšana. Diabētisko nefropātiju pēta uz daudziem no augstāk aprakstītiem cukura diabēta modeļiem, vadoties pēc principa, ka diabēts un hiperglikēmija *per se* ir galvenie šo sindromu izraisošie un veicinošie faktori. Tomēr pastāv arī specifiski diabētiskās nefropātijas modeļi (Breyer *et al.*, 2005).

Defekti endoteliālajā slāpekļa oksīda sintāzē. eNOS *knock-out* peles ir viens no labākajiem diabētiskās nefropātijas modeļiem – dzīvniekiem ar dažādu ģenētisko pamatu un eksperimentālā diabēta iemesliem. Pēc dažiem literatūras datiem hiperglikēmijas apstākļos palielinās endoteliālo šūnu membrānu caurlaidība. Uzskata, ka tas samazina eNOS dimēru veidošanos un fosforilēšanu (mRNS vai proteīna ekspresijas izmaiņas netika konstatētas). Ja izdodas to novērst, samazinās nieru histoloģiskās izmaiņas un oksidatīvā stresa pazīmes.

Tādējādi, šie dati norāda uz eNOS funkcijas izmaiņām diabēta un hiperglikēmijas apstākļos. Turklāt eNOS dimēra atslēgšanās (*uncoupling*) pie diabēta tiek uzskatīta par svarīgu slimības progresijas faktoru un oksidatīvā stresa iemeslu nierēs (Brosius *et al.*, 2013).

Leptīna deficīts vai leptīna receptora mutācijas. Diabētiskās nefropātijas kontekstā daudz pētījumu veltīti db/db un ob/ob pelēm, īpaši to specifiskām līnijām, jo šiem dzīvniekiem glomerulu izmaiņas un albuminūrija attīstas diezgan agrīnā vecumā (Breyer *et al.*, 2005).

Nieru antioksidatīvās aizsardzības modulēšana. Ņemot vērā oksidatīvā stresa postulēto lomu diabētiskās nefropātijas patoģenēzē, tiek pētīta NADPH oksidāzes NOX4 subvienības aktivitātes izmaiņas pie diabētiskās nefropātijas. NOX4 tiek ekspresēta nierēs, un tās aktivitāte palielinās dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētisko nefropātiju. Pētījumos pielieto NOX4 inhibitorus. Oksidatīvā stresa teorijas kontekstā tiek pētītas Nfr2 *knockout* peles (Nfr2 regulē vairāku antioksidantu enzīmu ekspresiju) (Brosius *et al.*, 2013).

GLUT1 ekspresijas un aktivitātes modulēšana. Pēc literatūras datiem GLUT1 palielināta ekspresija nieru šūnās var veicināt glikozes ieplūdi šūnās ar tai sekojošu glikotoksicitāti, iespējams ROS veidošanās dēļ. Pētījumos tiek izmantotas arī GLUT1 transģenētiskās peles. GLUT1 transģenētiskām pelēm ar normālu glikozes līmeni nierēs novēro mezangija izplatīšanos un albuminūriju, bet GLUT1 *antisense* transģenētiskiem dzīvniekiem šādas

izmaiņas nenovēro, kaut arī hiperglikēmiju šīs gēnu manipulācijas nenovērš (Breyer *et al.*, 2005; Gnudi *et al.*, 2007).

1.3. Oksidatīvais stress un NO biosintēze cukura diabēta apstākļos

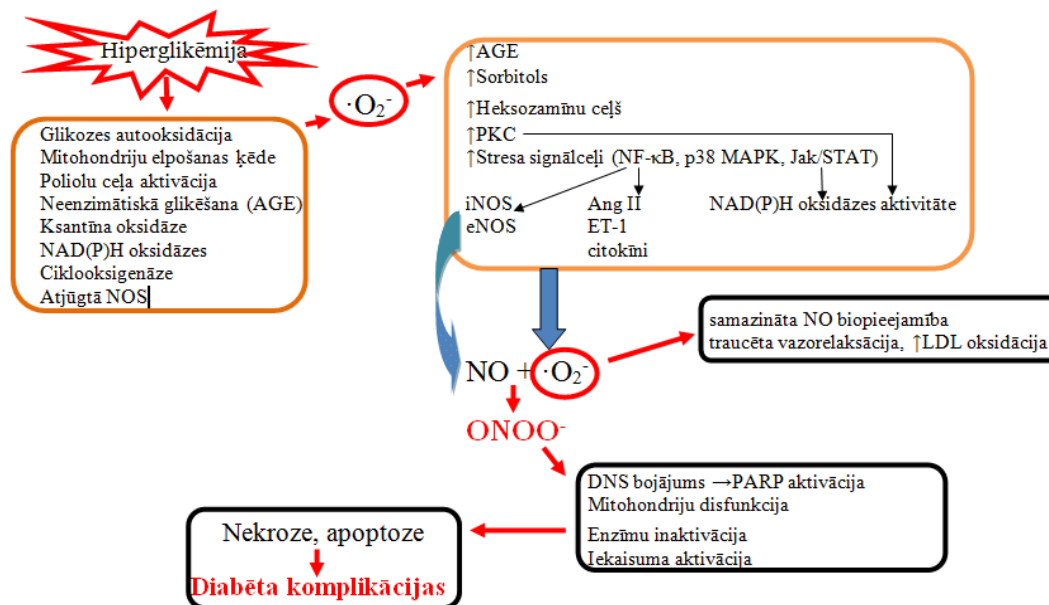
1.3.1. Oksidatīvais stress un diabētisko komplikāciju attīstība

Oksidatīvais stress (jeb oksidantu izraisītais audu bojājums) rodas tad, ja oksidantu un brīvo radikāļu (*reactive oxygen species*, ROS) veidošanās pārsniedz lokālo antioksidatīvās aizsardzības kapacitāti. Ja tas notiek, tiek oksidētas svarīgas makromolekulas, ieskaitot proteīnus, lipīdus, ogļhidrātus un DNS, kas noved pie audu bojājumiem un to funkciju traucējumiem (Giacco *et al.*, 2010). Hiperglikēmija veicina oksidatīvo stresu vairāku iemeslu dēļ (1.1. att.), ieskaitot poliolu ceļa aktivāciju, glikozes autooksidāciju, šūnas oksidantu-antioksidantu līdzsvara izmaiņas, pastiprinātu diacilglicerīnu veidošanos un proteīnkināzes C aktivāciju un paātrinātās glikozilēšanas gala produktu (AGE) veidošanos (Pacher *et al.*, 2007).

Mitohondriju disfunkcija kā oksidatīvā stresa avots. Superoksīda (O_2^-) produkcija mitohondriju disfunkcijas dēļ tika postulēta kā būtiskākā novirze diabētisko komplikāciju attīstībai. Mitohondrijos vairāk par 90% skābekļa tiek patērēts oksidatīvajā fosforilēšanā, kad glikozes un citos metaboliskajos procesos tiek ģenerēti elektroni, kas reducē molekulāro skābekli, un iegūtā enerģija tiek uzkrāta galvenokārt ATF formā.

Fizioloģiskos apstākļos apmēram 1% skābekļa tiek reducēts daļēji - līdz O_2^- , nevis ūdenim. Mitohondrijos ir vismaz divi fermenti, kas ir iesaistīti superoksīda veidošanā – NADH dehidrogenāze (komplekss I) un elpošanas fermentu kopums starp koenzīmu Q (CoQ) un III kompleksu. Ir postulēts, ka diabētisko komplikāciju patoģenēzē mitohondriālā disfunkcija ar palielinātu superoksīda un ūdeņraža peroksīda veidošanos notiek intensīvāk nekā normālos apstākļos.

Vairākos pētījumos hipotēze par mitohondriālo disfunkciju tādos audos, kuri ir pakļauti izmaiņām, attīstoties diabētiskajām komplikācijām, tika apstiprināta. Tāpat arī mērķtiecīga mitohondriālā superoksīda produkcijas inhibīcijai (piemēram, ar idebenonu, kuru izmanto ar elpošanas ķēdes traucējumiem saistītu slimību ārstēšanā), bija labvēlīga ietekme uz slimības gaitu dzīvnieku diabētisko komplikāciju modeļos (Forbes *et al.*, 2013).



1.1.att. Hiperglikēmijas izraisīta oksidatīvā stresa veidošanās mehānismi un NO' iesaistīšanās tajos: superoksīda un peroksinitrīta ietekme. Hiperglikēmija palielina superoksīda anjona ($O_2^{\bullet-}$) produkciju, aktivējot vairākus ceļus, ieskaitot ksantīna un NADPH oksidāzes, NOS atjūgšanu u.c. Superoksīds aktivē AGE, proteīnkināzi C (PKC) un stresa signāltransdukcijas ceļus, kuri veicina turpmāku superoksīda produkciju caur vairākiem mehānismiem. Arī NO produkcija tiek veicināta. Superoksīds var saistīt NO, samazinot tā biopieejamību, bet vienlaikus veidojot peroksinitrītu ($ONOO^-$), kas veicina šūnas bojājumu, izraisot lipīdu peroksidēšanu, enzīmu inaktivāciju u.c. (Adaptēts no Pacher *et al.*, 2007).

Citosola ROS avoti: NADPH, G6PDH un sorbitola-poliolu ceļš. NADPH produkcija leukocītos ir iesaistīta imūnās atbildes reakcijās, kur imūnkompetento šūnu ģenerētais superoksīds palīdz cīnīties ar patogēniem organismiem, tostarp veicinot fagocitozi. Tomēr NADPH subvienības tiek producētas arī citos audos (piemēram, NOX4 nierēs), un tur tās var kļūt par superoksīda avotu, kas veicina oksidatīvo stresu diabētiskām komplikācijām pakļautajos audos (Forbes *et al.*, 2008).

Glikozes-6-fosfātdehidrogenāze (G6PDH) ir enzīms, kas ir iesaistīts pentožu fosfātu biosintēzes ceļā, kurā papildus veidojas reducējošie faktori - NADPH, glutationa reduktāze un aldozes reduktāze. Tāpēc G6PDH aktivitātes izmaiņas veicina oksidatīvo stresu. Grauzējiem ar eksperimentālo diabētisko nefropātiju tika novērota palielināta G6PDH aktivitāte.

Hiperglikēmijas apstākļos tiek aktivēts sorbitola-poliolu ceļš, jo citosola enzīms - aldozes reduktāze augstas intracelulārās glikozes koncentrācijas gadījumā transformē glikozi par sorbitolu, izmantojot NADPH kā kofaktoru. Tādējādi hroniskas hiperglikēmijas apstākļos šī reakcija šūnās var izsmelt reducētā glutationa krājumus, kas samazina šūnas antioksidatīvo aizsardzību. Savukārt sorbitols tiek oksidēts līdz fruktozei, un šajā reakcijā NAD^+ tiek

reducēts līdz NADH, veidojot substrātu mitohondriju elpošanas ķēdes I kompleksam, kurš tiek uzskatīts par ROS avotu diabēta apstākļos. Tāpēc šie papildus elektroni var vēl vairāk palielināt mitohondriālo ROS veidošanos. Tomēr, neskatoties uz vairākiem pētījumiem ar aldozes reduktāzes inhibitoriem, klīniskos pētījumos joprojām nav izdevies apstiprināt to nozīmi diabētisko komplikāciju izcelsmē (Forbes *et al.*, 2013; Giacco *et al.*, 2010).

Paātrinātās glikozilēšanas gala produkti (*advanced glycation end products, AGE*).

Paātrinātās glikozilēšana reakcija ir neenzimātiska proteīnu un aminoskābju aminogrupu glikozilēšana, tas ir, aminogrupu glikozilēšana jeb glikozes atlikuma pievienošana. Šis process notiek arī veselā organismā, un paātrinātās glikozilēšanas produkti (AGE) ar vecumu uzkrājas audos. Cukura diabēta gadījumā šis process kļūst īpaši intensīvs.

AGE savu patoloģisko iedarbību īsteno dažādos veidos. Pirmkārt, tie neenzimātiski saistās ar olbaltumu un aminoskābju brīvajām aminogrupām (Malārda reakcija – *Maillard reaction*). Šādi notiek proteīnu pēctranslācijas modifikācijas. AGE veidošanās procesā dažādu reakciju gaitā pastiprināti veidojas arī ROS. AGE sintēze ārpus šūnas ietekmē šūnu mijiedarbību vai šūnas un ekstracelulārā matricas mijiedarbību, tādējādi modificējot šūnu adhēzijas procesus.

AGE modificē proteīnus, izmainot to funkcijas, tādējādi ietekmējot dažādu diabēta komplikāciju patoģenēzi. AGEs mijiedarbojas ar šūnas receptoriem, no kuriem visizpētītākais ir RAGE. AGE saistīšanās ar RAGE izraisa ROS veidošanos. AGE saistoties pie RAGE dažādos audos, tiek izraisīta iekaisuma reakcija, kuru izsauc NF-κB aktivācija, kas veicina fibrozi un diabētisko komplikāciju attīstību, piemēram, nierēs (apkopoja Forbes *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2012; Davel *et al.*, 2011).

Diacilglicerīna pastiprināta veidošanās un proteīnkināzes C (PKC) aktivācija.

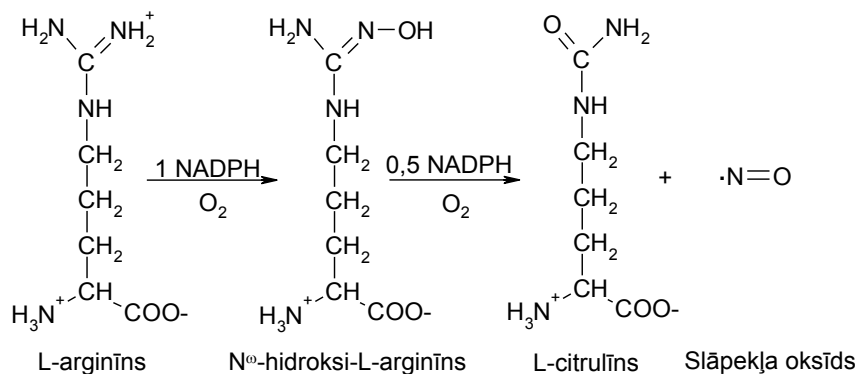
PKC ir enzīmu grupa ar vismaz 11 izoformām, kas ir plaši izplatīta zīdītāju audos. Enzīms fosforilē vairākus mērķa proteīnus. PKC aktivitāte ir atkarīga no kalcija un fosfatidilserīna, un to veicina diacilglicerīni (DAG). Hiperglikēmijas apstākļos DAG tiek pastiprināti sintezēti no glikozes caur triozes fosfātu, kura pieejamība ir palielināta, jo oksidatīvā stresa dēļ tiek inhibēts glikolīzes enzīms GAPDH. Aktivētā PKC iesaistās vairākos ar diabētisko komplikāciju patoģenēzi saistītos signālpārvades ceļos, kas ir saistīti ar oksidatīvo stresu (Pitocco *et al.*, 2010)

1.3.2. NO[•] loma diabētisko komplikāciju patoģenēzē

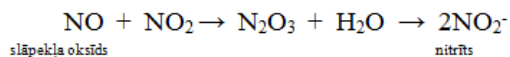
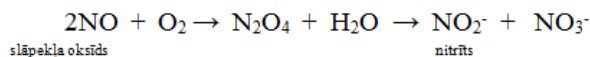
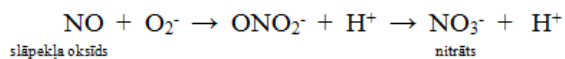
1.3.2.1. NO[•] veidošanās un metabolisms

NO[•] veidošanās fizioloģiskos apstākļos ir nepieciešama daudzu audu normālai funkcionēšanai: NO[•] nodrošina vazorelaksāciju asinsvados, piedalās gremošanas trakta motorikas procesos un gļotādas aizsardzībā. Nervu sistēmā tas piedalās atmiņas procesos un signālpārnēsē. NO[•] ir svarīgs faktors fagocitozes procesā un citās imūnaizsardzības reakcijās.

NO[•] sintēze notiek ar specifiska fermenta slāpekļa oksīda sintāzes (*nitric oxide synthase* – NOS) palīdzību (1.2. att.). Ir trīs NOS izoformas: eNOS (endoteliālā NOS, kas tiek ekspresēta pārsvarā endoteliocītos), nNOS (neironālā NOS, kas tiek ekspresēta pārsvarā neironos), iNOS (inducējamā NOS, kas tiek ekspresēta pārsvarā makrofāgos). NO[•] pussabrukšanas periods ir 6-30 sekundes, un tas tiek metabolizēts par nitrītu un tālāk par nitrātu (1.3. att.). NO[•] var izmērīt *in situ* ar amperometriskiem elektrodu sensoriem vai izmantojot EPR spektroskopiju, fiksējot NO[•] ar *in vivo* radikāļu ķērāju palīdzību. Izmērot NO[•] metabolītu NO₂⁻ un NO₃⁻ kopējo daudzumu, var iegūt netiešu informāciju arī par NO[•] biosintēzes efektivitāti (Sun *et al.*, 2003). Tomēr jāņem vērā, ka NO[•] oksidēšana nav vienīgais nitrītu un nitrātu avots organismā, jo tos var uzņemt arī ar pārtiku vai tie var veidoties, metabolizējoties medikamentiem.

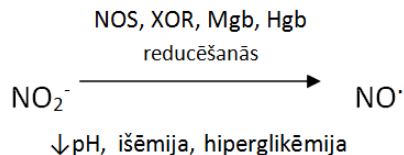


1.2.att. NO[•] sintēze no arginīna NOS ietekmē



1.3.att. Nitrāta un nitrīta veidošanās no slāpekļa oksīda *in vivo*

Ir dati arī par to, ka NO[•] var tikt resintezēts arī no sava metabolīta nitrītjona išēmijas, zema pH un hiperglikēmijas apstākļos no NOS atkarīgā vai neatkarīgā ceļā (1.4. att.). Šādā gadījumā NO[•] sintēzi katalizē citi hēmu saturoši proteīni – tādi kā ksantīna oksidoreduktāze, mioglobīns vai hemoglobīns, aldehīda oksidāze vai citohroms C (Zweier *et al.*, 2010, Alef *et al.*, 2011). Šie dati norāda uz to, ka NO₂⁻/NO₃⁻ var uzskatīt arī par NO[•] depo organismā, un NO₂⁻/NO₃⁻ konversija par NO[•] izmainās tādu slimību gadījumā, kurām raksturīga endoteliālā disfunkciju (Alef *et al.*, 2012).



1.4.att. NO[•] sintēze no nitrīta. NOS – slāpekļa oksīda sintāze, XOR – ksantīna oksidoreduktāze, Mgb – mioglobīns, Hgb – hemoglobīns.

1.3.2.2. NO[•] loma slimību patoģenēzē

NO[•] pārprodukcija ir iesaistīta vairāku slimību patoģenēzē. No akūtiem stāvokļiem visvairāk ir izpētīts septiskais šoks, kura laikā NO[•] izraisa dzīvībai bīstamo hipotensiju. NO[•] ir iesaistīts arī daudzu hronisku deģeneratīvu un iekaisuma slimību patoģenēzē (sk. 1.5. tabulu).

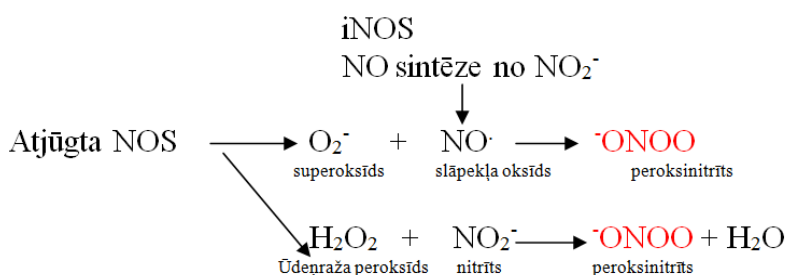
NO[•] pārprodukcijas patoloģiskos efektus pārsvarā izsauc peroksinitrīts. Tas veidojas, NO[•] reaģējot ar superoksīdu vai arī nitrītjonam – ar ūdeņraža peroksīdu. Superoksīda

palielinātā veidošanās, savukārt, ir saistīta ar mitohondriālo elpošanas kompleksu disfunkciju, vai arī ar tā veidošanos citosolā un ar AGE saistītos procesos (Szabo *et al.*, 2009).

Peroksinitrīta hiperprodukcijā var būt iesaistīta arī NOS, kura hiperglikēmijas apstākļos tā sauktās „NOS atjūgšanas” (atvienošanās) rezultātā sāk sintezēt nevis NO[•], bet superoksīdu un ūdeņraža peroksīdu (1.5. att). Ir dati, ka NOS atvienošana diabēta apstākļos notiek L-arginīna samazinātas pieejamības dēļ.

1.5.tabula. NO[•] un NOS iesaistīšanās dažādos fizioloģiskos un patoloģiskos procesos

NO [•] efekti	Fizioloģiski	Patoloģiski
Kardiovaskulārie un adaptīvie mehānismi	Ar <i>eNOS</i> starpniecību: vazorelaksācija, antitrombotiska iedarbība, erekcijas veicināšana, nieru funkcijas izmaiņas, gremošanas procesu izmaiņas	Ar <i>iNOS</i> starpniecību: septiskais šoks (hipotensija)
Nervu sistēma	Ar <i>nNOS</i> starpniecību: sekundārā signālpārnese, atmiņas procesi	Ar <i>iNOS</i> , atvienotās <i>eNOS</i> , <i>XOR</i> starpniecību: Alcheimera slimība, migrēna, Parkinsona slimība
Imūnā sistēma	Ar <i>iNOS</i> starpniecību: fagocitoze apoptozes regulācija	Ar <i>iNOS</i> , atvienotās <i>eNOS</i> , <i>XOR</i> starpniecību: cukura diabēts, bronhiāla astma, čūlainais kolīts, reimatoīdais artrīts kancerogēnēze



1.5.att. Peroksinitrīta veidošanās reakcijas. NOS – slāpekļa oksīda sintāze, iNOS – inducējamā slāpekļa oksīda sintāze

1.3.2.3. NO[•] veidošanās cukura diabēta apstākļos

Dati par NO[•] ģenerēšanu diabēta attīstības gaitā nav viennozīmīgi. Pēc veikto pētījumu datiem šķiet, ka diabēta sākumposmā notiek NO[•] pārprodukcija, ar sekojošu DNS bojājumu

un iekaisuma ceļu aktivāciju, ko pārsvarā izsauc peroksinitrīts. Savukārt diabētiskajām komplikācijām progresējot (piemēram, pacientiem ar diabētiskās nefropātijas izraisītu hronisku nieru mazspēju), tika novērots NO[•] deficīts.

Diabētiskās nefropātijas kontekstā palielināta NO[•] koncentrācija varētu veicināt hiperfiltrāciju, ko novēro pie agrīnas diabētiskās nefropātijas. Palielināts GFĀ, savukārt, veicina glomerulāro šūnu bojājumu, kas veicina diabētiskās nefropātijas iniciāciju un progresēšanu. NO[•] *per se*, ja tā koncentrācija ir paaugstināta, veicina nitrozatīvo stresu, kas izraisa bojājumus proteīnos un DNS, kā arī veicina šūnu bojāeju (Sun *et al.*, 2003).

Eksperimentālā diabēta gadījumā eNOS ekspresija ir palielināta glomeruļu aferentās arteriolās, bet eferentās arteriolās eNOS daudzums nemainās. Tas noved pie pastiprinātas asiņu ieplūdes glomerulos, bet neizmainītas izplūdes, un tādējādi palielina glomerulos spiedienu un filtrāciju (Möllsten *et al.*, 2006). NO[•] pastiprināta produkcija nierēs var veicināt arī palielinātu kapilāru caurlaidību glomerulos, un, tādējādi, arī albuminūriju.

Diabēta eksperimentālos modeļos tika parādīts, ka eNOS un iNOS ekspresija nierēs pieaug 1 nedēļu pēc diabēta ierosināšanas, un ar to ir saistīti nieru bojājumi (Chiarelli *et al.*, 2000). Savukārt NOS inhibitoru un NO[•] ķērāju ievadīšana diabētiskiem dzīvniekiem novērš diabēta ierosināto endoteliālo disfunkciju (Forbes *et al.*, 2008). Tomēr dati par NOS izoformu aktivitāti agrīnās diabētiskās nefropātijas gadījumā paliek pretrunīgi: tiek ziņots arī par iNOS, eNOS vai abu šo izoformu iesaisti (Veelken *et al.*, 2000, Stadler *et al.*, 2008).

No otras puses, pētījumu rezultāti par diabētisko komplikāciju tālāko attīstību, norāda uz NO[•] deficītu. Ir ziņojumi par NO[•] produkcijas samazināšanos un samazinātu NO[•] stabilo metabolītu ekskreciju 2. tipa diabēta pacientiem ar diabētisku nefropātiju (Tessari *et al.*, 2010). Šajā darbā tika konstatēts, ka 2. tipa diabēta pacientiem ar nieru slimību insulīns nestimulē NOS aktivitāti - pretēji tam, kā tas notiek veselīem cilvēkiem.

Tiek uzskatīts, ka hiperglikēmija var izraisīt NO[•] sintēzes samazināšanos. Par to liecina pētījumi, kuros parādīts, ka hiperglikēmija *per se* inhibē eNOS aktivitāti glomerulos (ar proteīnkināzi C asociēts mehānisms), kā arī tas, ka paātrinātās glikozēšanas gala produkti samazina NOS ekspresiju (apkopojis Tessari *et al.*, 2010). Samazinātai NO[•] sintēzei progresējoša diabēta gadījumā iespējami vairāki iemesli, un tie ir saistīti ar endoteliālo disfunkciju.

Pirmkārt, eksperimentāli ir pierādīts, ka diabēta apstākļos samazinās NOS kofaktoru un substrāta biopieejamība, tādējādi NO[•] vietā NOS ražo [•]O²⁻. Tāpat ir novērots, ka eNOS

aktivitāte ir nomākta oksidatīvā stresa apstākļos. eNOS ekspresiju ietekmē arī vairāki signālpārneses ceļi un tajā iesaistītie savienojumi, kuru biosintēze aktivējas hiperglikēmijas apstākļos, piemēram, kaveolīns-1 (Sharma *et al.*, 2011).

eNOS saistība ar samazināto NO[•] sintēzi endoteliālās šūnās progresējuša diabēta gadījumā tika apstiprināta kā klīniskajos, tā arī eksperimentālajos pētījumos. Vēl vairāk, tika novērota arī dažu eNOS gēna polimorfismu (īpaši eNOS Glu298Asp) loma diabētiskās nefropātijas patoģenēzē (Noiri *et al.*, 2002, Chiarelli *et al.*, 2000).

Ir dati par to, ka NO[•] un dažādi ar to saistītie brīvie radikāļi un oksidanti spēlē svarīgu lomu aizkuņģa dziedzera β-šūnu bojāejā. Tā, piemēram, iNOS ir pastiprināti ekspresēti diabētisko NOD peļu aizkuņģa dziedzeros, bet iNOS *knockout* peles ir rezistentas pret streptozotocīna pro-diabētisko iedarbību. Parādīts, ka NOS inhibitoriem piemīt spēja novērst diabēta attīstību streptozotocīna, NOD un BB 1. tipa cukura diabēta modeļos.

iNOS hiperekspresija aizkuņģa dziedzera salīnās varētu būt saistīta ar iekaisuma citokīnu iedarbību, tādu kā IL-1β, TNF-α un INF-γ (Szabo *et al.*, 2009). Insulīna sekrēcijas traucējumi β-šūnās ir saistīti ar NOS hiperekspresiju un sekojošu NO[•], peroksinitrīta un citu brīvo radikāļu pārprodukciju, DNS bojājumu un sekojošu PARP aktivāciju. PARP hiperaktivitāte, savukārt, izsmel šūnas ATP un NAD krājumus, kam seko šūnas apoptoze vai nekroze. Līdzīgi efekti tiek novēroti arī *in vitro* pētījumos ar cilvēka un žurku Langerhansa saliņām (Pacher *et al.*, 2007).

1.3.2.4. NO[•], peroksinitrīts un nitrozatīvais stress diabētisko komplikāciju attīstībā

Vairāku pētījumu rezultāti norāda uz endogēnā peroksinitrīta lomu diabētisko kardiovaskulāro komplikāciju patoģenēzē cilvēkiem un dzīvniekiem. Paaugstināta nitrotirozīna koncentrācija tika konstatēta diabēta pacientu plazmā un trombocītos. Endoteliālo šūnu kultūrās hiperglikēmija izraisīja pastiprinātu, ar peroksinitrītu saistītu, šūnu apoptozi. Savukārt, NOS inhibīcija un brīvo radikāļu saistīšana ļauj novērst patoloģiskās izmaiņas kardiomiocītos, kuri tiek kultivēti augstas glikozes koncentrācijas apstākļos. Tika novērota arī nitrotirozīna koncentrācijas pieauguma audos saistība ar šūnu bojājuma pakāpi un nāvi.

Peroksinitrīts izraisa DNS pārrāvumus ar tiem sekojošu enzīma PARP (poli-ADP-ribozes polimerāzes) aktivāciju. PARP piesaistās pie DNS ķēžu pārrāvumu vietās un pārnes ribozi no koenzīma NADH uz dažādiem kodola proteīniem (DNS polimerāzi, histoniem u.c). PARP hiperaktivitāte izsmel šūnas NADH krājumus, ietekmējot šūnas metaboliskos resursus, un tas var izsaukt šūnas bojā eju. PARP ir iesaistīts arī citos mehānismos, kuri veicina NFκB,

poliola ceļa un aldoses reduktāzes aktivāciju, izraisot pastiprinātu oksidatīvo stresu (Pacher *et al.*, 2007, Szabo *et al.*, 2009, Pitocco *et al.*, 2010).

1.4. Glikozes transports un glikozes transportētāji cukura diabēta attīstības gaitā

Glikoze nevar iekļūt šūnā difūzijas ceļā. Glikozes transportu cauri šūnas citoplazmatiskajai membrānai nodrošina divu klašu glikozes transportproteīni: atvieglotā transporta proteīni (GLUT) un Na⁺/glikozes kotransportieri (*sodium-glucose linked transporter*, SGLT). Glikozes transportieri spēlē svarīgu lomu normāla glikozes līmeņa uzturēšanā, nodrošinot glikozes uzņemšanu šūnās, kā arī atbrīvojot glikozi no aknām tad, kad glikozes līmenis asinīs pazeminās. Šie transporta proteīni ir atbildīgi arī par glikozes absorbciju no zarnām un reabsorbciju nierēs.

1.4.1. Na⁺/glikozes kotransportieri

SGLTL nodrošina glikozes absorbciju zarnās un reabsorbciju nierēs un siekalu dziedzeros. Kopā ar glikozi tiek transportēti arī nātrija joni un ūdens. Tāpēc SGLT1 ir svarīgs ūdens uzsūkšanās.

SGLT1 ir ekspresēts pārsvarā zarnu epitēlija lumena virsmā, bet tas tika atrasts arī nierēs, aiz auss un zemžokļa siekalu dziedzeros, kā arī sirdī. SGLT1 ir raksturīga augsta afinitāte pret glikozi, bet zema glikozes transporta kapacitāte, un to inhibē florizīns. Glikozes absorbcija zarnās notiek pārsvarā divpadsmit pirkstu un likumainajā zarnā. Caur SGLT1 glikoze iekļūst enterocītos. No enterocīta asinīs glikozi transportē GLUT1.

SGLT2 tiek ekspresēts pārsvarā nieru proksimālajos tubuļos, kur tas nodrošina glikozes reabsorbciju no glomeruļu filtrāta. SGLT2 ir atrasts arī piena dziedzeros, aknās, plaušās, zarnās, skeleta muskuļos un liesā. Nierēs vairāk nekā 90% atfiltrētās glikozes tiek reabsorbētas ar SGLT2 palīdzību. Nieru kanālišu bazolaterālajā membrānā GLUT2 nodrošina glikozes nonākšanu asinsritē.

SGLT un diabēts. Literatūrā ir dati par to, ka SGLT1 ekspresija diabēta pacientiem divpadsmit pirkstu zarnas lūmena virsmā ir palielināta. SGLT2 un GLUT2 palielinātu ekspresiju nierēs novēroja žurkām ar spontānu un ķīmiski inducētu diabētu, un šī palielinātā ekspresija ir tā mehānisma sastāvdaļa, kurš ļauj samazināt glikozes zudumus. Nekontrolēta diabēta gadījumā proksimālajā kanāliņā ir paaugstināta glikozes koncentrācija, kura veicina glomerulosklerozi un nefropātiju.

SGLT ekspresija siekalu dziedzeros diabēta apstākļos varētu būt iesaistīta tādu diabēta slimniekiem raksturīgu mutes dobuma patoloģiju attīstībā kā kserostomija, periodonta

slimības, kariesa palielināta izplatība, zobu izkrišana un mutēs kandidoze, kuri ir saistīti ar siekalu samazinātu sekrēciju (Bell *et al.*, 2010).

1.4.2. GLUT un to ekspresijas izmaiņas, diabētam attīstoties

GLUT transportieri nodrošina glikozes transportu šūnās dažādos audos. GLUT pārsvarā ir ≈ 500 aminoskābju proteīni ar 12 transmembrānām alfa cilpām un vienu N-galā saistītu oligosaharīdu. Mūsdienās ir aprakstīti jau 14 GLUT tipa proteīni (Thorens *et al.*, 2010).

GLUT1. GLUT1 ekspresija vairākums šūnu: asins šūnas, kardiomiocīti, hematoencefāliskās barjeras endotēlijs, adipocīti, astrocīti un citas šūnas. GLUT1 galvenā funkcija ir nodrošināt glikozes pieejamību CNS šūnās.

Embriogēneses gaitā progesterona ietekmē endometrijā ir vērojama augsta GLUT1 ekspresija, tādējādi veicinot embrija implantāciju. Embrijam augsta GLUT1 ekspresija novērojama visos audos. Pēc piedzimšanas visaugstākais GLUT1 līmenis saglabājas smadzenēs. 20-40% GLUT1 atrodas šūnas citoplazmatiskajā membrānā, pārējā daļa – endoplazmatiskajā tīklā, Golģi aparātā un endosomās GLUT1 parādīšanos nodrošina tā migrācija uz šīm organelām, kas ir atkarīga no AMPK (Mueckler *et al.*, 2013).

Klīniskajā medicīnā ir aprakstīts GLUT1 nepietiekamības sindroms jeb De Vivo slimība. To izraisa ir autosomāli dominanta mutācija GLUT1 gēnā, kuras dēļ defektīvais GLUT1 proteīns nespēj nodrošināt glikozes transportu smadzenēs. Kopš tās atklāšanas 1991. gadā, ir konstatēti apmēram 100 šīs slimības gadījumi. Klīniski slimību raksturo krampju lēkmes sākot no pirmajiem dzīves mēnešiem, samazināta smadzeņu augšana, mikrocefālija, garīga atpalcība, spasticitāte, ataksija, dizartrijs, letarģija, neapzinātas acu kustības. De Vivo slimību diagnosticē, nosakot pazemināto glikozes un laktāta līmeni cerebrospinalajā šķidrumā, kā arī samazinātu glikozes uzņemšanu eritrocītos. Ārstēšanā tiek izmantota ketogēnā diēta, lai nodrošinātu nervu audus ar ketonvielām kā alternatīvo enerģijas avotu (Carruthers *et al.*, 2009).

Paaugstināta GLUT1 ekspresija ir aprakstīta audzējos. Tāpēc GLUT1 ekspresijas inhibīcija tiek apspriesta kā viena no pretvēža terapijas iespējām. Pie cukura diabēta GLUT1 ekspresija kā atbilde uz hiperglikēmiju palielinās insulīnneatkarīgajos audos: tīklenē, nierēs, nervos un citos orgānos. Ir dati par to, ka oksidatīvais stress pie cukura diabēta pastiprina GLUT1 ekspresiju (Carruthers *et al.*, 2009). Tieši GLUT1 pastiprināta ekspresija tiek saistīta ar glikotoksicitātes fenomenu, jo tā veicina intracelulāro hiperglikēmiju ar tai sekojošiem metaboliskiem traucējumiem. Tādējādi GLUT1 ekspresijas terapeitiska samazināšana atsevišķos

audos tiek uzskatīta par daudzsološu pieeju diabētisko komplikāciju ārstēšanā (Forbes *et al.*, 2008).

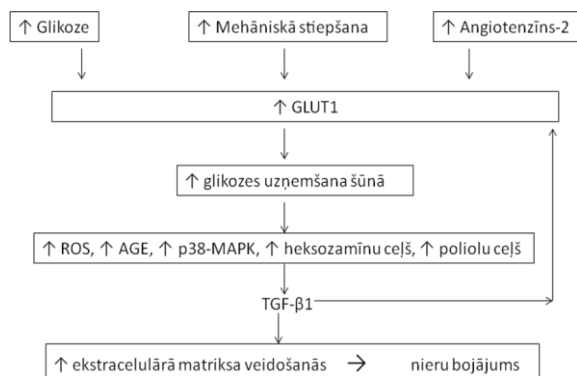
GLUT1 ekspresijas izmaiņas dažādos orgānos pie cukura diabēta ir aprakstītas, un publicēto pētījumu dati nav viennozīmīgi. Piemēram, GLUT1 ekspresijas pieaugumam skeleta muskuļos hipoinsulinēmijas apstākļos varētu būt labvēlīgs efekts, jo tas palielinātu glikozes uzņemšanu šajos audos (Bouché *et al.*, 2010). Patiešām, daži autori pie diabēta ir novērojuši GLUT1 ekspresijas samazināšanos skeleta muskuļos (Ciaraldi *et al.*, 2005; Napoli *et al.*, 1995) un tās pieaugumu hipoglikemizējošo vielu ievadīšanas rezultātā, ko skaidro ar hipoglikēmijas nomācošo ietekmi uz GLUT1 veidošanos (Ybarra *et al.*, 1997, Tsiani *et al.*, 1995, Hundal *et al.*, 1992). Savukārt, dažu autoru rezultāti ir pretēji, un tie liecina par GLUT1 ekspresijas samazināšanos hiperglikēmijas ietekmē un tās normalizāciju pēc hipoglikemizējošo vielu ievadīšanas (Dimitrakoudis *et al.*, 1992; Klip *et al.*, 1994; Napoli *et al.*, 1996).

GLUT1 ir īpaši pētīts diabētiskās nefropātijas kontekstā. GLUT1 ir augsti ekspresēts nieru glomeruļos, un tā ekspresija nieru audos hiperglikēmijas apstākļos pieaug, veicinot glikozes utilizāciju. Heilig ar līdzautoriem novēroja, ka GLUT1 ekspresija palielinās mezangija šūnu kultūrā kopā ar ekstracelulārā maktriksa proteīnu ekspresijas pieaugumu, zināmā mērā atgādinot „šūnas diabētisko fenotipu” (Heilig *et al.*, 1995). Inhibējot GLUT1 mezangija šūnās *in vitro*, tika parādīts, ka tā var samazināt glikozes uzņemšanu un ar to saistītā ekstracelulārā maktriksa pārmērīgu veidošanos.

In vivo GLUT1 antisensi-transgēnās db/db pelēs nenovēro diabētiskās nefropātijas attīstību, taču nediabētiskiem dzīvniekiem ar GLUT-1 hiperekspresiju, glomeruļos biežāk attīstās glomeruloskleroze un albuminūrija (Brosius *et al.*, 2009). GLUT1 ekspresiju glomeruļu kapilāros veicina tādas molekulas, kā AngII un TGF- β -1. Arī fizikālie faktori ietekmē GLUT1 ekspresiju glomeruļos. Ir zināms, ka diabētiskās nefropātijas gaitā hiperglikēmijas ietekmē palielinās spiediens glomeruļu kapilāros. Šo stāvokli dēvē par glomerulāro hipertensiju, un tā izraisīšanā zināma nozīme ir arī NO[•] pārprodukcijai. Tas izraisa glomeruļu mehānisku stiepšanu. Eksperimentāli tika apstiprināts, ka mehāniskā stiepšana veicina GLUT1 ekspresiju glomeruļos *in vitro* (apkopojis Gnudi *et al.*, 2007). GLUT1 ekspresijas veicinošie mehānismi ir parādīti 1.6.attēlā.

GLUT1 tika pētīts arī ģenētiskā aspektā, jo daži GLUT1 polimorfismi tika saistīti ar lielāku diabētiskās nefropātijas risku. 2012. gadā veiktajā metaanalīzē tika iekļauti deviņi kontrolēti randomizēti pētījumi par GLUT1 polimorfismu asociāciju ar diabētisko nefropātiju. Nozīmīgas mutāciju asociācijas ar palielinātu diabētiskās nefropātijas risku tika konstatētas visos ģenētiskajos modeļos XbaI SNP (rs841853). Subgrupu analīzē baltās rases populācijās

1. tipa un 2. tipa cukura diabēta pacientiem ar diabētisko nefropātiju atklājās pozitīvi rezultāti arī ar Enh2-1 SNP (rs841847), Enh2-2 SNP (rs841848) un HaeIII SNP (rs1385129). Tomēr netika atrasta asociācija starp XbaI vai Enh2-2 SNP un diabētiskās nefropātijas progresēšanu (Cui *et al.*, 2012).



1.6.att. GLUT1 pastiprinātās ekspresijas iemesli un tās sekas diabētiskās nefropātijas patoģenēzē

Sirdī GLUT1 ekspresija pie cukura diabēta tika pētīta saistībā ar diabētiskās kardiomiopātijas patoģenēzi. Šajā jomā literatūrā ir atrodami pretrunīgi uzskati un rezultāti. Daļa zinātnieku domā, ka GLUT1 ekspresijas palielinājums miokardā varētu būt potenciāli labvēlīgs, īpaši hipertensijas izraisītas sirds hipertrofijas kontekstā.

Eksperimentos ar transgēnām pelēm ar GLUT1 hiperekspresiju tika parādīts, ka īslaicīga GLUT1 hiperekspresija aizkavē patoloģisku miokarda remodelēšanos, bet veicina hipertrofiju, un tādējādi nevar tikt uzskatīta par pārliecinoši labvēlīgu (Pereira *et al.*, 2013). Citi zinātnieki uzskata, ka hroniska pastiprināta glikozes uzņemšana miokardā izraisa oksidatīvo stresu, kas samazina miokarda metabolo fleksibilitāti un veicina kontraktīlo disfunkciju (Yan *et al.*, 2009).

Tāpat salīdzinoši maz pētīta ir GLUT1 ekspresijas izmaiņas pie cukura diabēta aknās. Ybarra un līdzautori novēroja GLUT1 ekspresijas pieaugumu hepatocītos 17 dienas pēc streptozotocīna injekcijas (Ybarra *et al.*, 1997). Salīdzinot ar kontroles dzīvniekiem, tika novērota arī GLUT1 ekspresijas samazināšanās aknās Goto-Kakizaki žurkām un streptozotocīna izraisītā eksperimentālā diabēta žurkām (Jurysta *et al.*, 2013).

GLUT1 ekspresijas regulācija tiek pētīta arī saistībā ar diabētisko retinopātiju. GLUT1 ir vienīgais glikozes transportieris tīklenē, tādējādi pie hiperglikēmijas tas transportē tīklenes šūnās daudz vairāk glikozes, un tas ir diabētiskās retinopātijas galvenais iemesls. GLUT1 nomākšana, intraokulāri injicējot siRNS („apklusinošās” RNS molekulas), ļāva samazināt glikozes koncentrāciju tīklenē diabētiskām pelēm. Tāpat GLUT1 saistošo vielu forskolīna un genisteīna, kuri inhibē glikozes transportu, ievadīšana diabētiskām pelēm, samazināja

glikozes koncentrāciju tīklenē līdz kontroles līmenim. GLUT1 inhibitori samazināja arī glikozes un glikozilētā hemoglobīna līmeni eritrocītos, un to var izmantot kā biomarķieri šim efektam. GLUT1 inhibīcija ļāva novērst arī superoksīda radikāļu un citu diabētiskās retinopātijas marķieru parādīšanos tīklenes audos (Lu *et al.*, 2013). Šie rezultāti ir ļoti nozīmīgi, jo ir zināms, ka diabētisko mikrovaskulāro komplikāciju patoģenēzē ir daudz kopīga, un tie norāda uz GLUT1 lomu arī diabētiskās nefropātijas un neiroopātijas patoģenēzē (Heilig *et al.*, 2013).

GLUT2 ir augsti ekspresēts aizkuņģa dziedzera saliņu β -šūnās, kā arī aknu, nieru kanāliņu un tievo zarnu epitēlija bazolaterālajā membrānā. GLUT2 funkcijas ietver sevī glikozes stimulēto insulīna sekrēciju, glikozes uzsūkšanos zarnās, glikozes reabsorbciju nierēs, glikozes uzņemšanu aknās. Ir dati, ka augstas glikozes koncentrācijas gadījumā nieru kanāliņu vai zarnu lumenā, GLUT2 var tikt ekspresēts arī epitēlija apikālajā virsmā.

GLUT2 ir noteicošā loma glikozes-stimulētās insulīna sekrēcijas procesā. GLUT2 ekspresija ir konstatēta arī perifērajos audos un smadzenēs, kur tā iedarbību saista ar glikozes „sajūšanu” (sensing), kurai varētu būt zināma ietekme pie pārtikas izvēles mehānismiem cilvēkiem, īpaši kārē pēc saldumiem (Thorens *et al.*, 2010).

GLUT2 varētu būt iesaistīts nealkoholiskā steatohepatīta patoģenēzē (Regnel *et al.*, 2011), glikozes metabolisma traucējumos, kas ir saistīti ar β -šūnu disfunkciju un aknu metabolisma traucējumiem pie 2. tipa cukura diabēta (Im *et al.*, 2006). 1949. gadā tika aprakstīts GLUT2 nepietiekamības jeb Fankoni–Bickel sindroms. To izraisa autosomāli recesīva mutācija GLUT2 gēnā. Pacientiem novēro augšanas traucējumus, slāpes, aizcietējumus, osteopēniju, mazu augumu, hepatomegāliju, tubulāro nefropātiju ar glikozūriju, fosfatūriju, proteinūriju, hipofosfatēmiju, hiperurikēmiju. Šādiem pacientiem novēro arī aknu infiltrāciju ar glikogēnu un taukiem. Klīniski pirms ēšanas novēro ketozi, hipoglikēmiju, pēc ēšanas - hiperglikēmiju (Pascual *et al.*, 2004).

GLUT4 ir visvairāk pētītais glikozes transportieris. GLUT4 ir insulīnatkarīgais glikozes transportieris, kurš tiek ekspresēts atbildot uz insulīna stimulāciju skeleta muskuļos, sirdī un taukaudos (Mueckler *et al.*, 2013). GLUT4 ekspresijas izmaiņas tika plaši pētītas saistībā ar insulīna rezistenci, aptaukošanos un 2. tipa cukura diabēta patoģenēzi.

GLUT4 ekspresija skeleta muskuļos un taukos ir nomākta 2. tipa cukura diabēta pacientiem, pie hipotireozes, treknas pārtikas lietošanas gadījumā, pie aptaukošanās, kā arī hroniska iekaisuma gadījumos (Thorens *et al.*, 2010). Ir dati, ka GLUT4 hipoekspresija ir saistīta ar oksidatīvā stresa procesiem, kuri notiek ar AMP-aktivētas proteīnkināzes starpniecību (Katz, 2007). Dažu aprītē esošu un potenciālo antidiabētisko medikamentu

darbības mehānismi tiek saistīti ar GLUT4 ekspresijas veicināšanu insulīnkarīgajos audos, tādējādi uzlabojot insulīna sensitivitāti (Giannarelli *et al.*, 2003).

GLUT5 ir vienīgais GLUT transportieris ar augstu afinitāti tieši pret fruktozi. Tas tiek galvenokārt ekspresēts gļotādas virsmā tievajās zarnās, bet ir dati par tā veidošanos arī citos orgānos. Pēdējā laikā GLUT5 tiek pētīts saistībā ar insulīna rezistenci, jo tika novērots, ka augsts fruktozes patēriņš dzīvniekiem un cilvēkiem veicina insulīna rezistences attīstību (Thorens *et al.*, 2010).

GLUT9 funkcijas ir urātu reabsorbcija un degradācijas procesi aknās. Tas tiek ekspresēts aknās, nierēs, zarnās, hondrocītos. GLUT9 ģenētiskie varianti tiek saistīti ar hiperurikēmiju, podagru, nefropātiju, un tas tiek pētīts saistībā ar insulīna rezistenci (Thorens *et al.*, 2010).

Glikozes transportētāji GLUT3, GLUT6, GLUT7, GLUT8, GLUT10, GLUT11, GLUT12, GLUT13, GLUT14 ir mazāk pētīti, un tiem nav pārlicinoši pierādītas lomas diabēta patoģenēzē.

1.5. Izmantojamās un nākotnes pieejas cukura diabēta komplikāciju novēršanā un ārstēšanā

Jaunu vielu meklējumi diabētisko komplikāciju ārstēšanai ir aktuāls jautājums mūsdienās, jo tikai par dažiem no izmantojamiem medikamentiem diabēta un kardiovaskulāro slimību ārstēšanā ir dati par to labvēlīgu ietekmi diabētisko komplikāciju gadījumā.

1.5.1. Glikēmijas kontrole, insulīns un orālie antidiabētiskie līdzekļi

Pēdējo gadu lielos klīniskajos pētījumos ir pierādīts, ka neadekvāta glikēmijas kontrole ir saistīta ar palielinātu diabētisko komplikāciju risku (Forbes *et al.*, 2013). Ir konstatēta saistība starp HbA1c% un diabētisko komplikāciju risku: 1. tipa diabēta pacientiem, samazinoties HbA1c par 2%, diabētiskās nefropātijas risks samazinās par 56% (DCCT/EDIC izpētes grupa, 2011). Savukārt 2. tipa diabēta pacientiem, samazinoties HbA1c par 0,9%, nefropātijas risks samazinās par 33% (Hermans *et al.*, 2009). Secināts, ka, ārstējot diabētu, HbA1c mērķa vērtība ir 7% (DCCT/EDIC Izpētes grupa, 2011).

Insulīns. Dzīvnieku modeļos pēc aizkuņģa dziedzera saliņu transplantācijas aizsardzības līmenis pret komplikāciju attīstību ir augstāks, nekā ievadot eksogēno insulīnu. Tādējādi jāsecina, ka faktori, kuri saistīti ar insulīna sekrēciju, ir nozīmīgi diabētisko komplikāciju novēršanai (Bloch-Damti *et al.*, 2005). Viens no šiem faktoriem varētu būt C-

peptīds, kas ir proinsulīna molekulas daļa, kas tiek atšķelta insulīna sekrēcijas gaitā (Forbes *et al.*, 2013).

Orālie antidiabētiskie līdzekļi. Daži no 2. tipa diabēta ārstēšanā izmantojamiem antidiabētiskiem līdzekļiem uzrādīja aizsargājošo efektu arī pret diabētisko komplikāciju attīstību. Tiazolodindioniem tika aprastīta fibrozes attīstību aizkavējoša iedarbība, kurai varētu būt zināma nozīme diabētiskās nefropātijas ārstēšanā.

Dati par metformīna ietekmi uz diabētisko komplikāciju attīstību ir pretrunīgi. Dažiem pacientiem metformīns izraisa diabētiskās neiropātijas gaitas pasliktināšanās, iespējams, veicinot B12 vitamīna deficītu. No otras puses, kā tika parādīts UKPDS pētījumā, metformīna lietošana samazina makrovaskulāro komplikāciju - aterosklerozes, aterotrombozes un miokarda infarkta risku. Tāpat ir dati par metformīna pozitīvo efektu uz diabētisko nefropātiju cilvēkiem un dzīvniekiem, un tie tiek saistīti ar metformīna spēju samazināt dislipidēmiju un iekaisuma procesus, oksidatīvo un karbonil-stresu (karbonil-grupu izraisītu proteīnu modificēšanu), kā arī atjaunot endotēlija funkcijas asinsvados. Arī dažiem DPP-4 inhibitoriem klīniskos pētījumos papildus glikozes pazeminošām īpašībām tika aprakstīta albuminūriju samazinoša ietekme, tomēr to iedarbības izpēte vēl turpinās (Forbes *et al.*, 2013).

1.5.2. Arteriālā spiediena kontrole un renīna-angiotenzīna-aldosterona sistēmas (RAAS) inhibīcija

Vairāku pētījumu dati norāda uz to, ka asinsspiediena kontrole palēnina diabētiskās nefropātijas progresiju (Parving *et al.*, 1987). Vairākās valstīs RAAS inhibīcija tiek rekomendēta kā diabētiskās nefropātijas terapijas sastāvdaļa. Šim mērķim var izmantot angiotenzīnu konvertējošā enzīma inhibitorus (AKEI) vai angiotenzīna receptoru blokatorus (ARB). Pēc dažu pētnieku uzskatiem vēlams izmantot arī aliskerēnu (renīna inhibitors) un spironolaktonu (aldosterona antagonists). Šī pieeja tiek mērķēta uz sistēmas arteriālā spiediena un intraglomerulārās hipertensijas pazemināšanu, tādējādi palēninot fibrotisko pārmaiņu attīstību nierēs (Mauer *et al.*, 2009; Ruggenti *et al.*, 2004, Forbes *et al.*, 2013).

Citi antihipertensīvie medikamenti. Kā perspektīva pieeja tiek pētīta simpātiskās nervu sistēmas inhibīcija, bloķējot β -adrenoreceptorus vai veicot nieru denervāciju. Kalcija kanālu antagonisti monoterapijā nepierādīja izteiktu efektivitāti diabētisko komplikāciju ārstēšanā diabēta pacientiem (Forbes *et al.*, 2013).

1.5.3. Lipīdu līmeņa kontrole, statīni un fenofibrāts

Pie cukura diabēta vērojamā dislipidēmija ir saistīta ar palielinātu mikro- un makrovaskulāro komplikāciju attīstību, jo tā ir saistīta ar endoteliālo disfunkciju (Forbes *et al.*, 2013).

Statīni. Statīni ir 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA reduktāzes (HMG-CoA) inhibitori, un tie inhibē holesterīna sintēzi, bet to pretiekaisuma iedarbība varētu būt saistīta ar izoprenoīdu produkcijas samazināšanu (Forbes *et al.*, 2008). Statīni tiek rekomendēti diabētiskās nefropātijas profilaksei un ārstēšanai.

Fenofibrāts. Fenofibrāts ir PPAR α agonists. Fenofibrāta lietošana tika saistīta ar mazāku apakšējo ekstremitāšu amputācijas biežumu, kā arī pozitīviem efektiem pie diabētiskās neiropātijas, nefropātijas un retinopātijas (Forbes *et al.*, 2013).

1.5.4. Jaunās diabētisko komplikāciju terapijas pieejas, kas vērstas uz oksidatīvā stresa samazināšanu un glikozes transportētāju ekspresijas normalizēšanu

1.5.4.1. Jaunas ārstēšanas pieejas, kuras vērstas uz oksidatīvā stresa mazināšanu

Mūsdienās diabētisko komplikāciju un jaunu terapijas veidu izpēte notiek ļoti aktīvi. Ņemot vērā to, ka lielā mērā diabēta komplikāciju attīstība ir saistīta ar oksidatīvo stresu, ir veikti pētījumi par dažādu labi zināmu antioksidantu, ieskaitot alfa-tokoferolu, lietošanu diabēta pacientiem. Tomēr to rezultāti nav iepriecinoši, jo tikai α -liponskābei pie diabētiskās polineuropātijas bija ietekme uz sāpju samazināšanu un muskuļu vājumu.

Tāpēc tagad notiek mērķtiecīga antioksidantu terapijas izpēte tieši nierēs – mēģinot bloķēt konkrētus ROS avotus mērķorgānos, novēršot mitohondriālos bojājumus, bloķējot NADPH oksidāzi, ksantīna oksidāzi u.t.t. Pagaidām lielākā daļa no šiem pētījumiem ir tikai eksperimentālā līmenī.

Tika īstenoti mēģinājumi inhibēt AGE veidošanos eksperimentāliem dzīvniekiem un cilvēkiem, un šim mērķim tika pielietots aminoguanidīns, kurš arī bloķē NO sintāzi. Diemžēl klīniskajos pētījumos, aminoguanidīnam saistoties ar AGE starpproduktiem, dažiem pacientiem veidojās agrāk nezināmi imūnie kompleksi, kuri, nogulsnējoties nierēs, pasliktināja to funkciju. Tādējādi, kaut AGE samazināšana joprojām šķiet daudzsolīga pieeja diabētisko komplikāciju terapijai, ir nepieciešams būt piesardzīgiem šī principa izmantošanā.

AGE uzkrāšanos audos iespējams modificēt, izmainot glioksilāzes-1 aktivitāti, jo šis enzīms ir atbildīgs par AGE priekšteča metilglioksāla konversiju un samazina AGEs uzkrāšanos audos, kam ir labvēlīga ietekme uz audu struktūru un funkciju pie neiropātijas un retinopātijas. Šī alternatīvā pieeja tiek aktīvi izvērtēta. Eksperimentos ar dzīvniekiem tiek pētītas arī šķīstošu RAGE vai RAGE-neitralizējošu antivielu ievadīšana nolūkā aizkavēt diabētiskās komplikācijas (Forbes *et al.*, 2013).

Daudzsološa pieeja diabētiskās nefropātijas un retinopātijas ārstēšanā šķiet arī proteīnkināzes C izoformu inhibīcija. Viena no pētāmām vielām ir ruboksistaurīns jeb LY333531, kurš inhibē proteīnkināzes C β -I un β -II izoformas, bet šīs potenciālās zāļu vielas klīniskās efektivitātes pētījumi vēl turpinās (Giacco *et al.*, 2010).

Saistībā ar to, ka pie diabētiskās nefropātijas novēro patoloģisku NO[•] metabolismu, tiek izstrādāti terapijas veidi, kas ļautu piegādāt NO[•] donorus vai NOS substrātus tieši asinsvada bojājuma vietā (piemēram, glomerulos, progresējošas diabētiskas nefropātijas gadījumā) (Alef *et al.*, 2012). Un gluži otrādi, tiek postulēts, ka lokalizēta NOS inhibitoru vai ksantīna oksidāzes inhibitoru iedarbība varētu būt aizsargājoša diabētiskās nefropātijas sākumposmā glomerulārās hiperfiltrācijas fāzē (Yamagishi *et al.*, 2011). NOS atjūgšanas samazināšanai eksperimentos tika pielietos L-arginīns, un tas ļāva samazināt miokarda fibrozi db/db pelēm.

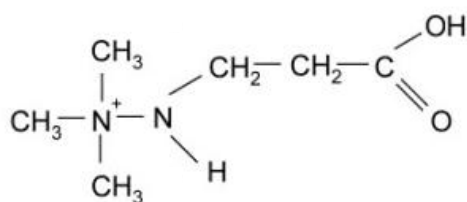
Asimetriskais dimetilarginīns (ADMA) ir dabā sastopama aminoskābe, kas ir NO[•] biosintēzes dabīgs inhibitors. Ir dati, ka 1. un 2. tipa diabēta pacientiem ADMA koncentrācija asinīs ir palielināta, un tā korelē ar lielāku kardiovaskulāro slimību risku. ADMA koncentrāciju ietekmē arī ZBL holesterīna koncentrācija, un tiek postulēts, ka augsts ZBL holesterīns veicina kardiovaskulārās patoloģijas diabēta vēlīnajos posmos, ADMA biosintēzes aktivācijas rezultātā samazinoties NO[•] koncentrācijai. ADMA metabolizē dimetilarginīna dimetilaminohidrolāze (DDAH). DDAH aktivitāti savukārt regulē homocisteīns. Tomēr klīniskajos pētījumos, kuros, nolūkā samazināt homocisteīna koncentrāciju, pacientiem ordinēja B grupas vitamīnus, novēroja paātrinātu nieru funkcijas izsīkšanu, kā arī asinsvadu slimību riska palielināšanos pacientiem ar nefropātiju. Tāpat arī folskābes lietošana nemazināja kardiovaskulāro notikumu risku (Forbes *et al.*, 2013).

1.5.4.2. Glikozes transportētāju ekspresijas modificēšana

Dažiem no orāli lietojamiem pretdiabēta līdzekļiem tika konstatēta ietekme uz glikozes transportētājiem (sk. sadaļu „Diskusija”), un šiem efektiem varētu būt nozīme gan glikozes koncentrācijas regulēšanā, gan arī diabētisko komplikāciju profilaksē.

GLUT1 ekspresijas samazināšana pie diabētiskās nefropātijas un retinopātijas tiek pētīta, izmantojot siRNS vai GLUT1 saistošās vielas (sk. sadaļu „Glikozes transports un glikozes transportētāji cukura diabēta attīstības gaitā”) (Lu *et al.*, 2013). Savukārt GLUT4 ekspresijas modifikācija varētu būt svarīga diabētisko kardiomiopātiju gadījumā (Forbes *et al.*, 2013). Tomēr pagaidām visi šie pētījumi ir eksperimentālu izmēģinājumu stadijā.

Latvijas Organiskās sintēzes institūtā radītajam kardioprotektīvajam preparātam mildronātam (3-(2,2,2-trimetilhidrazīnija)propionāta dihidrātam), sk. 1.7.att., vairākos eksperimentālos pētījumos ir konstatēta spēja uzlabot glikozes metabolismu 2. tipa cukura diabēta un insulīna rezistences modeļos (Liepinsh *et al.*, 2009, Liepinsh *et al.*, 2011). Ir parādīta arī šī savienojuma labvēlīga ietekme eksperimentālās diabētiskās neiropātijas gadījumā (Liepinsh *et al.*, 2009, Sokolovska *et al.*, 2011), kā arī pie citām diabēta komplikācijām cilvēkiem nelielos klīniskos pētījumos (Statsenko *et al.*, 2010; Botabekova *et al.*, 2004). Tomēr mildronāta efekti uz glikozes metabolismu ir nepietiekami pētīti diabēta modeļos ar izteiktu insulīna deficītu, kā arī nav datu par tā ietekmi uz diabētiskās nefropātijas patoģenēzi.

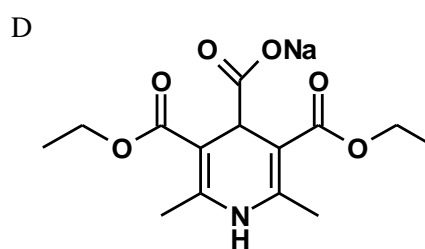
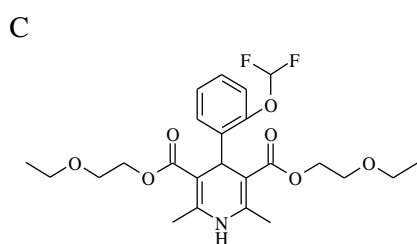
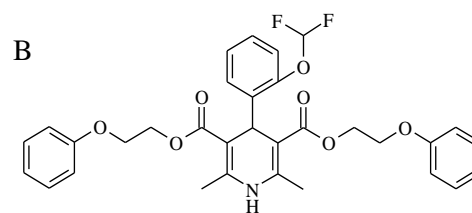
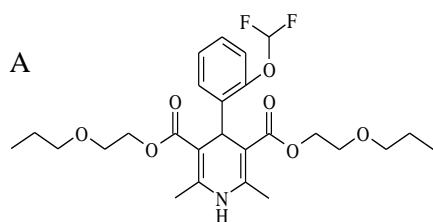


1.6.att. Mildronāta struktūras formula

Dažiem no Latvijas Organiskās sintēzes institūtā sintezētiem 1,4-dihidropiridīniem (sk. 1.8. att.) iepriekš veiktajos pētījumos ir konstatēta glikozes līmeni pazeminoša aktivitāte, kā arī antioksidatīvās un DNS reparāciju veicinošās īpašības (Briede *et al.*, 2007; Ryabokon *et al.*, 2008; Pupure *et al.*, 2008b), kas varētu būt labvēlīgas, ārstējot vai novēršot diabētisko komplikāciju, īpaši nefropātijas, attīstību.

Kopumā, ir nepieciešams iegūt vairāk datu par glikozes transportieru un NO[•] iesaisti diabētisko komplikāciju patoģenēzē, kā arī detalizētāk izpētīt potenciālo antidiabētisko

savienojumu - mildronāta un 1,4-dihidropiridīnu - ietekmi uz glikozes transportieru ekspresiju un NO[•] produkciju diabētisko komplikāciju patoģenēzes gaitā.



1.7.att. Cerebrokrasta (A), fenoflorona (B), etaftorona (C) un AV-153 (D) struktūras formulas.

2. MATERIĀLI UN METODEDES

Lielākā daļa šī promocijas darba tika izstrādāta eksperimentos ar žurkām, kurām tika ierosināts eksperimentālais cukura diabēts. Nelielu daļu darba veido rezultāti par NO^o metabolisma izmaiņām cilvēkiem ar 2. tipa cukura diabētu.

2.1. Laboratorijas dzīvnieki

Darba ietvaros cukura diabēta modeļa veidošanai tika izmantotas *Wistar* žurkas no Rīgas Stradiņa Universitātes Eksperimentālo dzīvnieku laboratorijas (Rīga, Latvija). Visas eksperimentālās procedūras tika veiktas saskaņā ar Eiropas Savienība direktīvas 2010/63/EU vadlīnijām un MK 2001. gada 23. oktobra noteikumiem Nr. 450 „Eksperimentos un zinātniskos nolūkos izmantojamo dzīvnieku turēšanas, izmantošanas, tirdzniecības un nogalināšanas kārtība”, un tās tika apstiprinātas Pārtikas un veterinārā dienesta Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomē (Rīga, Latvija) (pielikums 9.1). Darbā tika izmantoti balto *Wistar* žurku tēviņi ar svaru 200-220 g. Eksperimentu laikā dzīvniekus izvietoja Organiskās sintēzes institūta Bioķīmijas grupas dzīvnieku vivārija telpās (2008.-2010. gadā: Lielvārdes ielā 68, korpus 4; 2010.-2013. gadā: Kronvalda bulvārī 4). Pēc dzīvnieku piegādes eksperimentu veikšanas vietā tika ievērots 7 dienu adaptācijas periods, dzīvnieki tika turēti laboratorijas dzīvnieku būros 22 ± 0.5 °C temperatūrā ar 12 stundu gaismas/tumsas ciklu.

Pirms eksperimentiem un to laikā dzīvniekus baroja ar standarta laboratorijas barību (Tukuma Straume, Latvija) *ad libitum* ar brīvu pieeju dzeramajam ūdenim, bet dažas eksperimentālās grupas tika barotas ar R638 trekno barību ar 33% tauku saturu pēc svara (Lantmännen, Malme, Zviedrija).

Darbā ar dzīvniekiem tika izmantoti divi cukura diabēta modeļi: STZ 1. tipa cukura diabēta modelis (Rakieten *et al.*, 1963) un 2. tipa diabēta HS modelis (Zhang *et al.*, 2008).

2.1.1. STZ eksperimentālā cukura diabēta ierosināšana

STZ diabēta modeli (1. tipa cukura diabēta modeli) ierosināja, žurkām pēc 8-12 stundu badošanās ar brīvu pieeju ūdenim astes vēnā vienu reizi ievadot streptozotocīnu (Sigma, Vācija) devā 50 mg/kg. Preparātu atšķaidīja svaigi pagatavotā 10 mM Na citrāta buferī (pH 4,5), kopējais *i/v* injekcijas apjoms bija 0,2-0,25 ml.

Kontroles dzīvniekiem astes vēnā ievadīja 0,2 ml 10 mM citrāta buferi (pH 4,5). Cukura diabēta esamību dzīvniekiem pierādīja, mērot glikozes koncentrāciju venozajās asinīs 48 stundas pēc injekcijas. Žurkas ar glikozes līmeni >13.89 mmol/l (250 mg/dl) uzskatīja par diabētiskām. Uzreiz pēc cukura diabēta ierosināšanas dzīvniekiem bija brīvi pieejams ūdens un barība. Glikozes līmenis asinīs STZ modeļa žurkām netika koriģēts ar insulīna injekcijām.

2.1.2. HS cukura diabēta modeļa ierosināšana

HS diabēta modeli (2. tipa cukura diabēta modeli, pēc Zhang *et al.*, 2008). žurkām ierosināja, dzīvniekus divas nedēļas barojot ar trekno barību R638 (33% tauku pēc svara, sk. 1 tabulu). Pēc tam, kad dzīvniekiem 8-12 stundas tika liegta pieeja barībai (pieeja ūdenim bija brīva), ar nedēļas starplaiku tie saņēma divas *i.p.* streptozotocīna injekcijas devā 30 mg/kg, un tika baroti ar trekno diētu līdz eksperimenta beigām. Kontroles dzīvniekiem STZ vietā *i.p.* ievadīja 10 mM citrāta buferi (pH 4,5).

2 nedēļas pēc otrās streptozotocīna injekcijas dzīvnieki ar glikozes līmeni >7,8 mmol/l tukšā dūšā vai >11,1 mmol/l pēc ēšanas tika iekļauti diabētisko dzīvnieku grupā. Visu eksperimenta laiku HS grupas dzīvnieki tika baroti ar trekno R638 barību, bet kontroles grupas dzīvnieki – ar standarta barību. Visiem dzīvniekiem tika nodrošināta brīva pieeja dzeramajam ūdenim. Glikozes līmenis asinīs HS modeļa žurkām netika koriģēts ar insulīna injekcijām.

2.1. tabula. HF barības R638 sastāvs

	Masas %-	kJ/100 g	% no enerģētiskās vērtības
olbaltumvielas	18,0	279,01	17
tauki	33,0	979,67	58
šķiedrvielas	8,5	24,78	1
ogļhidrāti	27,0	406,47	24

2.2. Eksperimentu plānojums un vielu ievadīšana

Visus medikamentus dzīvnieki saņēma *per os*. Katrā eksperimentā pēc diabētiskā stāvokļa pierādīšanas, dzīvnieki tika nejaušināti sadalīti pa grupām tā, lai, uzsākot preparātu

ievadīšanu, vidējais svars un bioķīmiskie parametri starp grupām ar dažādu preparātu ievadi neatšķirtos nozīmīgi.

Pirms perorālas ievadīšanas mildronāta pulveri atšķaidīja destilētā ūdenī, glibenklamīdu atšķaidīja DMSO, metformīnu atšķaidīja destilētā ūdenī, 1,4-DHP grupas preparātus atšķaidīja NaCl 0,9% šķīdumā, kuram pievienoti daži pilieni 0,6% Tween-80 un etanola.

Lai izpētītu mildronāta ietekmi uz glikozes metabolisma parametriem un glikozes transportieru ekspresiju diabēta apstākļos, STZ un HS modeļa dzīvniekiem, 6 nedēļas sākot ar hiperglikēmijas pierādīšanas brīdi, mildronātu ievadīja *per os* katru dienu devā 100 mg/kg.

Lai salīdzinātu mildronāta hipoglikēmisko efektu un ietekmi uz glikozes transportētāju ekspresiju ar attiecīgajiem glibenklamīda efektiem, glibenklamīdu (2 mg/kg) perorāli STZ un HS modeļu dzīvniekiem ievadīja katru dienu 6 nedēļas sākot ar hiperglikēmijas pierādīšanās brīdi.

Lai salīdzinātu mildronāta hipoglikēmisko efektu un ietekmi uz glikozes transportētāju ekspresiju ar metformīna efektiem, metformīnu (100 mg/kg) perorāli STZ un HS modeļu dzīvniekiem ievadīja katru dienu 6 nedēļas, sākot ar hiperglikēmijas pierādīšanās brīdi.

Lai atklātu iespējamus aditīvos efektus uz ogļhidrātu un lipīdu vielmaiņu un glikozes transportieru ekspresiju, STZ modeļa un HS modeļa dzīvniekiem 6 nedēļas katru dienu perorāli ievadīja mildronātu (100 mg/kg) un metformīnu (100 mg/kg), vai mildronātu (100 mg/kg) un glibenklamīdu (2 mg/kg).

Lai pētītu dihidropiridīnu grupas preparātu ietekmi uz slāpekļa oksīda pārprodukciju pie cukura diabēta, STZ modeļa dzīvniekiem perorāli 3 dienas pēc kārtas no 9. līdz 12. dienai pēc STZ injekcijas ievadīja cerebrokrastu (0,5 mg/kg), etaftoronu (0,5 mg/kg), fenofloronu (0,5 mg/kg) vai AV-153 Kontroles dzīvnieki saņēma *per os* 0,5 ml ūdeni vai 0,5 ml DMSO (glibenklamīda efektu eksperimentos).

Lai pētītu slāpekļa oksīda biosintēzes mehānismus nierēs pie diabēta, STZ modeļa dzīvniekiem deviņas dienas pēc diabēta ierosināšanas ievadīja vienu no slāpekļa oksīda sintēzes inhibitoriem: aminoguanidīnu 200 mg/kg *i.p.* 30 min pirms eitanāzijas, allopurinolu 100 mg/kg *i.p.* 24 stundas pirms eitanāzijas, GdCl₃ 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas, 1400W 6 mg/kg *i.p.* 1 stundu pirms eitanāzijas.

Kopumā tika izveidotas 47 dzīvnieku grupas, katrā grupā pa 8-15 dzīvniekiem (sk. 2.2 tabulu): veselas žurkas (kurām ievadīti mildronāts, glibenklamīds, metformīns, mildronāta un glibenklamīda kombinācija, mildronāta un metformīna kombinācija, cerebrokrasts, etaftorons, fenoflorons, placebo kontroles), žurkas ar STZ diabēta modeli (kurām ievadīti mildronāts, glibenklamīds, metformīns, mildronāta un glibenklamīda kombinācija, mildronāta un metformīna kombinācija, cerebrokrasts, etaftorons, fenoflorons, AV-153, NO[•] biosintēzes

inhibitors aminoguanidīns, allopurinols, 1400W un $GdCl_3$, placebo), žurkas ar HS diabēta modeli (kurām ievadīti mildronāts, glibenklamīds, metformīns, mildronāta un glibenklamīda kombinācija, mildronāta un metformīna kombinācija vai placebo).

2.2. tabula. Pētījumā izmantoto dzīvnieku grupu raksturojums

Wistar žurkas bez diabēta	Wistar žurkas ar STZ diabēta modeli	Wistar žurkas ar HS diabēta modeli
1.-4. Tīrā (placebo) kontrole	16-19. STZ kontrole	41.-42. HS kontrole-2 grupas
5.-6. Mildronāts 100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	20-21. STZ+mildronāts 100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	43. HS+mildronāts 100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>
7. Glibenklamīds 2 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	22. STZ+glibenklamīds 2 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	44. HS+glibenklamīds 2 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>
8. Metformīns 100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	23. STZ+metformīns 100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	45. HS+metformīns 100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>
9. Mildronāts+metformīns 100+100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	24. STZ+mildronāts+metformīns 100+100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	46. HS+mildronāts+metformīns 100+100 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>
10. Mildronāts+glibenklamīds 100+2 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	25. STZ+mildronāts+glibenklamīds 100+2 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>	47. HS+mildronāts+glibenklamīds 100+2 mg/kg/d 6 nedēļas <i>per os</i>
11. Cerebrokrasts 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	26. STZ+cerebrokrasts 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	
12-13. Etaftorons 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	27. STZ+etaftorons 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	
14. Fenofitorons 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	28. STZ+fenofitorons 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	
15. AV-153 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	29. STZ+ aminoguanidīns 200 mg/kg <i>i.p.</i> 30 min pirms eitanāzijas	
	30. STZ+allopurinols 100 mg/kg <i>i.p.</i> 24 stundas pirms eitanāzijas	
	31. STZ+ $GdCl_3$ 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas	
	32. STZ+1400W 6 mg/kg <i>i.p.</i> 1 stundu pirms eitanāzijas	
	33.-39. STZ žurkas ar diabēta ilgumu no 48 stundām līdz 6 nedēļām	
	40. STZ+AV-153 0,5 mg/kg/d 3 dienas <i>per os</i>	

Atkarībā no eksperimenta, ārstēšanās laikā žurkām noteica izmaiņas sekojošiem rādītājiem: svars; glikozes, triglicerīdu, ketonvielu un HbA1c koncentrācija asinīs; kopējā

holesterīna un insulīna koncentrācija serumā. Papildus tam, orālajos glikozes tolerances testos tika pārbaudīta glikozes tolerance.

Eksperimenta beigās žurkas tika nogalinātas, izmantojot dekapitācijas metodi, un orgānu paraugi tika fiksēti 10% formalīna buferī turpmākajai imūnhistoķīmiskajai izpētei, un iesaldēti šķidrā slāpekļī turpmākajai NO[•] koncentrācijas noteikšanai un RNS izdalīšanai.

Žurku asins paraugi glikozes, triglicerīdu un ketonvielu koncentrācijas noteikšanai tika iegūti, punktējot astes vēnu. Asins paraugu iegūšanai no astes vēnas dzīvnieki tika uz laiku imobilizēti, izmantojot eksperimentu vajadzībām paredzētos slazdus. Asins paraugi insulīna, kopējā holesterīna, kā arī NO[•] koncentrācijas noteikšanai tika iegūti eksperimentu beigās, punktējot sirdi (iepriekš anestezētiem dzīvniekiem).

Dzīvnieku anestēzijai, atkarībā no eksperimenta, izmantoja ketamīnu (100 mg/kg, *i.p.*) un ksilazīnu (10 mg/kg, *i.p.*), pentobarbitālu (40 mg/kg, *i.p.*) vai dietilētera inhalāciju.

2.3. Materiāli

Reaktīvi: glibenklamīds, streptozotocīns, dimetilsulfoksīds (DMSO), nātrija citrāts, citronskābe, guanidīna tiocianāts, fenola šķīdums, glicīns, guanidīna hidrohlorīds, amonija tiocianāts, propanols-2 un TRIS nātrija hlorīda buferis tika iepirkti no Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Vācija, Taufkirchen), metformīns - no Advanced Technology and Industrial Co (Tai Kok Tsui, Honkonga, Ķīna). Mildronātu (3-(2,2,2-trimetilhidrazinij)propionāta dihidrātu) nodrošināja A/S Grindeks (Rīga, Latvija). Glikoze tika iepirkta no Chempur (Vācija, Karlsruhe). Nātrija dodecilsulfāts (SDS) un etanols tika iepirkti no SIA Enola (Latvija). Fizioloģiskais šķīdums (0,9% nātrija hlorīds), ketamīns, ksilazīns un pentobarbitāls tika iepirkti no SIA Tamro (Rīga, Latvija). Dietilēteris, dietiltiokarbamīda nātrija sāls (DETC) un dzelzs citrāts tika iegādāti no Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Vācija, Taufkirchen). Parafīns un ksilols, citi reaktīvi un materiāli imūnhistoķīmijas eksperimentiem tika iepirkti no SIA Diamedika (Latvija). Antivielas imūnhistoķīmijas veikšanai tika iegādātas no Abcam (Lielbritānija).

Darbā izmantojām centrifūgu Sigma 3-16K (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Ostrode am Harz, Vācija) un spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 25 UV/UVIS (Perkin Elmer, Waltham, ASV). Glikozes un ketonvielu koncentrāciju noteicām, izmantojot portatīvo glikometru *MediSense OptiumXceed* (Abbott Diagnostics Ltd, Maidenhead, Apvienotā Karaliste) un attiecīgās testa strēmeles, triglicerīdu koncentrāciju – ar glikometru *Accutrend GCT* (Hoffmann-La Roche Ltd., Bāzele, Šveice), izmantojot attiecīgās testa strēmeles.

HbA1c% noteicām ar aparātu Nycocard Reader (Axis –Shield, London, Apvienotā Karaliste) un Nycocard HbA1c testa komplektiem. Insulīna koncentrācijas noteikšanu veicām ar BioTek Elx808 plašu lasītāju, izmantojot Gen5 programmu. Kopējā holesterīna analīzes un slāpekļa oksīda metabolītu noteikšanu veicām ar PerkinElmer Lambda 25 spektrofotometru. Imūnhistoķīmijas eksperimentos preparātu izpētei izmantojām digitālo mikroskopu Motic un programmu Motic Image (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Vācija). Reālā laika PCR veicām ar aparātu StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ASV). RNS daudzumu un tīrības pakāpi noteicām ar biofotometru Eppendorf 613126820 (Eppendorf, Hamburga, Vācija), RNS izdalīšanas metodē izmantojām hibridizācijas inkubatoru GFL 7601 (Vācija).

2.4. Metodes

2.4.1. Bioķīmisko parametru noteikšana dzīvnieku paraugos

Glikozes un ketonvielu koncentrāciju noteicām ar portatīvo glikometru *MediSence Optium Exceed* un *MediSence* testa strēmēlēm glikozes un ketonvielu noteikšanai. Triglicerīdu koncentrāciju analizējām ar portatīvo glikometru Accutrend GCT un testa strēmēlēm triglicerīdu noteikšanai. Kopējā holesterīna koncentrāciju noteicām ar Instrumentation Laboratory Cholesterol determination kit (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, USA) spektrofotometriski. Insulīna koncentrāciju analizējām ar Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA Kit palīdzību (Crystal Chem Inc., Downers Grove, IL, USA) un BioTek Elx808 plašu lasītāju.

2.4.2. Orālā glikozes tolerances testa veikšana

Sākotnējo glikozes koncentrāciju žurkām noteicām tukšā dūšā pēc nakts badošanās (0 min). Pēc tam dzīvnieki saņēma *per os* glikozes šķīdumu ūdenī (2 g/kg *per os*). Turpmāk glikozes koncentrāciju noteicām 15 min, 30 min, 60 min un 120 min pēc dektrozēs ievadīšanas. Lai punktētu astes vēnu, žurkas uz laiku imobilizējām, izmantojot eksperimentu vajadzībām paredzētos slazdus.

2.4.3. NO[•] koncentrācijas noteikšana žurku audos

NO[•] saturu eksperimentālo dzīvnieku audos noteicām pēc A.F. Vaņina grupas izstrādātās metodes (Vanin, 1998). NO[•] koncentrācijas izmaiņas analizējām STZ modeļa žurku smadzeņu garozā, smadzenītēs, aknās, nierēs, asinīs, abdominālās aortas sienīnā, taukos un skeleta muskuļos.

Lai sagatavotu žurku audu paraugus NO[•] noteikšanai, pirms eitanāzijas žurkām kā NO[•] saistītāju ievadījām DETC Na sāli (40 mg/kg, intraperitoneāli, injekcijas tilpums 1-1,5 ml) un dzelzs citrātu (200 mg/kg, zem ādas, injekcijas tilpums 1-1,5 ml), kura rezultātā audos veidojas stabils DETC-Fe-NO komplekss. NO[•] daudzumu paraugos noteicām, analizējot šo kompleksu EPR spektrus. Asins un audu paraugus iepildījām insulīna šļircītēs, sasaldējām šķidrā slāpekļī, tad, atkausējot parauga ārējo slāni, izstūmām ārā, iegūstot 2 cm garus cilindriskus paraugus ar diametru 4 mm. EPR spektri reģistrēti 77°K temperatūrā, izmantojot spektrometru "Radiopan" SE/X2544 (Polija). EPR spektru tika iegūti pie sekojošiem parametriem: 25mW mikroviļņu jauda, 100kHz modulācijas frekvence, 5G modulācijas amplitūda, pastiprinājums $RG=0,5 \times 10^4$, laika konstante 1 sekunde. Relatīvo NO[•] daudzumu, kas 30 min laikā bija veidojies un ticis saistīts asinīs, noteicām pēc NO-DETC signāla trešās komponentes ($g=2,031$) augstuma. NO[•] koncentrācija (ng/g audu) tika aprēķināta, kā aprakstīts iepriekš (Vanin, 1998), izmantojot kalibrācijas līknes.

2.4.4. RNS izdalīšana un cDNS sagatavošana

Darbā GLUT1 ekspresiju noteicām nierēs, aknās un sirdī un skeleta muskuļos, GLUT4 ekspresiju analizējām sirdī un skeleta muskuļos, iNOS, eNOS un XOR ekspresiju mērījām nierēs.

Kopējā RNS tika izdalīta no aknām, nierēm, sirds un ciskas muskuļa, izmantojot TRI reaģentu (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Vācija). Audus homogenizējām stikla homogenizatorā (ja RNS izdalīšana notika uzreiz pēc dzīvnieku eitanāzijas) vai saberzējām šķidrā slāpekļī. 500 mg homogenizētu audu pārnesām mēģenē ar TRI reaģentu, samaisījām, inkubējām pie 60°C 5-15 min. Homogenātu centrifugējām pie 4500 g un +4°C 20 minūtes, atdalījām nešķīstošo materiālu. Supernatantu pārvietojām tīrā mēģenē, nostādinājām 5 min istabas temperatūrā, pievienojām 0,2 ml hloroforma uz 1 ml TRI reaģenta. Trauciņu cieši

aizvākojām, 15 s intensīvi kratījām un inkubējām 2-15 min istabas temperatūrā. Tālāk paraugu centrifugējām 4,500 x g 25 min 4°C. Pēc centrifugēšanas mēģenēs izveidojušos augšējo slāni pārvietojām tīrā mēģenē, pievienojām propanolu-2 (0,5 ml uz 1 ml TRI reaģenta) un inkubējām istabas temperatūrā 5-10 min. Pēc tam paraugu centrifugējām pie 4500 x g un 4°C 20 min. Supernatantu nolējām un atmazgājām RNS nogulsnes, pievienojot 1 ml 75% etanola uz 1 ml TRI reaģenta. Sakratījām mēģeni un centrifugējām pie 4500 x g un 4°C 20 min. RNS nogulsnes žāvējām gaisa plūsmā. Nogulsnes izšķīdinājām 150µl-300µl DEPC ūdenī (Fermentas, Viļņa, Lietuva)

RNS paraugi tika attīrīti no DNS, izmantojot *DNA-free* reaģentu komplektu (Ambion, Austin, TX, AVS). RNS daudzumu un tīrības pakāpi noteicām spektrofotometriski, RNS molekulu integritāti pārbaudījām ar gēla elektroforēzes metodi. Lai iegūtu cDNS, ar RNS (2 µg) veicām reverso transkripciju, izmantojot nejaušos heksamēra praimerus (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Viļņa, Lietuva).

2.4.1. Reālā laika polimerāzes ķēdes reakcija

GLUT1, GLUT4, iNOS, eNOS, XOR un references gēnu mRNS ekspresija tika noteikta, izmantojot SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, ASV). Amplifikācija un specifisko produktu noteikšana tika veikta ar aparātu StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, ASV), izmantojot sekojošu temperatūras un laika profilu: viens cikls 95°C 10 minūtes; 40 cikli 95°C 15 sekundes, 60°C 30 sekundes.

Lai pārbaudītu amplifikācijas produktu specifitāti, tika izmantots disociācijas līknes režīms (viens cikls 95° C 15 sekundes, 60° C 30 sekundes un 95° C 15 sekundes). Praimerus dizainēja, izmantojot Primer3 programmu (Rozen *et al.*, 2000). Praimerus pasūtīja Metabion International AG, Martinsried, Vācijā. Rezultātus analizēja ar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodi (Applied Biosystems StepOne programma, versija 2.1). Praimeru sekvenses GLUT1 gēnam bija šādas: tiešais praimeris 5'-ATGATGCGGGAGAAGAAGGT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-GAACAGCGACACCACAGTGA-3', sagaidāmā produkta garums 228 bp; GLUT4 gēnam: tiešais praimeris 5'-TGC CCG AAA GAG TCT AAA GC - 3' un atgriezeniskais praimeris 5'- TGG ACG CTC TCT TTC CAA CT - 3', sagaidāmā produkta garums 100 bp; iNOS gēnam: tiešais praimeris 5'-GCTACTTCCAACGCAACA-3' un atgriezeniskais praimeris 5'- CATGGTGAACACGTTCTTGG-3', sagaidāmā produkta garums 116 bp; eNOS gēnam: tiešais praimeris 5'- GAACCTGAGGGTGCCAG-3' un atgriezeniskais praimeris 5'

TCCGATTCAACAGTGTCTCCT-3', sagaidāmā produkta garums 110 bp, XOR gēnam: tiešais praimeris 5'-CGGACCCTGAAACAACACTT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-CAAGCAGGCATTGACAGAAA-3', sagaidāmā produkta garums 164 bp. Kā references gēni tika izmantoti RNA-polimerāze II (tiešais praimeris 5'-GCCAGAGTCTCCCATGTGTT-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-GTCGGTGGGACTCTGTTTGT-3', sagaidāmā produkta garums 135 bp), β-aktīns (tiešais praimeris 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' un atgriezeniskais praimeris 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3', sagaidāmā produkta garums 115bp).

2.4.2. Adu histoloģiskā un morfoloģiskā izmeklēšana

Histoloģiskā materiāla pagatavošanai audus (aknas, nieres, sirds un muskuļaudus) 48 stundas fiksēja 10% neitrāli buferētā formalīnā, pēc tam atūdeņoja un ieguldināja parafīnā un pagatavoja 4 μm biezus griezumus, kurus krāsoja ar hematoksilīnu-eozīnu.

Preparāti tika analizēti, izmantojot digitālo mikroskopu *Motic* un datorprogrammas *Motic Image Advance 3.2* versiju.

Aknu audos pēc 16 ballu sistēmas tika novērtēta adu bojājuma pakāpe, saskaitot atsevišķu procesu intensitātes novērtējumu (modificētu histoloģiskās aktivitātes indeksu, HAI) pēc *Ishak*, 1995: iekaisuma šūnu infiltrācija - 0 - 4 balles; hepatocītu nekroze ap centrālo vēnu - 0 - 4 balles; hepatocītu nekroze un apoptoze daiviņu perifērijā - 0 - 4 balles; portālo traktu iekaisuma pārmaiņas - 0 - 4 balles.

Portālo traktu iekaisuma pārmaiņas tika vērtētas šādi:

1 balle: *Minimālās pārmaiņas*. Portālo traktu iekaisuma pazīmes nav izteiktas. Hepatocīti iet bojā apoptozes ceļā reti. Parenhīmas fibrozi nenovēro.

2 balles: *Vāji izteiktas pārmaiņas*. Parenhīmā ir atrodamas nelielas hepatocītu grupas, kas iet bojā apoptozes ceļā. Šādi parenhīmas apvidi ir infiltrēti ar limfocītiem un bojātās vietās veidojas limfohistiocitārā infiltrācija. Portālo traktu iekaisums ir minimāls. Retas ekstramedulārās hemopoēzes pazīmes.

3 balles: *Mēreni izteiktas pārmaiņas*. Dažās daiviņās novērojama hepatocītu bojāeja, vietām lokalizējas fokālie un zonālie iekaisuma infiltrāti. Portālie trakti paplašināti un ir redzami perēkļveida infiltrāti ar limfocītiem un makrofāgiem. Šādās zonās novēro žultsvadu epitēlija proliferāciju un ekstramedulārās hemopoēzes aktivācijas pazīmes.

4 balles: *Stipri izteiktas pārmaiņas*. Portālie trakti ir paplašināti un satur iekaisuma infiltrātus. Daiviņās atrodami fokāli un perēkļaini leukocitāri un makrofagāli infiltrāti. Sinusoīdos bieži novēro limfocītu ķēdītes un megakariocītus.

Nieru audos vērtēja kamoliņu un kanāliņu izmērus, kā arī stromas pārmaiņas (pilnasinība, fibroze, iekaisuma šūnu infiltrācija).

Sirds audos vērtēja limfohistiocitāru infiltrāciju (0-4 baļļu skalā, kur: 0 - nav infiltrācijas, 1 - infiltrācija < 25%, 2 - no 25 - 50%, 3 - no 50% - 75%, 4 - miokarda infiltrācija >75% no miokarda), kā arī kardiomiocītu nekrotiskās izmaiņas, kuras izteica procentos no kopējā miokarda laukuma. Tika vērtēti arī kodolu izmēri.

Muskuļu audos vērtēja limfohistiocitāro infiltrāciju (0-4 baļļu skalā, kur: 0 - nav infiltrācijas, 1 - infiltrācija < 25%, 2 - infiltrācija 25 - 50%, 3 - infiltrācija 50% - 75%, bet 4 - muskuļaudu infiltrācija > 75% no kopējās audu masas), kā arī miocītu nekrotiskās izmaiņas, kuru izteicām procentos no kopējā muskuļaudu laukuma. Tika vērtēti arī kodolu izmēri.

2.4.3. Imūnhistoķīmiskā izmeklēšana

Šajā darbā proteīnu ekspresija audos tika noteikta, izmantojot imūnhistoķīmijas metodi. Audu paraugi tika apstrādāti pēc Di Stefano *et al.* (2000) protokola, GLUT1 proteīna ekspresija STZ un HS diabēta modeļu dzīvniekiem tika pētīta aknās, nierēs, sirdī un skeleta muskuļos. GLUT4 proteīna ekspresija STZ modeļa dzīvniekiem tika analizēta sirdī un muskuļos. iNOS, XOR un eNOS proteīna ekspresija STZ modeļa dzīvniekiem tika noteikta nierēs.

Sākumā preparātus deparafinizējām, ievietojot tos attiecīgajos šķīdumos: ksilolā – 15 min, 96° etanolā 6 min, 70° etanolā 4 min.

Antigēna demaskēšanai proteīnu ekspresijas noteikšanas metodē izmantojām apstrādi ar mikroviļņiem. Preparātus inkubējām nātrija citrāta buferī pie pH=6.2 mikroviļņu krāsnī 15 minūtes pie jaudas 300W. Tālāk preparātus inkubējām ar peroksidāzes bloķētājreaģentu 10minūtes, tad skalojām TRIS buferētā sāls šķīdumā (TBS). Pēc tam veicām 1stundu ilgu inkubāciju ar monoklonālajām GLUT1, GLUT4, iNOS, eNOS, XOR antivielām (Abcam, Lielbritānija).

Antivielas saistīšanās audos parādījām, preparātus inkubējot ar polimēru EnVision (DAKO, Dānija, Glostrup) 30 minūtes istabas temperatūrā.

Vizualizācijas reakciju veica ar 3,3-diaminobenzidīnu (DAB), kurš iezīmēja antigēna-antivielas saistīšanās vietas brūnā krāsā.

Preparāti tika analizēti, izmantojot *Motic Image* programmu. GLUT1, GLUT4, iNOS, XOR un eNOS pozitīvās šūnas tika skaitītas divdesmit nejauši izvēlētos laukos ar palielinājumu x 400. Rezultāti tika izteikti kā šūnu skaits uz kvadrātmilimetru. Morfoloģiskās izmeklēšanas laikā veicām trīs atkārtotus pozitīvu šūnu mērījumus 10 nejauši izvēlētos

slaidos, un rezultātu atkārtojamība tika novērtēta ar izmeklēšanas variācijas koeficientu un izmeklēšanas korelācijas koeficientu. Izmeklēšanas variācijas koeficients bija 6 %, izmeklēšanas korelācijas koeficients bija 0,92.

2.5. Klīniskais pētījums

2.5.1. Pacientu raksturojums

Pētījumā tika iesaistīti 42 pacienti, un visi dalībnieki parakstīja informētās piekrišanas formu. Pētījums veikts saskaņā ar Helsinku deklarāciju, un tā atbilstību bioētikas normām apstiprināja Centrālā medicīnas ētikas komiteja (10.07.2013. atzinums Nr. 01-29.1/3, sk. pielikumu 9.2.).

Pētījuma grupu veidoja 26 pacienti ar diagnozi 2. tipa cukura diabēts, kuri iestājās izmeklēšanai vai terapijas korekcijai Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas endokrinoloģijas nodaļā vai endokrinoloģijas nodaļas dienas stacionārā. Iekļaušanas kritēriji šajā grupā bija: 2. tipa cukura diabēta diagnoze, diabēta stāžs lielāks par 2 gadiem.

Kontroles grupu veidoja 16 pacienti bez iepriekš diagnosticēta diabēta vai glikozes tolerances traucējumiem, kuri iestājušies Paula Stradiņa klīniskās universitātes slimnīcas terapijas nodaļā plānveida izmeklēšanai sakarā ar arodslimību vai neprecizētu radiācijas ietekmi (Černobiļa avārijas sekas likvidētāji). Izslēgšanas kritēriji abās grupās bija akūta vai hroniska urīnceļu infekcija, akūta iekaisuma pazīmes (CRP > 5 mg/l, paaugstināta ķermeņa temperatūra, paaugstināts EGĀ un leukocitoze), onkoloģiska saslimšana, reimatoloģiskā profila slimība.

2.5.2. Klīnisko paraugu bioķīmiskās analīzes

Pacientiem tika veiktas sekojošas klīniskās analīzes: pilna asins aina, EGĀ, asins bioķīmija (HbA1c%, lipidogramma, kreatinīns, ALAT, C-peptīds), urīna analīze (ar stripu+mikroskopija), mikroalbuminūrija diennakts urīnā. Pilnu asins ainu, asins bioķīmiju un urīna analīzi veica, izmantojot standartizētās metodes, PSKUS Apvienotajā laboratorijā (Pilsõņu 13, Rīga, Latvija), bet mikroalbuminūrijas noteikšanu diennakts urīnā, izmantojot standartizētās metodes – NMS laboratorijā (Nacionālais Medicīnas Serviss – Laboratorija, Bīķernieku 25A, Rīga, Latvija). Pacientiem tika ņemtas asinis slāpekļa oksīda radikāļa (NO[•]) koncentrācijas noteikšanai (stobriņā ar heparīnu) un nitrātu/nitrītu koncentrācijas noteikšanai (stobriņā bez antikoagulanta).

2.5.3. Slāpekļa oksīda koncentrācijas noteikšana pacientu asinīs

Lai noteiktu NO[•] saturu pacientu asins paraugos, apmēram 30-60 min pēc asins parauga noņemšanas, svaigas heparinizētas asinis inkubēja ar NO[•] saistītāju DETC Na sāli (10 mg/ml) 30 minūtes. Turpmākā paraugu apstrāde neatšķīrās no dzīvnieku audu apstrādes NO[•] noteikšanai (sk. sadaļu “NO[•] koncentrācijas noteikšana žurku audos”).

2.5.4. NO₂⁻ un NO₃⁻ summārās koncentrācijas noteikšana pacientu serumā

Lai sagatavotu seruma paraugus NO₂⁻ un NO₃⁻ noteikšanai, tie tika deproteinizēti, izmantojot Amicon Ultra filtrus cetrifugēšanai (kat. Nr UFC800324, Millipore Ireland Ltd, Īrija). NO₂⁻ un NO₃⁻ noteikšanai izmantoja reaģentu komplektu Cayman's Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit (kat. Nr 780001, Cayman Chemical Compony, Ann Arbor, Minesota, ASV) un Perkin Elmer Lambda 25 UV/UVIS spektrofotometru (Perkin Elmer, Waltham, ASV). Nitrītu koncentrācija tika aprēķināta, izmantojot standartlīkni, kas tika uzņemta, izmantojot reaģentu komplekta NaNO₂ standartvielu.

2.6. Datu statistiskā apstrāde

Datu statistiskai analīzei tika izmantotas programmas Microsoft Excel, SPSS un GraphPad Prim5. Statistisko testu ticamība tika noteikta pie p<0,05.

Dzīvnieku eksperimentu rezultāti grupās tika izteikti kā vidējais ± standartkļūda (S.E.M). Lai noteiktu, vai atšķirība starp grupām ir būtiska, tika izmantota vienfaktora dispersijas analīze (ANOVA) ar sekojošu neatkarīgo paraugu nepāra *t*-testu, *Newman-Keuls* testu, *Tukey* testu, *Dunnet* testu vai *Mann-WhitneyU*-testu (*Mann-Whitney*). Ja dati neatbilda normālam sadalījumam, vairāku grupu salīdzināšanu veica ar *Kruskal-Wallis* testu ar sekojošu *Dunn's* pēctestu vai *Mann-WhitneyU*-testu. Darba rezultātu sadaļā par pacientiem, kvantitatīvie mainīgie tika izteikti kā vidējais aritmētiskais ± standartnovirze (SD). Nomināliem mainīgiem tika piešķirts kods (piemēram, primāra arteriāla hipertensija : ir=1, nav=0). Dati, kuri neatbilda normālajam sadalījumam, tika pārveidoti un izteikti logaritmiskajā skalā. Lai noteiktu vidējā aritmētiskā atšķirības starp grupām, izmantoja nepāra *t* testu. Grupu raksturošanai tika izmantots *H²*-kvadrāta tests. Divu kvantitatīvo faktoru salīdzināšanai izmantoja korelāciju analīzi pēc Pīrsona vai Spīrmana koeficienta un lineāro regresiju.

3. REZULTĀTI

3.1. Ar streptozotocīnu inducētu žurku eksperimentāla cukura diabēta modeļu metabolo parametru raksturojums un farmakoloģisko līdzekļu ietekme uz tiem.

Pētījumā mēs izmantojām divus cukura diabēta eksperimentālus modeļus – STZ inducēto (modelis ar izteiktu hiperglikēmiju un smagu insulīna deficītu, 1. tipa diabēta modelis) un HS inducēto (modelis ar mērenu hiperglikēmiju, mērenu insulīna deficītu un hiperlipidēmiju, 2. tipa diabēta modelis).

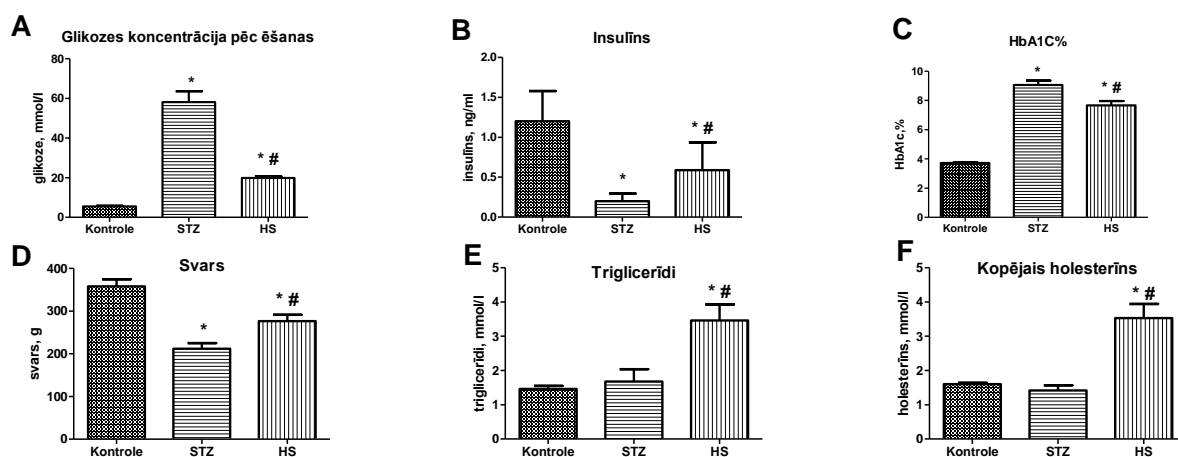
Metabolisma rādītāju atšķirības grupās tika noteiktas ar vienvirziena ANOVA testu un sekojošu *Newman-Keuls* pēctestu. Paēdušiem dzīvniekiem ar STZ diabēta modeli (STZ grupa) 6 nedēļas pēc diabēta ierosināšanas un HS inducēta eksperimentālā diabēta dzīvniekiem (HS grupa) 8 nedēļas pēc diabēta ierosināšanas vidējais glikozes līmenis izteikti pārsniedza $5,48 \pm 0,45$ mmol/l, - lielumu, kas bija raksturīgs kontroles grupai. Tā - STZ grupā glikozes koncentrācija bija $58,11 \pm 5,53$ mmol/l, bet HS grupā - $19,92 \pm 0,77$ mmol/l ($F(2,27)=70,7$, $p<0,0001$). HS grupā glikozes līmenis bija zemāks nekā STZ grupā ($p<0,0001$).

Insulīna līmenis STZ un HS grupu dzīvniekiem, salīdzinot ar kontroles grupu, bija samazināts (kontrolē: $1,2 \pm 0,12$ ng/ml, STZ: $0,2 \pm 0,03$ ng/ml, HS: $0,59 \pm 0,11$ ng/ml; $F(2,27)=27,81$, $p<0,0001$). Savukārt STZ grupā insulīna koncentrācija bija zemāka nekā HS grupā ($p<0,001$).

Tāpat HbA1c% STZ un HS grupās bija augstāks nekā kontroles grupā, bet HS grupā statistiski ticami zemāks nekā STZ grupā (kontrolē: $3,72 \pm 0,05\%$; STZ: $9,06 \pm 0,31\%$, HS: $7,67 \pm 0,29\%$; $F(2,27)=126$, $p<0,0001$).

Žurkām ar eksperimentālo diabētu svara pieaugums bija mazāks nekā veseliem dzīvniekiem. Turklāt HS grupā žurkas bija smagākas ($p<0,001$) nekā STZ grupā (kontrolē: $358 \pm 16,85$ g, STZ: $212 \pm 13,10$ g, HS: $276 \pm 14,72$ g, $F(2,27)=23,82$, $p<0,0001$).

Metabolismu raksturojošie bioķīmiskie parametri ir doti 3.1. attēlā. HS žurkām, salīdzinot ar kontroli un STZ grupu ($p<0,01$), triglicerīdu koncentrācija serumā bija paaugstināta (kontrolē: $1,46 \pm 0,09$ mmol/l; STZ: $1,68 \pm 0,36$ mmol/l, HS: $3,46 \pm 0,47$ mmol/l; $F(2,27)=10,06$, $p<0,0001$). Tāpat HS žurkām, salīdzinot ar kontroli un STZ grupu ($p<0,0001$), novēroja paaugstinātu kopējā holesterīna koncentrāciju (kontrolē: $1,6 \pm 0,04$ mmol/l, STZ: $1,42 \pm 0,15$ mmol/l, HS: $3,53 \pm 0,41$ mmol/l; $F(2,27)=21,36$, $p<0,0001$).



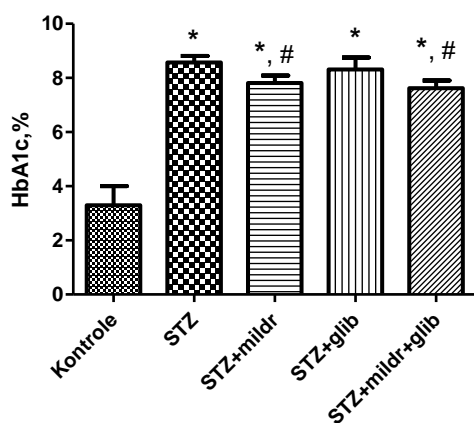
3.1.att. Metabolisma izmaiņas STZ un HS modeļu žurkām. A- glikozes koncentrācija asinīs paēdušiem dzīvniekiem; B – insulīna koncentrācija dzīvniekiem tukšā dūšā; C – glikozilētā hemoglobīna saturs; D – svars; E – triglicerīdu koncentrācija dzīvniekiem tukšā dūšā; F – kopējā holesterīna koncentrācija dzīvniekiem tukšā dūšā. STZ – 1. tipa diabēta modelis, HS – 2. Tipa diabēta modelis. * $p < 0,001$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls tests*), # $p < 0,001$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

3.1.1. Mildronāta un tā kombināciju ar metformīnu vai glibenklamīdu ietekme uz metaboliskiem parametriem eksperimentālā diabēta STZ modelī

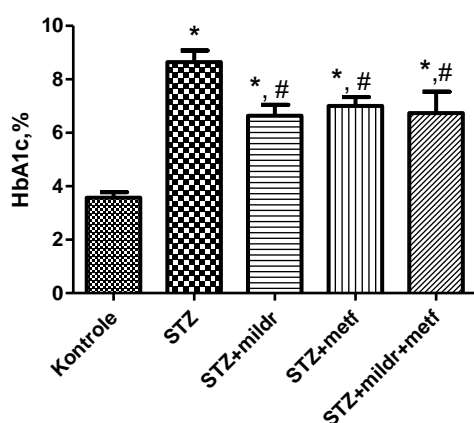
Viens no darba uzdevumiem bija noskaidrot, vai mildronāts un tā kombinācijas ar metformīnu vai glibenklamīdu spēj uzlabot ogļhidrātu un lipīdu metabolismu abos izvēlētajos eksperimentālajos cukura diabēta modeļos.

STZ modelī mildronāts un tā kombinācija ar glibenklamīdu pēc 6 nedēļas ilgas ārstēšanas statistiski ticami samazināja HbA1c% ($p < 0,05$), bet glibenklamīda monoterapijai HbA1c% pazeminošo efektu nenovēroja (kontrolē: $3,3 \pm 0,7\%$; STZ: $8,57 \pm 0,24\%$; STZ+mildr: $7,81 \pm 0,28\%$, STZ+glib: $8,31 \pm 0,44\%$, STZ+mildr+glib: $7,62 \pm 0,28\%$; $F(4,70) = 26,13$, $p < 0,0001$) (3.2.att.).

STZ modelī mildronāts uzrādīja metformīnam līdzīgu HbA1c% samazinošo efektu, bet mildronāta un metformīna kombinācijai, salīdzinājumā ar atsevišķi lietotiem preparātiem, izteiktāku efektu nenovēroja (kontrolē: $3,57 \pm 0,21\%$, STZ: $8,65 \pm 0,43\%$, STZ+mildr: $6,64 \pm 0,41\%$, STZ+metf: $7,00 \pm 0,34\%$; STZ+mildr+metf: $6,74 \pm 0,80\%$; $F(4,39) = 21,63$, $p < 0,0001$) (3.3.att.).



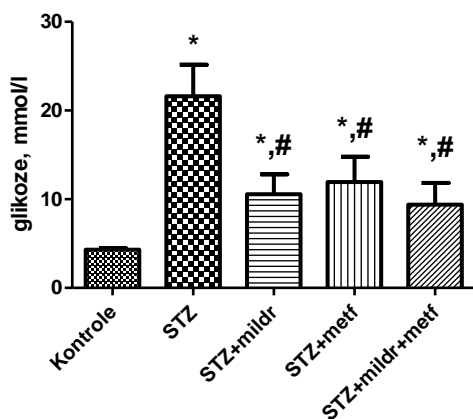
3.2.att. HbA1c% dzīvnieku grupās, kas ārstētas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem



3.3.att. HbA1c% dzīvnieku grupās, kas ārstētas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), vai mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

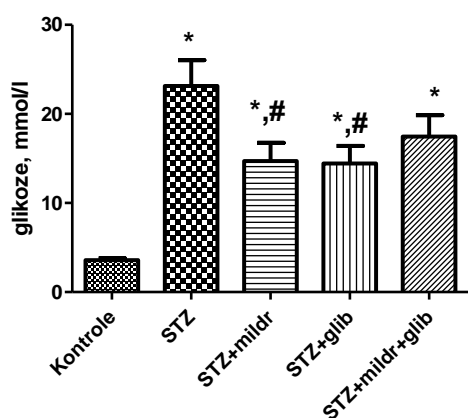
Glikozes koncentrācijas samazināšanos dzīvniekiem tukšā dūšā novēroja mildronāta, metformīna un mildronāta+metformīna grupā. Taču preparātu vienlaicīga lietošana, salīdzinot ar atsevišķi lietotiem preparātiem, papildus uzlabojumu nedeva (glikoze neēdušiem dzīvniekiem kontrolē: $4,31 \pm 0,17$ mmol/l, STZ: $21,61 \pm 3,56$ mmol/l, STZ+mildr: $10,55 \pm 2,27$ mmol/l, STZ+metf: $11,94 \pm 2,84$ mmol/l, STZ+mildr+metf: $9,38 \pm 2,46$ mmol/l, $F(4,47)=6,159$,

=0,0005) (sk. 3.4. att.). Arī paēdušām STZ žurkām, kuras saņēma mildronātu, metformīnu vai to kombinācijas glikozes koncentrācijas izmaiņas bija līdzīgas (sk. 3.6. att.).



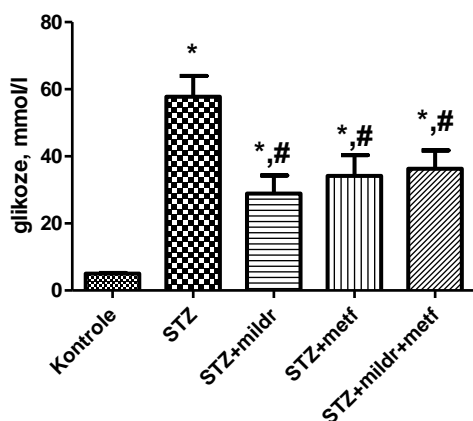
3.4.att. Glikozes koncentrācija tukšā dūšā dzīvniekiem, kas ārstēti ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os) vai mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os) ievadīšanas. * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Salīdzinot ar STZ grupu, statistiski ticamu glikozes pazeminošu efektu (sk. 3.5. att.) novēroja arī glibenklamīdam ($p < 0,01$) un mildronātam ($p < 0,01$), bet šo preparātu kombinācija glikozes līmeni dzīvniekiem tukšā dūšā statistiski nozīmīgi nepazemināja (STZ: $23,15 \pm 2,88$ mmol/l, STZ+mildr: $14,17 \pm 2,04$ mmol/l, STZ+glib: $14,43 \pm 1,99$ mmol/l, STZ+mildr+glib: $17,46 \pm 2,41$ mmol/l; $F(4,64)=8,399$, $p < 0,0001$). Līdzīgas glikozes līmeņa izmaiņas novēroja arī paēdušiem dzīvniekiem (3.7.att.).

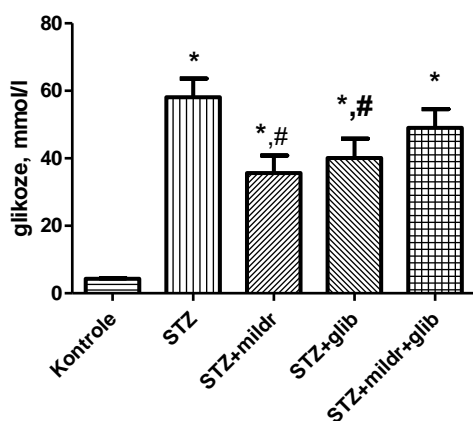


3.5.att. Glikozes koncentrācija tukšā dūšā dzīvniekiem, kas ārstēti ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os), vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os) ievadīšanas. * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Tādējādi jāsecina, ka lietojot mildronātu kombinācijā ar glibenklamīdu vai metformīnu, glikozes līmeņa samazinājums nav lielāks kā mildronāta grupā.

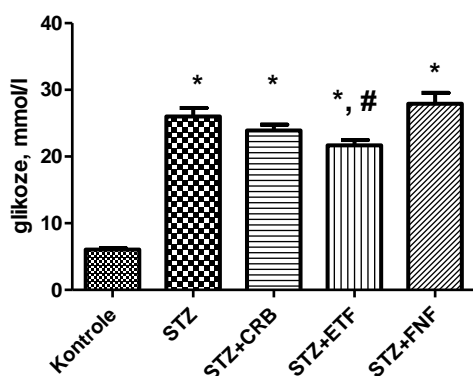


3.6.att. Glikozes koncentrācija paēdušiem dzīvnieku, kas ārstēti ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem



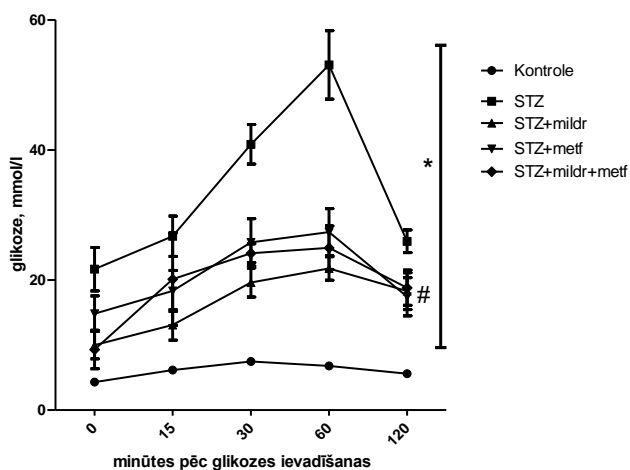
3.7.att. Glikozes koncentrācija paēdušiem dzīvniekiem, kas ārstēti ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Glikozes koncentrācija paēdušiem dzīvniekiem tika noteikta arī ar dihidropiridīnu klases preparātiem ārstētiem dzīvniekiem (pēc 3 dienu terapijas devā 0,5 mg/kg) (sk. 3.8.att.). Glikozes līmeni STZ modeļa žurkām pazemināja tikai etaforons ($p < 0,05$) (STZ: 26,03±1,26 mmol/l, STZ+cerebrokrasts: 23,92±0,85 mmol/l, STZ+etaforons; 21,67±0,8 mmol/l, STZ+fenoftorons; 27,93±1,61 mmol/l; $F(4,45)=68,39$, $p < 0,0001$).



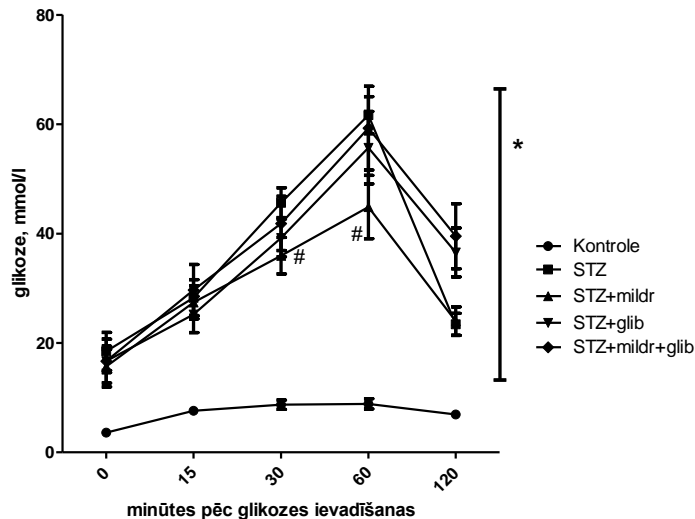
3.8.att. Glikozes koncentrācija paēdušiem dzīvniekiem, kas ārstēti ar cerebrokrastu (CRB; 0,5 mg/kg/d, 3 dienas, *per os*), etaftoronu (ETF; 0,5 mg/kg/d, 3 dienas, *per os*) vai fenofloronu (FNF; 0,5 mg/kg/d, 3 dienas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls tests*). # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Glikozes tolerances testos (sk. 3.9.att.) mildronāts, metformīns un abu preparātu kombinācija nozīmīgi uzlaboja glikozes toleranci ($p < 0,05$), bet metformīna un mildronāta kombinācijai nenovēroja lielāku efektu nekā atsevišķi lietotiem preparātiem. Glikozes līmenis 120 minūtes pēc glikozes perorālas ievadīšanas grupās bija šāds - kontrolē: $5,61 \pm 0,3$ mmol/l, STZ: $25,96 \pm 1,73$ mmol/l, STZ+mildr: $18,29 \pm 2,83$ mmol/l, STZ+metf: $17,43 \pm 2,94$ mmol/l, STZ+mildr+metf: $18,82 \pm 2,7$ mmol/l, $F(4,49) = 18,51$, $p < 0,0001$.



3.9. att. Vidējās glikozes koncentrācijas vērtības orālā glikozes tolerances testā STZ diabēta žurkām, kas ārstētas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), vai mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). Ordinātu ass – glikozes koncentrācija, abscisu ass – minūtes pēc glikozes ievadīšanas. * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, OGTT testā visās STZ dzīvnieku grupās vidējās glikozes vērtības bija augstākas nekā kontroles grupā (*Newman-Keuls tests*), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Glibenklamīds un tā kombinācija ar mildronātu neuzlaboja STZ grupas dzīvnieku glikozes toleranci (sk. 3.10. att.).



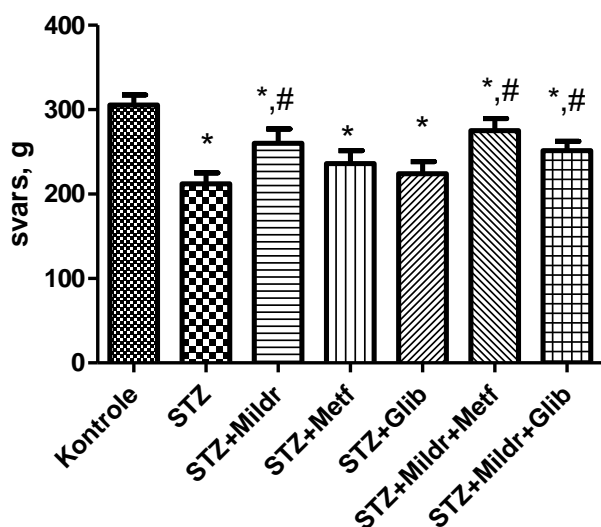
3.10. att. Vidējās glikozes koncentrācijas vērtības orālā glikozes tolerances testā žurkām pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*).

Ordinātu ass – glikozes koncentrācija, abscisu ass – laiks (minūtēs) pēc glikozes ievadīšanas. * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, OGTT testā visās STZ dzīvnieku grupās vidējās glikozes vērtības bija augstākas nekā kontroles grupā (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

STZ grupas dzīvniekiem nenovēroja statistiski ticamu pielietotās terapijas ietekmi uz kopējā holesterīna, triglicerīdu un ketonvielu koncentrāciju (nav attēlots). Glibenklamīda un mildronāta+glibenklamīda terapija izraisīja nelielu insulīna līmeņa palielināšanos (STZ: $0,20 \pm 0,03$ ng/ml, STZ+glibenklamīds: $0,31 \pm 0,03$ ng/ml; STZ+mildronāts+glibenklamīds: $0,35 \pm 0,07$ ng/ml; $p < 0,05$), tomēr šķiet, ka pie tik niecīgām insulīna koncentrācijām šādām izmaiņām nav klīniskas nozīmes.

Mildronāts un tā kombināciju ar metformīnu vai glibenklamīdu samazināja svara zudumu STZ žurkām pēc 6 nedēļu terapijas (STZ: $212,22 \pm 13,10$ g, STZ+mildronāts: $260,00 \pm 17,13$ g, STZ+mildronāts+glibenklamīds: $251,43 \pm 11,00$ g; STZ+mildronāts+metformīns: $275,00 \pm 14,43$ g; $F(6,63) = 5,154$, $p < 0,002$).

Savukārt glibenklamīda un metformīna monoterapija dzīvnieku svaru neietekmēja (sk. 3.11. att.). Tas varētu nozīmēt, ka mildronāts veicina anabolos procesus, uzlabojot jutību pret insulīnu vai citādā veidā veicinot glikozes transportu šūnās.



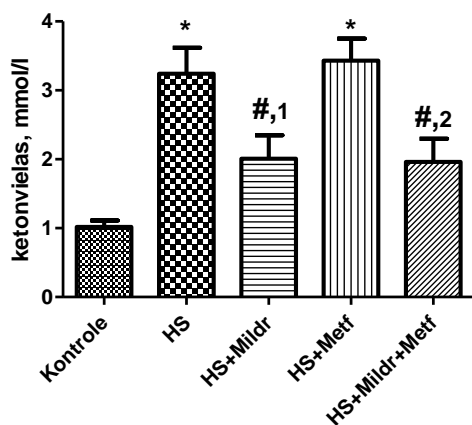
3.11.att. Dzīvnieku masas izmaiņas dzīvnieku grupās, kas ārstētas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (nepāra *t*-tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (nepāra *t*-tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais ± S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

3.1.2. Mildronāta un tā kombināciju ar metformīnu un glibenklamīdu ietekme uz metabolisma parametriem eksperimentālā diabēta HS modelī

Dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu HS modelī visās grupās, salīdzinot ar kontroles grupu, svars bija samazināts, bet 6 nedēļu terapija ar mildronātu, glibenklamīdu, metformīnu vai preparātu kombinācijām to neietekmēja (nav parādīts).

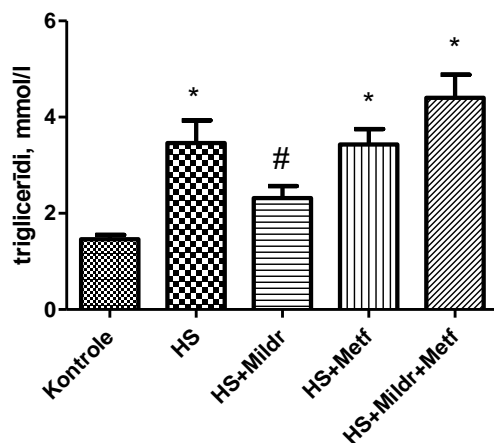
Tāpat preparātu ietekmē nenovēroja glikozes līmeņa izmaiņas kā neēdinātiem, tā arī paēdušiem dzīvniekiem.

Glibenklamīda un mildronāta+glibenklamīda terapija neizmainīja ketonvielu līmeni (nav parādīts), bet mildronāta monoterapija un mildronāta kombinācija ar metformīnu ketonvielu koncentrāciju pazemināja (sk. 3.12.att.). Vidējā ketonvielu koncentrācija grupās bija šāda:- kontrolle: $1,02 \pm 0,09$ mmol/l, HS: $3,24 \pm 0,38$ mmol/l, HS+mildr: $2,01 \pm 0,34$ mmol/l, HS+metf: $3,43 \pm 0,32$ mmol/l, HS+mildr+metf: $1,96 \pm 0,34$ mmol/l; $F(4,45)=10,27$, $p < 0,0001$). Turklāt, kombinējot mildronātu ar metformīnu, ketonvielu līmenis samazinājās, kas netika novērots metformīna monoterapijas grupā.



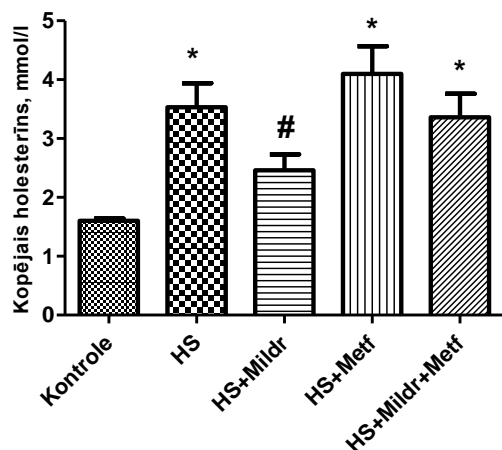
3.12.att. Ketonvielu līmenis HS dzīvnieku grupās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Newman-Keuls* tests), ¹ $p < 0,05$, salīdzinot HS+metf un HS+mildr grupu, ² $p < 0,05$, salīdzinot HS+metf un HS+mildr+metf grupu. Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

HS žurkām novēroja arī paaugstinātu triglicerīdu līmeni (kontrolē: 1,46±0,09 mmol/l, HS: 3,46±0,47 mmol/l, $p < 0,05$), kuru pazemināja mildronāts (2,32± 0,25 mmol/l, $p < 0,05$ pret HS grupu) (sk. 3.13.att.). Glibenklamīda, metformīna vai mildronāta kombinācijām ar glibenklamīdu un metformīnu šāda efekta nebija.



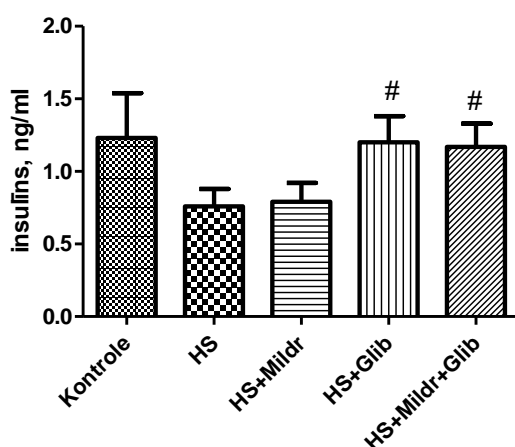
3.13.att. Triglicerīdu līmenis HS dzīvnieku grupās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombinācijas ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). Rezultāts pēc grupu salīdzināšanas ar vienvirziena ANOVA $F(4,45)=10,39$, $p < 0,0001$; * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (nepāra *t* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

No visiem izmantotajiem preparātiem un kombinācijām vienīgi mildronāts HS žurkām pazemināja kopējā holesterīna daudzumu (sk. 3.14. att.).



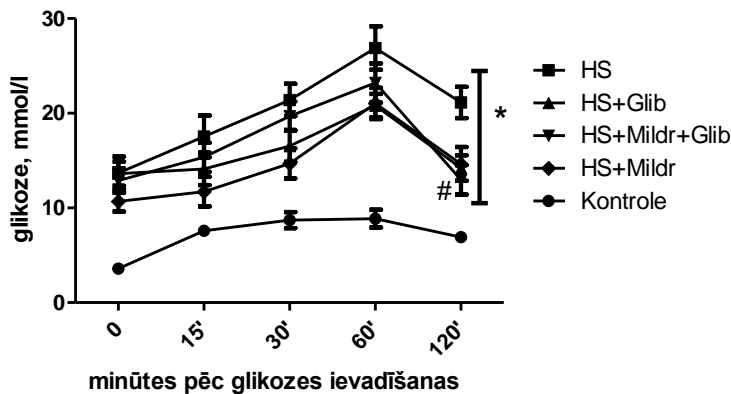
3.14.att. Kopējā holesterīna līmenis HS dzīvnieku grupās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (nepāra *t* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Insulīna līmeni HS žurkām palielināja tikai glibenklamīds un tā kombinācija ar mildronātu (kontrolē: $1,23 \pm 0,31$ ng/ml; HS: $0,76 \pm 0,12$ ng/ml; HS+glib: $1,20 \pm 0,18$ ng/ml; HS+mildr+glib: $1,17 \pm 0,16$ ng/ml; $p < 0,05$ salīdzinot HS un HS+glib (nepāra *t*-tests)); $p < 0,05$ salīdzinot HS un HS+mildr+glib (nepāra *t*-tests) (sk. 3.15. att.). Metformīnam un mildronāta kombinācijai ar metformīnu ietekmes uz insulīna koncentrāciju nebija (nav parādīts).



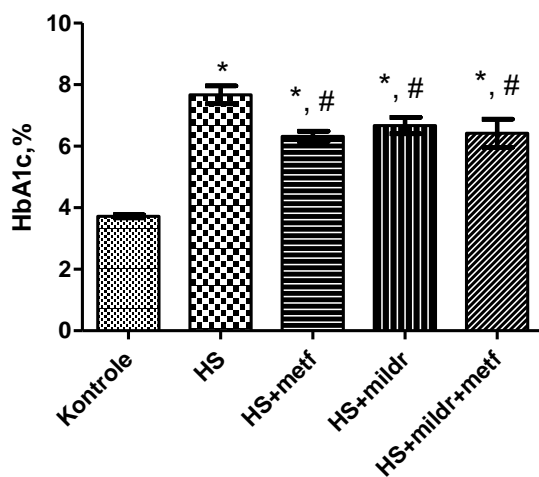
3.15.att. Insulīna līmenis HS dzīvnieku grupās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (nepāra *t* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Interesanti, ka atšķirībā no STZ žurkām, HS žurkām glikozes tolerance OGTT laikā uzlabojās mildronāta, mildronāta+glibenklamīda un glibenklamīda ietekmē (3.16. att.), bet neuzlabojās metformīna ārstēšanas rezultātā (nav attēlots).



3.16.att. OGTT rezultāti HS dzīvnieku grupās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, OGTT laikā visās HS dzīvnieku grupās vidējās glikozes vērtības bija augstākas, nekā kontroles grupā (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Dzīvnieku masa HS grupās bija mazāka, salīdzinot ar kontroli. Pielietotā terapija masas dinamiku neietekmēja (nav parādīts).



3.17.att. HbA1c% līmenis HS dzīvnieku grupās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Ārstēšana ar glibenklamīdu un tā kombināciju ar mildronātu neietekmēja HS grupu žurku HbA1c% (nav parādīts). Savukārt metformīns, mildronāts un abu preparātu kombinācija samazināja HbA1c% statistiski ticami (kontrolē: $3,72 \pm 0,05\%$, HS: $7,67 \pm 0,29\%$, HS+metf: $6,32 \pm 0,17\%$, HS+mildr: $6,67 \pm 0,27\%$, HS+mildr+metf: $6,42 \pm 0,46$ mmol/l; $F(4,45)=26,83$, $p < 0,0001$), (sk. 3.17.att)..

3.2. Glikozes transportētāju ekspresijas izmaiņas cukura diabēta un farmakoloģisko līdzekļu ietekmē

3.2.1. GLUT1 ekspresijas izmaiņas nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu STZ modeļi

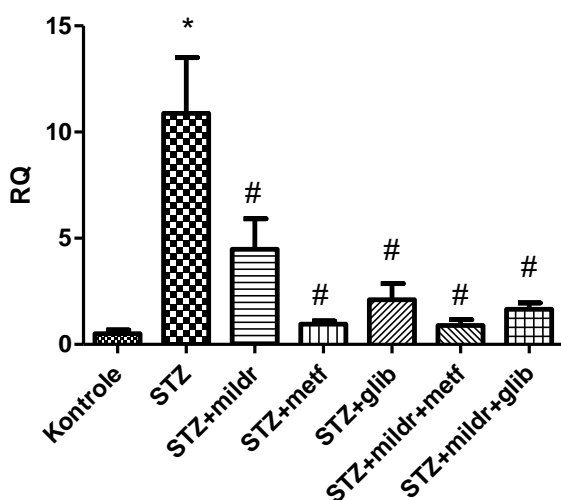
Izmeklējot eksperimentālo žurku nierēs histoloģiski, konstatējām, ka STZ diabēts izraisa nelielas deģeneratīvas pārmaiņas nierēs, kas izpaužas kā perēkļveida nieru kanāliņu hidropiskā un graudainā distrofija, glomeruļu tūska, pilnasinība. Visās ārstēto diabētisko dzīvnieku grupās, kuri saņēma mildronātu, glibenklamīdu, metformīnu vai mildronāta kombinācijas ar abiem preparātiem, minētās iekaisīgajās un deģeneratīva rakstura pārmaiņas bija mazāk izteiktas (nav attēlots). Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti parāda, ka nierēs GLUT1 ekspresē proksimālo un distālo kanāliņu šūnas. Salīdzinot GLUT1 ekspresiju dažādos orgānos - aknās, nierēs, sirdī un muskuļaudos - jāsecina, ka nierēs tā ekspresija ir visizteiktākā.

mRNS ekspresija tika izteikta kā RQ (relative quantification vai relatīvā kvantificēšana, kas nozīmē gēna ekspresijas izmaiņas salīdzinot ar kontroles paraugu. Šajā darbā gēna ekspresija vienā no kontroles grupas paraugiem tika pieņemta par 1, bet visu pārējo paraugu gēna ekspresija tika izteikta, salīdzinot ar šo paraugu).

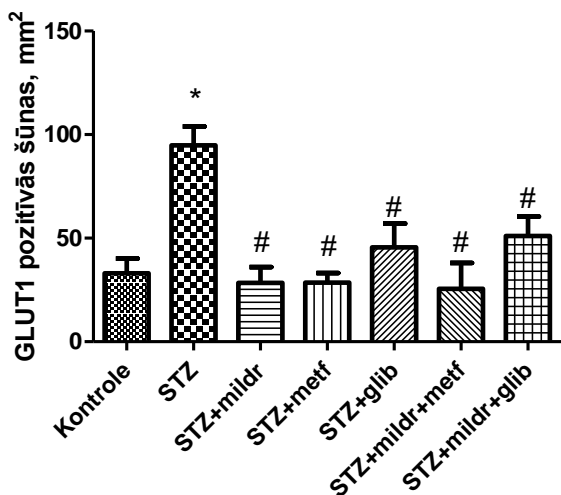
STZ žurkām novērojām izteiktu GLUT1 mRNS ekspresijas pieaugumu (RQ – kontrole: $0,51 \pm 0,17$; STZ: $10,88 \pm 2,625$; STZ+mildr: $4,48 \pm 1,43$; STZ+metf: $0,95 \pm 0,15$; STZ+glib: $2,11 \pm 0,766$; STZ+mildr+metf: $0,89 \pm 0,27$; STZ+mildr+glib: $1,65 \pm 0,31$; $F(6,34)=5,52$). Savukārt ārstēšana ar mildronātu, glibenklamīdu, metformīnu vai mildronāta kombinācijām ar metformīnu un glibenklamīdu to atkal samazināja ($p < 0,05$, *Newman-Keuls* tests; sk. 3.18.att.).

Arī vērtējot proteīna līmeni, GLUT1 ekspresija pieauga STZ modeļa dzīvniekiem, un tā samazinājās pielietoto preparātu un to kombināciju ietekmē (vienvirziena ANOVA

$F(6,28)=7,019$, $p<0,0001$. STZ diabēts palielināja GLUT1 pozitīvo šūnu skaitu nierēs – (STZ) 94 ± 9 vs. (kontrolē) 33 ± 7 šūnas/mm², $p = 0,002$ (sk. 3.19. att).



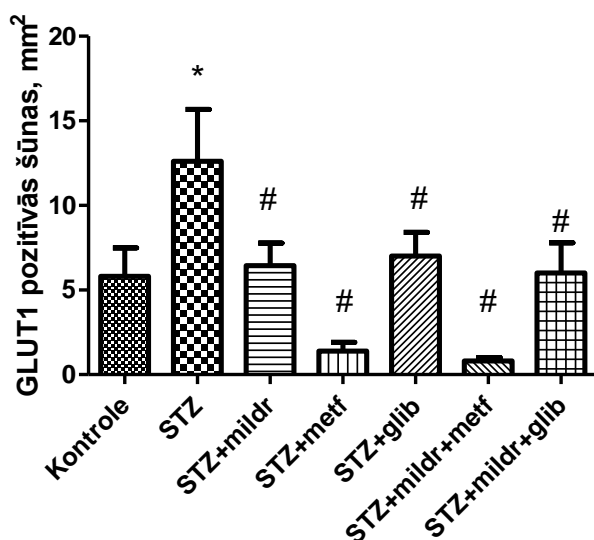
3.18.att. GLUT1 mRNS ekspresija STZ žurku nierēs pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*). * $p<0,05$, salīdzinot ar kontrolē grupu, (*Newman-Keuls tests*), # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem



3.19.att. GLUT1 pozitīvo šūnu skaits STZ žurku nierēs pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p<0,05$, salīdzinot ar kontrolē grupu, (*Newman-Keuls tests*), # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

STZ modeļa žurkām mildronāts, glibenklamīds, kā arī mildronāta un glibenklamīda kombinācija samazināja GLUT1 pozitīvo šūnu skaitu, salīdzinot ar streptozotocīna grupu - (STZ+mildr): 28 ± 8 vs (STZ) 94 ± 9 šūnas/ mm^2 , $p = 0,02$; un (STZ+mildr+glib): 47 ± 11 vs (STZ) 94 ± 9 šūnas/ mm^2 , $p = 0,01$; (STZ+metf): 29 ± 5 vs (STZ): 94 ± 9 šūnas/ mm^2 , (STZ+mildr+metf): 26 ± 12 vs (STZ): 94 ± 9 šūnas/ mm^2 (sk. 3.19. att.). Jāatzīmē, ka mildronāta kombinācijas ar glibenklamīdu un metformīnu neizraisīja izteiktāku GLUT1 ekspresijas samazinājumu nierēs nekā atsevišķi lietotie preparāti.

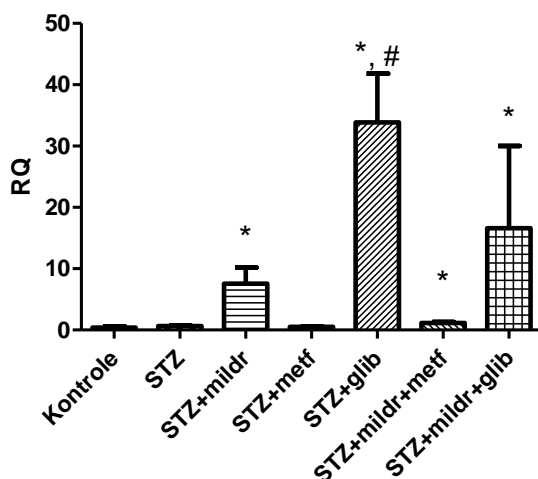
Izvērtējot proteīna līmeni aknās, jāsecina, ka GLUT1 ekspresija STZ grupas žurkām pieaug, bet pielietotie terapijas veidi to statistiski ticami samazināja (sk. 3.20. att). GLUT1 proteīna ekspresija aknās eksperimentālajās grupās bija šāda- kontrole: $5,6 \pm 1,69$ šūnas/ mm^2 , STZ: $12,6 \pm 3,08$ šūnas/ mm^2 , STZ+mildr $6,4 \pm 1,3$ šūnas/ mm^2 , STZ+metf $1,4 \pm 0,5$ šūnas/ mm^2 , STZ+glib: $7 \pm 1,4$ šūnas/ mm^2 , STZ+mildr+metf: $0,8 \pm 0,2$ šūnas/ mm^2 , STZ+mildr+glib: $6 \pm 1,79$ šūnas/ mm^2 ; $F(6,32)=5,11$, $p=0,0009$.



3.20.att. GLUT1 pozitīvo šūnu skaits STZ žurku aknās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem

GLUT1 mRNS izmaiņas aknās bija neviennozīmīgas (sk. 3.21.att.). Atšķirībā no GLUT1 proteīna ekspresijas, STZ grupā GLUT1 mRNS ekspresija nepieauga. Taču, salīdzinot ar kontroles grupu, tā pieauga, ārstējot diabētiskās žurkas ar mildronātu, glibenklamīdu vai mildronāta un glibenklamīda kombināciju ($p < 0,05$).

Savukārt STZ+glib grupā GLUT1 mRNS pieauga arī salīdzinot ar STZ grupu ($p<0,05$). RQ dati grupās bija šādi - kontrole: $0,4\pm0,2$; STZ: $0,63\pm0,16$; STZ+mildr: $7,56\pm2,62$; STZ+metf: $0,51\pm0,10$; STZ+glib: $33,87\pm7,94$; STZ+mildr+metf: $1,148\pm0,16$; STZ+mildr+glib: $16,58\pm13,45$; $F(6,37)=6,785$, $p<0,0001$. Ņemot vērā GLUT1 proteīna ekspresijas datus STZ žurku aknās, šie rezultāti varētu norādīt uz GLUT1 ekspresijas pēctranskripcijas modifikācijām.

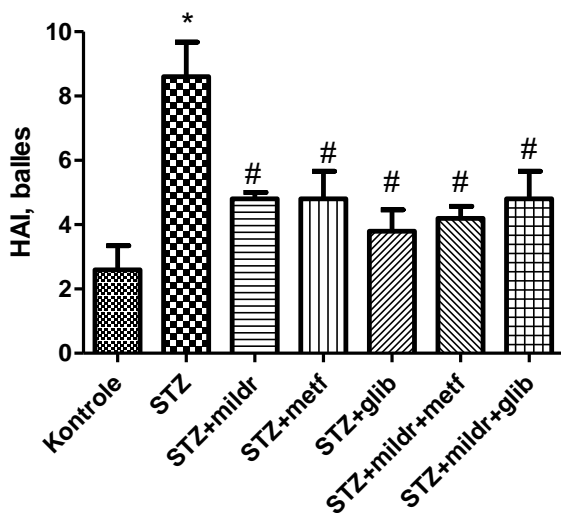


3.21.att. GLUT1 mRNS ekspresija STZ žurku aknās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, per os) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d 6 nedēļas, per os). * $p<0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (Newman-Keuls tests), # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem

STZ žurkām aknās novērojām deģeneratīvās pārmaiņas un iekaisumu, kas izpaudās kā fokālā hepatocītu vakuolārā un taukainā deģenerācija, paplašināti un infiltrēti ar iekaisuma šūnām portālie trakti, palielināts megakariocītu skaits, fokālā hepatocītu nekroze un apoptoze. Šie kritēriji vērtējām pēc histoloģiskā aktivitātes indeksa (HAI) 16 baļļu sistēmā. STZ diabēts izraisīja izteiktu aknu bojājumu, bet ārstējot STZ grupas žurkas ar mildronātu, glibenklamīdu, metformīnu vai mildronāta kombināciju ar metformīnu un glibenklamīdu, bojājuma pakāpe aknās statistiski ticami samazinājās (3.22.att.) - kontrole: $2,60 \pm 0,74$ balles, STZ: $8,6 \pm 1,08$ balles, STZ+mildr: $4,80 \pm 0,20$ balles, STZ+glib: $3,8 \pm 1,48$ balles, STZ+metf: $4,8\pm2$ balles; STZ+mildr+glib: $4,80 \pm 0,86$ balles, STZ+mildr+metf: $4,2\pm0,8$ balles; datus analizēja ar vienvirziena ANOVA, $F(6,28)=6,3$, $p<0,0003$.

Sirds audos STZ diabēts izraisīja nelielas deģeneratīvas un iekaisīgās pārmaiņas: perēkļveida graudaino distrofiju, sīkperēkļaino mezenhimālo un parenhimatozo taukaino deģenerāciju, tūsku, pilnasinību un nelielu limfocitāro infiltrāciju. Visās ārstēto

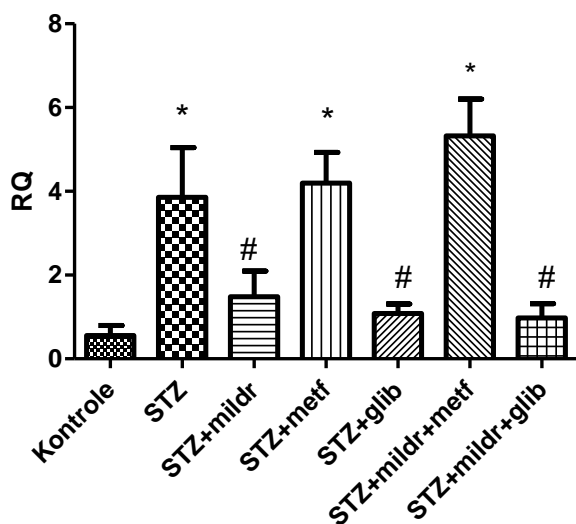
diabētisko dzīvnieku grupās, kuri saņēma mildronātu, glibenklamīdu, metformīnu vai mildronāta kombinācijas ar abiem preparātiem, minētās iekaisīgās un deģeneratīva rakstura pārmaiņas bija mazāk izteiktas. Sirds audos GLUT1 proteīna ekspresija bija niecīga. Tā pārsvarā tika novērota endokardā un perikardā, savukārt miokardā to novēroja perivaskulāri atsevišķajos kardiomiocītos.



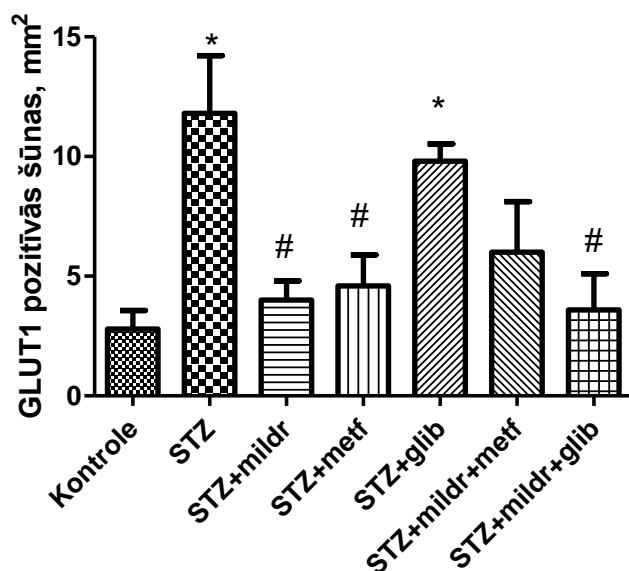
3.22.att. Aknu bojājuma pakāpe STZ žurku aknās (novērtēta pēc HAI indeksa 16 baļļu skalā) pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais ± S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

GLUT1 mRNS ekspresija ir lielāka STZ grupā, bet tā samazinājas, ievadot žurkām mildronātu ($p < 0,05$), glibenklamīdu ($p < 0,05$) vai mildronāta un glibenklamīda kombināciju ($p < 0,05$). GLUT1 mRNS ekspresija miokardā bija šāda: - RQ: kontrolē $0,56 \pm 0,24$; STZ: $3,86 \pm 1,18$; STZ+mildr: $1,48 \pm 0,62$; STZ+metf: $4,2 \pm 0,73$; STZ+glib: $1,09 \pm 0,23$; STZ+mildr+metf: $5,33 \pm 0,88$; STZ+mildr+glib: $0,98 \pm 0,34$, $F(6,36)=4,74$; $p=0,0012$ (sk. 3.23. att).

STZ žurkām sirds audos novēroja GLUT1 proteīna ekspresijas pieaugumu (kontrolē 4 ± 1 šūnas/mm² vs STZ 11 ± 2 šūnas/mm², $p = 0,02$), bet mildronāta un metformīna ievadīšana to normalizēja (STZ: 11 ± 2 šūnas/mm², STZ+mildr: 5 ± 1 šūnas/mm²; STZ+metf: 5 ± 2 šūnas/mm², $p < 0,05$ pret STZ grupu).



3.23.att. GLUT1 mRNS ekspresija STZ žurku sirdīs pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar STZ grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem



3.24. att. GLUT1 pozitīvo šūnu skaits STZ žurku sirdīs pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

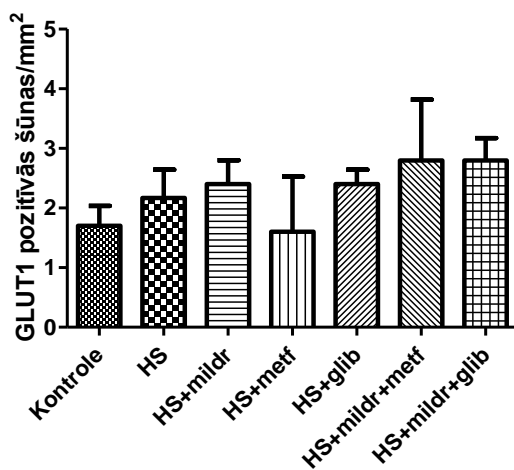
Savukārt glibenklamīds palielināto GLUT1 ekspresiju neietekmēja (3.24. att.). Mildronāta kombinācijām ar glibenklamīdus novērots GLUT1 proteīna ekspresiju pazeminošais efekts, taču tas nebija lielāks kā mildronātam *per se* (STZ+mildr+glib: 3 ± 1 vs STZ: 11 ± 2 , šūnas/mm², $p=0.02$ (3.24. att.)). Mildronāta un metformīna kombinācijai bija tendence samazināt GLUT1 proteīna ekspresiju. GLUT1 proteīna ekspresijas atšķirības sirdī eksperimentālās grupās analizēja ar vienvirziena ANOVA ($F(6,38)=6,365$, $p<0,0001$) un *Newman-Keuls* pēctestu.

Skeleta muskuļos GLUT1 ekspresija bija niecīga un nepietiekami izteikta, lai varētu analizēt atšķirības starp grupām.

3.2.2. GLUT1 ekspresijas izmaiņas nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu HS modelī

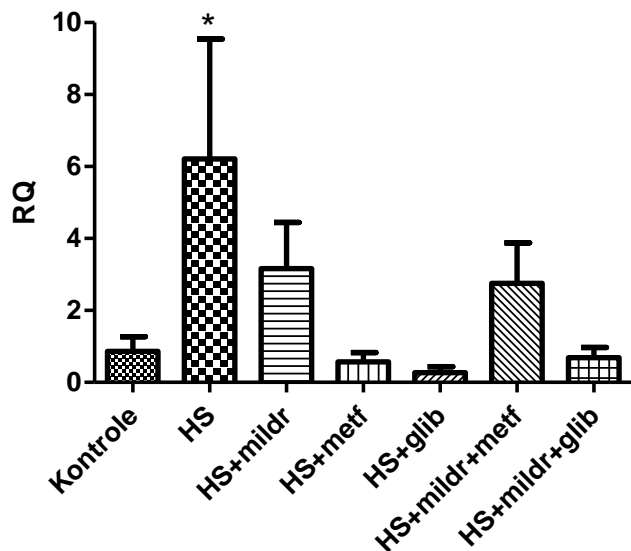
Dzīvniekiem ar eksperimentālo HS diabētu aknās novēroja nelielu statistiski nozīmīgu HAI palielinājumu, bet aknu bojājuma pakāpe bija daudz mazāka, nekā STZ modeļa dzīvniekiem. Arī izmantotā terapija šo maz izteikto bojājumu neietekmēja (nav parādīts).

Tāpat GLUT1 ekspresija HS žurku aknās būtiski nemainījās (3.25. att), salīdzinot ar kontroli, kā arī to neietekmēja pielietotā terapija ar mildronātu, metformīnu, glibenklamīdu vai mildronāta un metformīna vai mildronāta un glibenklamīda kombinācijām (analizēts ar vienvirziena ANOVA; $F(6,39)=0,75$; $p=0,61$.)



3.25. att. GLUT1 pozitīvo šūnu skaits HS žurku aknās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p<0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Newman-Keuls* tests), # $p<0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

Salīdzinot ar kontroli, HS žurku aknās pastiprināti tika ekspresēta GLUT1 mRNS (RQ – kontrole: $0,86 \pm 0,41$; HS: $6,21 \pm 3,33$; $p < 0,05$), bet pārējās grupas savā starpā neatšķīrās (sk. 3.26. att.).

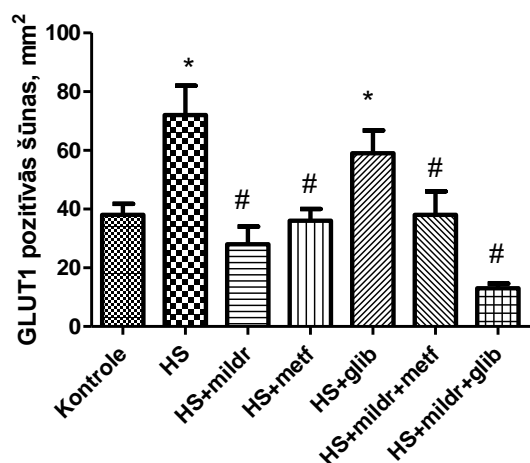


3.26. att. GLUT1 mRNS ekspresija HS žurku aknās pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) s. * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (Newman-Keuls tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (Newman-Keuls tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais ± S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem

HS žurku skeleta muskuļos GLUT1 ekspresija bija pārāk niecīga un nepietiekama, lai analizētu atšķirības starp grupām.

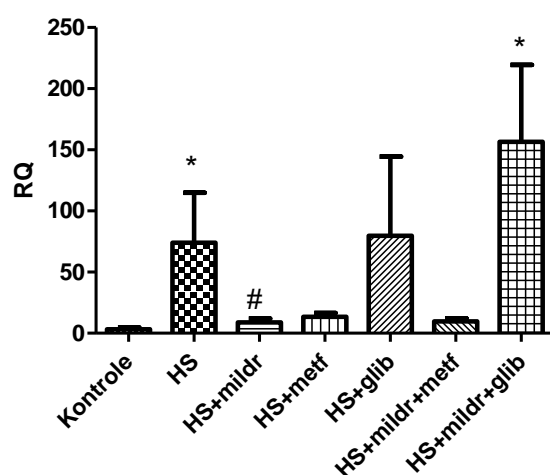
Arī HS modeļa dzīvniekiem GLUT1 proteīna ekspresija bija visizteiktākā nierēs, salīdzinot ar to, ko novēroja aknās, sirdī un muskuļos. Analizējot vidējos GLUT1 proteīna ekspresijas rādītājus grupās ar vienvirziena ANOVA, konstatējām statistiski ticamas atšķirības starp HS dzīvnieku grupām ($F(6,28) < 0,0001$). HS dzīvniekiem GLUT1 proteīna ekspresija pieauga nieru distālos un proksimālos kanāliņos (kontrolē: $38 \pm 3,8$ vs HS: 72 ± 10 šūnas/mm², $p < 0,05$).

Ievadot HS modeļa žurkām mildronātu, metformīnu, mildronāta kombinācijas ar metformīnu vai glibenklamīdu, GLUT1 ekspresija normalizējās (HS+mildr: 28 ± 6 šūnas/mm², HS+metf: 36 ± 4 šūnas/mm², HS+metf+mildr: 38 ± 8 šūnas/mm², HS+mildr+glib: $13 \pm 1,6$ šūnas/mm², $p < 0,05$ vs HS 72 ± 10 šūnas/mm²). Glibenklamīda monoterapijai šādas ietekmes nebija (HS+glib: $59 \pm 7,8$ šūnas/mm², $p > 0,05$ vs HS) (sk. 3.27.att.).



3.27.att. GLUT1 pozitīvo šūnu skaits HS žurku nierēs pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

GLUT1 mRNS ekspresija pēc HS žurku 6 nedēļu ārstēšanas grupās atšķīrās, analizējot ar vienvirziena ANOVA, $F(6,38)=3,34$, $p=0,0096$. HS grupā GLUT1 mRNS ekspresija pieauga (kontrolē $3,26 \pm 1,29$; HS RQ: $74,13 \pm 40,80$, $p < 0,05$, *Mann-Whitney U*-tests). Statistiski ticamu GLUT1 gēna ekspresijas samazinājumu HS žurkām novēroja tikai mildronāta grupā (HS+mildr RQ: $8,94 \pm 3,05$, $p < 0,05$ salīdzinot ar HS grupu, sk. 3.28. att.).

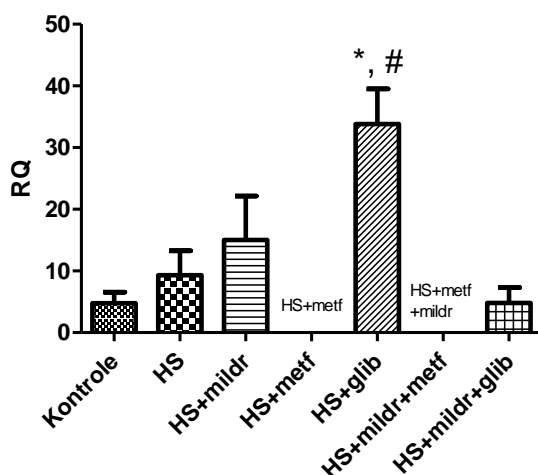


3.28.att. GLUT1 mRNS ekspresija HS žurku nierēs pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot

ar kontroles grupu, (*Mann-Whitney U-tests*), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Mann-Whitney U-tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem

Analizējot GLUT1 mRNS ekspresijas datus HS modeļa žurkām sirdī ar vienvirziena ANOVA, konstatēta statistiski ticamas atšķirības ($F(4,20)=6,77$, $p=0,0013$). GLUT1 mRNS ekspresija HS grupā (RQ: $9,32 \pm 3,94$) un HS+mildr grupā (RQ: $15,03 \pm 7,12$), kā arī HS+mildr+glib grupā (RQ: $4,79 \pm 2,51$) salīdzinot ar kontroles grupu (RQ: $4,77 \pm 1,79$; $p > 0,05$, *Mann-Whitney U-tests*) būtiski neizmainījās.

HS+metf un HS+mildr+metf grupās GLUT1 mRNS ekspresija nebija nosakāma, bet glibenklamīda grupā, salīdzinot ar kontroles un HS grupu, novēroja izteiktu GLUT1 gēna ekspresijas pieaugumu (RQ: $33,83 \pm 5,68$; $p < 0,05$, *Mann-Whitney U-tests*), līdz (sk. 3.29. att.).

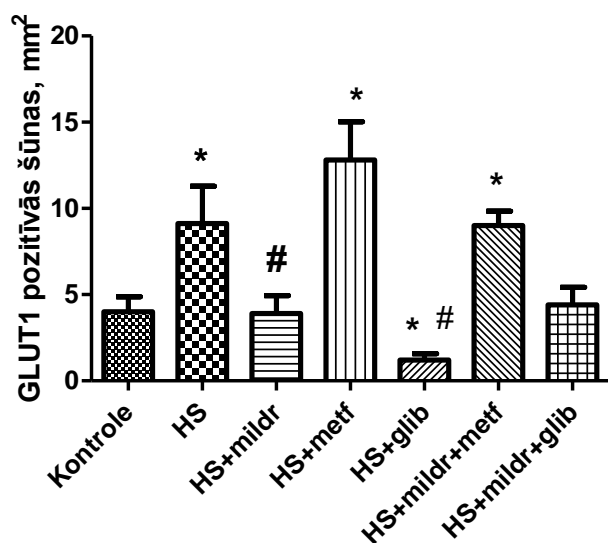


3.29.att. GLUT1 mRNS ekspresija HS žurku sirdī pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*) ievadīšanas.

* $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Mann-Whitney U-tests*), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Mann-Whitney U-tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem

Atšķirīgi rezultāti tika iegūti par GLUT1 proteīna ekspresiju sirdī HS modeļa dzīvniekiem. Starp grupām tika novērota statistiski ticama atšķirība, analizējot ar vienvirziena ANOVA, $F(6,41)=6,86$, $p < 0,0001$. HS dzīvniekiem, salīdzinot ar kontroles grupu, GLUT1 proteīna ekspresija pieauga (kontrolē: $4,00 \pm 0,87$ šūnas/mm², HS: $9,13 \pm 2,17$ šūnas/mm², $p < 0,05$, *Neuman-Keuls tests*), bet to normalizēja mildronāta un samazināja - glibenklamīda terapija (HS+mildr $3,90 \pm 1,04$ šūnas/mm², HS+glib $1,20 \pm 0,37$ šūnas/mm², $p < 0,05$, *Neuman-*

Keuls tests (sk. 3.30. att.). Metformīnam, kā arī preparātu kombinācijām nekādu ietekmi uz GLUT1 proteīna ekspresiju sirdī HS dzīvniekos nenovēroja.

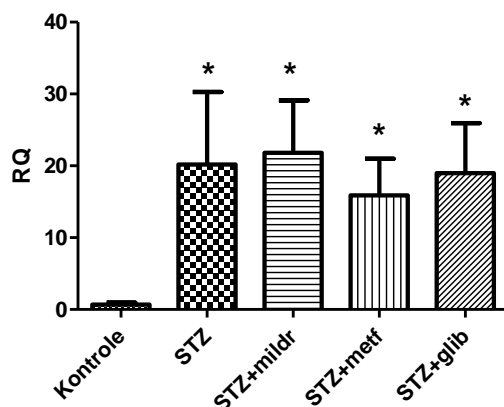


3.30.att. GLUT1 proteīna ekspresija HS žurku sirdī pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas), mildronāta kombināciju ar metformīnu (100+100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai mildronāta kombināciju ar glibenklamīdu (100+2 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Newman-Keuls* tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Newman-Keuls* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem.

3.2.3. GLUT4 ekspresijas izmaiņas skeleta muskuļos un sirdī dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu STZ modeļi.

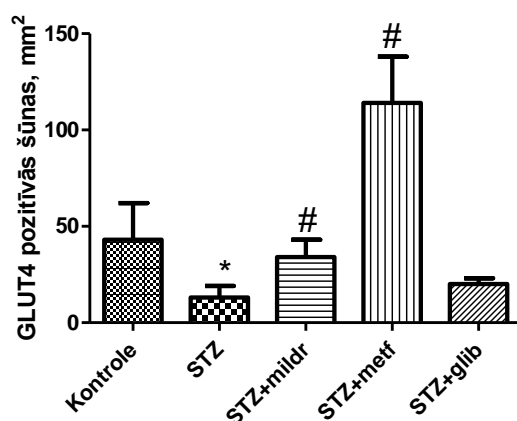
GLUT4 ekspresiju STZ modeļa dzīvniekiem pētījām tikai sirdī un šķērsvītrotajā muskulatūrā, kur, atbilstoši literatūras datiem, šis glikozes transportētājs ir ekspresēts. Ņemot vērā to, ka pētījumos par GLUT1 mildronātam un glibenklamīdam, kā arī mildronātam un metformīnam, nenovērojām aditīvo efektu, dzīvnieku grupās, kuri saņēma preparātu kombinācijas GLUT4 ekspresijas analīzi neveicām.

Analizējot ar *Kruskal-Wallis* testu, GLUT4 mRNS vidējā ekspresija skeleta muskuļos starp eksperimenta grupām atšķīrās statistiski ticami ($p < 0,05$). Atsevišķi salīdzinot grupas savā starpā, STZ modeļa dzīvniekiem novēroja palielinātu GLUT4 mRNS ekspresiju, kuru neietekmēja pielietotā terapija (RQ kontrolē: $0,70 \pm 0,24$, STZ: $20,17 \pm 10,11$; STZ+mildr: $21,82 \pm 7,29$; STZ+metf: $15,87 \pm 5,10$; STZ+glib: $18,98 \pm 6,95$; $p < 0,05$ pret kontroles grupu; *Mann-WhitneyU*-tests (sk. 3.31. att.).



3.31. att. GLUT4 mRNS ekspresija STZ žurku skeleta muskuļos pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*) vai glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Mann-Whitney U-tests*), # $p < 0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Mann-Whitney U-tests*). Vērtības tika izteiktas kā vidējais ± S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem

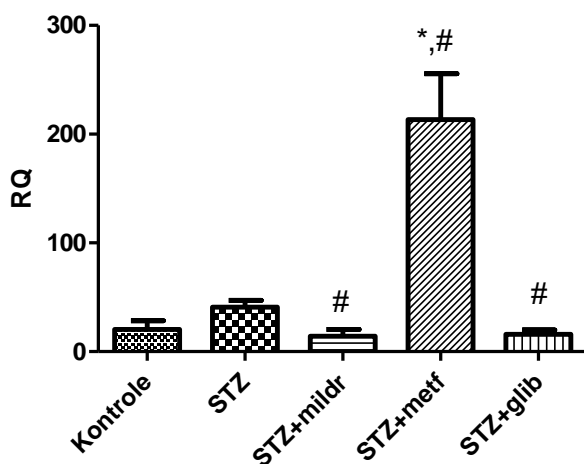
Analizējot ar vienvirziena ANOVA, GLUT4 proteīna ekspresijas vidējās vērtības starp grupām statistiski ticami atšķīrās,; $F(4,20)=7,68$, $p=0,0006$. Salīdzinot ar kontroli, GLUT4 proteīna ekspresija STZ grupā samazinājās (kontrolē: 43 ± 19 šūnas/ mm^2 vs STZ: 13 ± 6 šūnas/ mm^2 , $p < 0,05$), bet mildronāta un metformīna terapija to statistiski ticami palielināja (STZ+mildr: 34 ± 9 šūnas/ mm^2 , STZ+metf: 114 ± 24 šūnas/ mm^2 , $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu). Salīdzinot ar STZ grupu, glibenklamīds GLUT4 proteīna ekspresiju STZ dzīvniekiem neietekmēja (sk. 3.32. att.).



3.32. att. GLUT4 pozitīvo šūnu skaits STZ žurku skeleta muskuļos pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d, 6 nedēļas, *per os*), glibenklamīdu (2 mg/kg/d, 6 nedēļas). (* $p < 0,05$ pret kontroles grupu, # $p < 0,05$ pret STZ grupu. *Kruskal-Wallis* tests ar sekojošu *Dunn's* pēttestu). Vērtības tika izteiktas kā vidējais ± S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem.

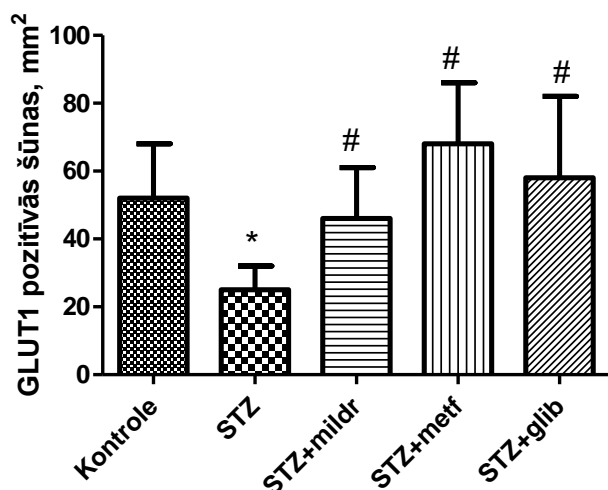
Starp grupām GLUT4 mRNS vidējā ekspresija sirdī statistiski ticami atšķīrās (analizēts ar vienvirziena ANOVA, $F(4,21)=25,37$; $p<0,0001$). STZ grupā GLUT4 mRNS ekspresijas izmaiņas, salīdzinot ar kontroli, nenovēroja. Tomēr, ārstējot diabētiskos dzīvniekus ar mildronātu un glibenklamīdu, GLUT4 mRNS ekspresija samazinājās (RQ STZ: $40,75\pm 6,37$; STZ+mildr: $14,04\pm 6,40$; STZ +glib: $15,95\pm 3,88$, $p<0,05$ salīdzinot ar STZ grupu, *Mann-WhitneyU*-tests).

Savukārt, ārstējot dzīvniekus ar metformīnu, GLUT4 mRNS ekspresija izteikti palielinājās (RQ STZ+metf: $213,5\pm 42,05$, $p<0,05$ salīdzinot ar STZ grupu) (sk. 3.33. att.).



3.33. att. GLUT4 mRNS ekspresija STZ žurku miokardā pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*) vai glibenklamīdu (2 mg/kg/d 6 nedēļas). * $p<0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Mann-WhitneyU*-tests), # $p<0,05$, salīdzinot ar HS grupu (*Mann-WhitneyU*-tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem

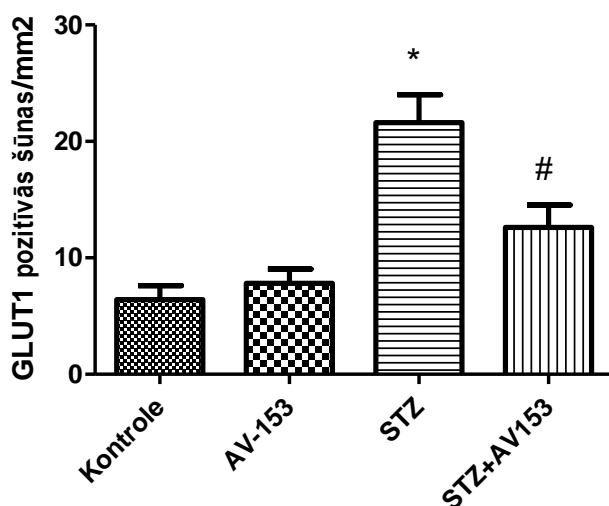
STZ dzīvniekiem novēroja samazinātu GLUT4 proteīna ekspresiju (kontrolē: 52 ± 16 šūnas/mm², STZ: 25 ± 7 šūnas/mm², $p<0,05$), bet pielietotā ārstēšana to atjaunoja (STZ+mildr: 46 ± 15 šūnas/mm², STZ+metf: 68 ± 18 šūnas/mm², STZ+glib: 58 ± 24 šūnas/mm², $p<0,05$ salīdzinot ar STZ grupu) (sk. 3.34. att.).



3.34. att. GLUT4 pozitīvo šūnu skaits STZ žurku miokardā pēc ārstēšanas ar mildronātu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*), metformīnu (100 mg/kg/d 6 nedēļas, *per os*) vai glibenklamīdu (2 mg/kg/d 6 nedēļas). (* $p < 0,05$ pret kontroles grupu, # $p < 0,05$ pret STZ grupu. *Kruskal-Wallis* tests ar sekojošu *Dunn's* pēttestu). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

3.2.4. 1,4 dihidropiridīnu ietekme uz GLUT1 ekspresijas izmaiņām nierēs dzīvniekiem ar eksperimentālo STZ diabētu

Mēs izpētījām GLUT1 ekspresijas izmaiņas STZ žurku nierēs arī 12 dienas pēc STZ ievadīšanas. Iegūtie rezultāti liecina, ka GLUT1 ekspresija diabētisko žurku nierēs pieaug jau agrīni, 12 dienas pēc STZ ievadīšanas, bet 1,4 DHP AV-153 šo pastiprināto ekspresiju samazina gandrīz līdz kontroles līmenim pēc trīs dienu ievadīšanas (0,5 mg/kg *per os*) (sk. 3.35. att.)



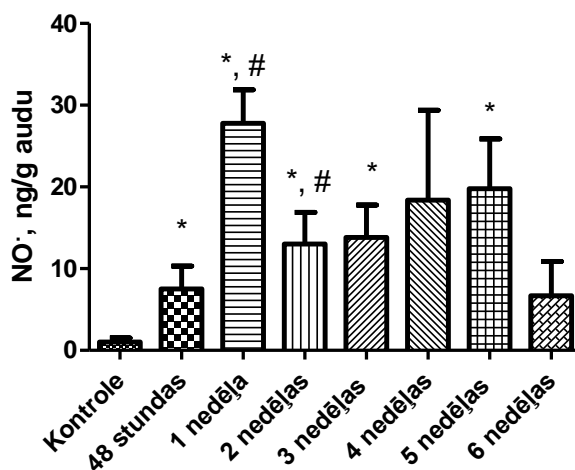
3.35.att. GLUT1 pozitīvo šūnu skaits STZ žurku nierēs pēc 1,4 DHP AV-153 (0,5 mg/kg/d 3 dienas, *per os*) ievadīšanas. * $p < 0,05$ pret kontroles grupu, # $p < 0,05$ pret STZ grupu. *Kruskal-Wallis* tests ar sekojošu *Dunn's* pēttestu. Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

3.3. Terapijas ietekme uz NO[•] veidošanās intensitāti audos dzīvniekiem ar eksperimentālo cukura diabētu

3.3.1. NO[•] veidošanās sešu nedēļu dinamika audos dzīvniekiem ar eksperimentālo STZ diabētu

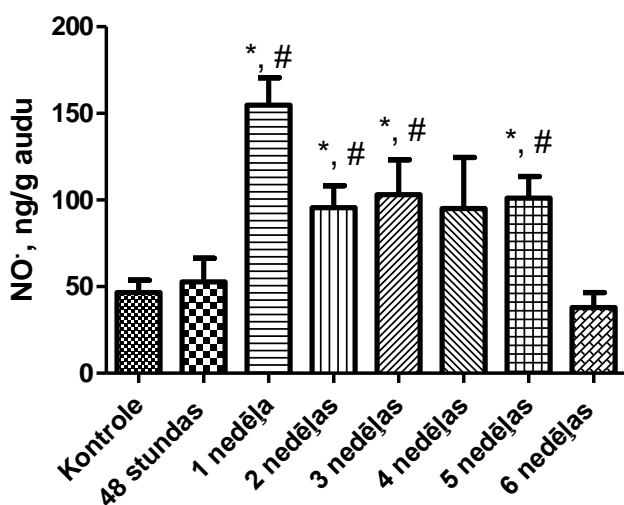
Lai novērtētu NO[•] produkcijas izmaiņas izteiktas hiperglikēmijas apstākļos, mēs noteicām NO[•] koncentrāciju dažādos STZ žurku audos pēc cukura diabēta ierosināšanas. Smadzeņu garozā un smadzenītēs NO[•] pieaugumu novēroja tikai vienu nedēļu pēc diabēta ierosināšanas (smadzeņu garoza - kontrole; 35,0±2,6 ng/g audu, STZ: 60,1±6,7 ng/g audu, p<0,05; smadzenītes - kontrole: 20,5±1,6 ng/g audu, STZ: 32,4±2,2 ng/g audu, p<0,05). Sākot ar otro nedēļu NO[•] koncentrācija normalizējās (nav parādīts).

Sākot ar vienu nedēļu pēc STZ ievadīšanas, dzīvnieku nierēs, aknās un skeleta muskuļos novēroja stabilu NO[•] pieaugumu (nierēs 48 st pēc STZ), kas turpinājās līdz pat piektajai, sestajai nedēļai pēc STZ ievadīšanas (3.36., 3.37., 3.37. att.). Diabētiskiem dzīvniekiem, izņemot ceturto un sesto nedēļu pēc STZ ievadīšanas, NO[•] koncentrācija nierēs bija statistiski ticami lielāka nekā kontroles grupā (p<0,05, nepāra *t*-tests) (kontrole: 1,0 ±0,5 ng/g, 48 st pēc STZ ievadīšanas: 7,5±2,8 ng/g, 1 nedēļu pēc STZ: 27,8±4,1 ng/g, 2 nedēļas pēc STZ: 13,0±3,9 ng/g, 3 nedēļas pēc STZ: 13,8±4,00 ng/g, 4 nedēļas pēc STZ: 18,4±11,00 ng/g, 5 nedēļas pēc STZ: 19,8 ±6,1 ng/g, 6 nedēļas pēc STZ: 6,7±4,2 ng/g) (3.36. att.).



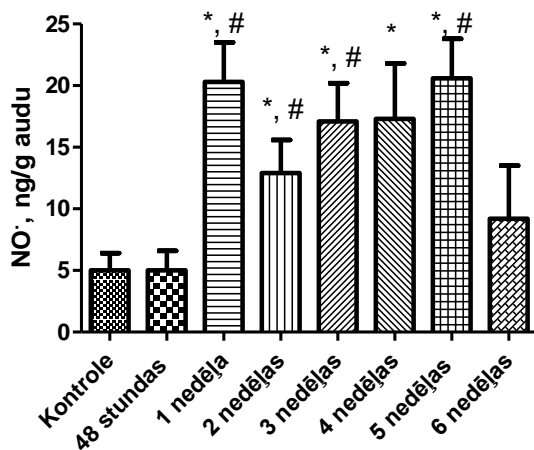
3.36. att. NO[•] koncentrācijas izmaiņas nierēs Wistar žurkām sešu nedēļu laikā pēc cukura diabēta ierosināšanas ar STZ. *p<0,05, salīdzinot ar kontroles grupu, (nepāra *t*-tests), #p<0,05, salīdzinot ar NO[•] līmeni 48 st pēc STZ ievadīšanas (nepāra *t*-tests). Ordinātu ass – slāpekļa oksīda koncentrācija audos. Abscisu ass – laiks pēc STZ injekcijas. Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Aknās NO[•] veidošanās statistiski ticamu pieaugumu novēroja, sākot ar pirmo nedēļu pēc STZ ievadīšanas, un tas saglabājās līdz piektajai nedēļai pēc STZ ievadīšanas ($p < 0,05$ pret kontroles grupu) kontrole: $46,6 \pm 7,2$ ng/g, 48 st pēc STZ ievadīšanas: $52,7 \pm 13,7$ ng/g, 1 nedēļa pēc STZ ievadīšanas: $154,7 \pm 15,8$ ng/g, 2 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $95,5 \pm 12,7$ ng/g, 3 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $103,1 \pm 20,1$ ng/g, 4 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $95,1 \pm 29,4$ ng/g, 5 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $101,8 \pm 12,9$ ng/g, 6 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $37,9 \pm 8,7$ ng/g (sk. 3.37. att.).



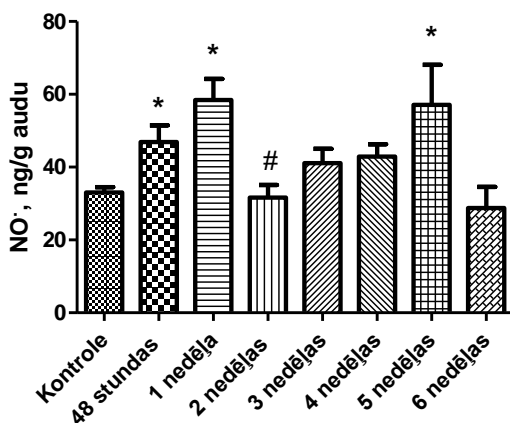
3.37. att. NO[•] koncentrācijas izmaiņas aknās Wistar žurkām sešu nedēļu laikā pēc cukura diabēta ierosināšanas ar STZ. * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (nepāra t -tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar NO[•] līmeni 48 st pēc STZ ievadīšanas (nepāra t -tests). Ordinātu ass – slāpekļa oksīda koncentrācija audos. Abscisu ass – laiks pēc STZ injekcijas. Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Skeleta muskuļos arī NO[•] veidošanās pieaugumu novēroja, sākot ar pirmo nedēļu pēc STZ ievadīšanas, un līdzīgi kā nierēs un aknās, statistiski ticami augstāka NO[•] produkcija muskuļos saglabājās līdz piektajai nedēļai pēc STZ ievadīšanas ($p < 0,05$ pret kontroles grupu), bet 6. nedēļā novēroja NO[•] koncentrācijas samazinājumu (kontrolē: $5,0 \pm 1,4$ ng/g; 48 st pēc STZ: ievadīšanas $5,0 \pm 1,6$ ng/g, 1 nedēļu pēc STZ ievadīšanas: $20,3 \pm 3,2$ ng/g, 2 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $12,9 \pm 2,7$ ng/g, 3 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $17,1 \pm 3,1$ ng/g, 4 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $17,3 \pm 4,5$, 5 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $20,6 \pm 3,2$ ng/g, 6 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: $9,2 \pm 4,3$ ng/g audu) (sk. 3.38. att.).



3.38. att. NO⁻ koncentrācijas izmaiņas skeleta muskuļos Wistar žurkām sešu nedēļu laikā pēc cukura diabēta ierosināšanas ar STZ. *p<0,05, salīdzinot ar kontroles grupu, (nepāra *t*-tests), #p<0,05, salīdzinot ar NO⁻ līmeni 48 st pēc STZ ievadīšanas (nepāra *t*-tests). Ordinātu ass – slāpekļa oksīda koncentrācija audos. Abscisu ass – laiks pēc STZ injekcijas. Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

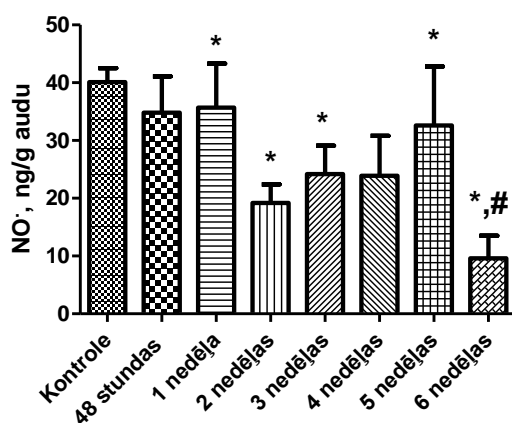
Salīdzinot ar kontroles grupu (NO⁻ kontrole: 33,0±1,5 ng/g), NO⁻ koncentrācija asinīs 48 stundas pēc STZ ievadīšanas strauji palielinājās (48 st. pēc STZ: 46,9±4,6 ng/g) un saglabājās paaugstināta vienu nedēļu (1 nedēļa pēc STZ ievadīšanas: 58,4±5,8 ng/g) (sk. 3.39.att.). NO⁻ koncentrācijas pieaugumu atkal novēroja piektajā nedēļā pēc STZ ievadīšanas (57,1±11,0 ng/g), bet pārējos mērījumu laikos NO⁻ produkcija asinīs bija līdzīga kontroles grupai (2 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 31,6±3,5 ng/g; 3 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 41,1±3,9 ng/g, 4 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 42,9±3,4, 6 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 28,8±5,8 ng/g).



3.39. att. NO⁻ koncentrācijas izmaiņas asinīs Wistar žurkām sešu nedēļu laikā pēc cukura diabēta ierosināšanas ar STZ. *p<0,05, salīdzinot ar kontroles grupu, (nepāra *t*-tests), #p<0,05,

salīdzinot ar NO[•] līmeni 48 st pēc STZ ievadīšanas (nepāra *t*-tests). Ordinātu ass – slāpekļa oksīda koncentrācija audos. Abscisu ass – laiks pēc STZ injekcijas. Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

Taukaudos pēc STZ ievadīšanas novēroja NO[•] produkcijas samazinājumu, kurš visizteiktākais kļuva 6 nedēļas pēc STZ ievadīšanas (sk. 3.40. att.), kontrole: 40,1±2,4 ng/g; 48 stundas pēc STZ ievadīšanas: 34,8±6,3 ng/g; 1 nedēļu pēc STZ ievadīšanas: 35,7±7,6 ng/g, 2 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 19,2±3,2ng/g; 3 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 24,2±4,9 ng/g, 4 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 23,9±6,9 ng/g, 5 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 32,6±10,2 ng/g, 6 nedēļas pēc STZ ievadīšanas: 9,6±3,9 ng/g.



3.40. att. NO[•] koncentrācijas izmaiņas taukaudos Wistar žurkām sešu nedēļu laikā pēc cukura diabēta ierosināšanas ar STZ. **p*<0,05, salīdzinot ar kontroles grupu, (nepāra *t*-tests), #*p*<0,05, salīdzinot ar NO[•] līmeni 48 st pēc STZ ievadīšanas (nepāra *t*-tests). Ordinātu ass – slāpekļa oksīda koncentrācija audos. Abscisu ass – laiks pēc STZ injekcijas. Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

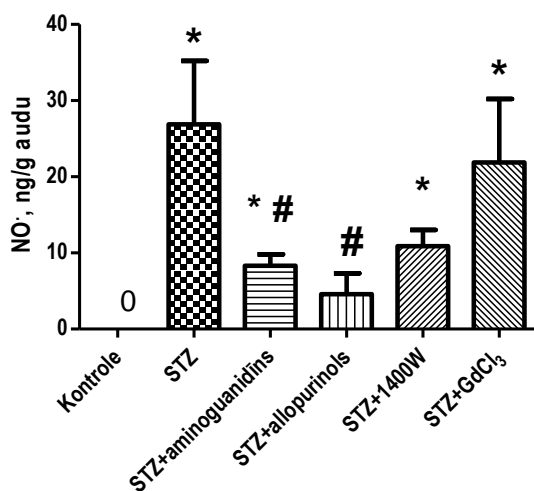
3.3.2. NO[•] biosintēzes inhibitoru ietekme uz NO[•] veidošanos audos žurkām ar eksperimentālo STZ diabētu

Lai izpētītu, kādi mehānismi ir atbildīgi par NO[•] produkcijas pieaugumu audos žurkām ar eksperimentālo STZ diabētu, deviņas dienas pēc STZ injekcijas mēs ievadījām diabētiskām žurkām dažādus NO[•] biosintēzes inhibitorus: neselektīvo NOS inhibitoru aminoguanidīnu (200 mg/kg *i.p.* 30 min pirms eitanāzijas), specifisko Kupfera šūnu inhibitoru gadolīnija hlorīdu (GdCl₃; 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas), selektīvo iNOS inhibitoru 1400W (6

mg/kg *i.p.* 1 stundu pirms eitanāzijas) un ksantīna oksidoreduktāzes inhibitoru allopurinolu (100 mg/kg *i.p.* 24 stundas pirms eitanāzijas).

STZ ievadīšana un NO[•] biosintēzes inhibitoru ievade neizraisīja būtiskas NO[•] produkcijas izmaiņas smadzenītēs un smadzeņu garozā, ko varētu izskaidrot ar hematoencefalītiskās barjeras darbību (nav parādīts). Tāpat pēc NO[•] sintēzes inhibitoru ievades NO[•] koncentrācija neizmainījās arī STZ žurku asinīs (nav parādīts).

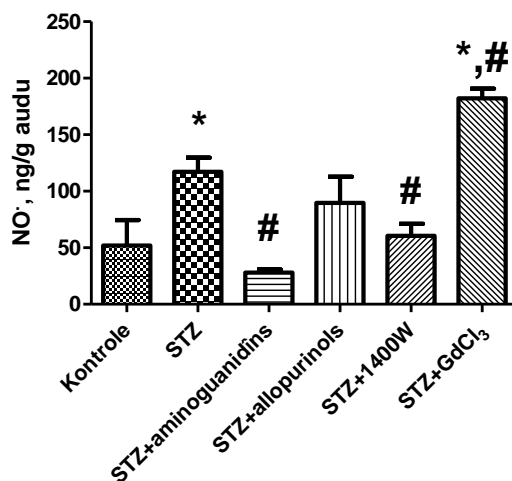
STZ žurku nierēs NO vidējā koncentrācija pēc NO sintēzes inhibitoru ievades, uzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp grupām, analizējot ar vienvirziena ANOVA, $F(5,54)=4,22$, $p=0,0026$. Kā jau aprakstīts iepriekš, salīdzinot ar kontroli, STZ grupā novēroja paaugstinātu NO[•] koncentrāciju (kontrolē $00,00\pm00,00$ ng/g; STZ $26,9\pm8,30$ ng/g; $p<0,05$, nepāra *t*-tests, *Newman-Keuls* tests). Nierēs NO[•] biosintēzes samazinājumu novērojām STZ+aminoguanidīna, STZ+allopurinola un STZ+1400W grupā (STZ: $26,9\pm8,30$ ng/g; STZ+aminoguanidīns: $8,30\pm1,50$ ng/g; STZ+allopurinols: $4,60\pm2,70$ ng/g; STZ+1400W $10,90\pm2,10$ ng/g, $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu, nepāra *t*-tests) (sk. 3.41. att.).



3.41. att. NO[•] koncentrācijas izmaiņas nierēs dzīvniekiem ar STZ cukura diabētu (9 dienas pēc STZ injekcijas) pēc NO biosintēzes inhibitoru ievadīšanas: (aminoguanidīns 200 mg/kg *i.p.* 30 min pirms eitanāzijas, allopurinols 100 mg/kg *i.p.* 24 stundas pirms eitanāzijas, GdCl₃ 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas, 1400W 6 mg/kg *i.p.* 1 stundu pirms eitanāzijas). * $p<0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (*Newman-Keuls* tests), # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (nepāra *t*-tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

STZ žurku aknās NO vidējā koncentrācija pēc NO sintēzes inhibitoru ievades, uzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp grupām, analizējot ar vienvirziena ANOVA,

($F(5,54)=13,30$, $p=0,0001$). Kā jau aprakstīts iepriekš, salīdzinot ar kontroli, STZ grupā NO[•] koncentrācija bija paaugstināta (kontrolē: $51,90\pm 22,50$ ng/g; STZ: $117,20\pm 12,40$ ng/g; $p<0,05$, Turkey's tests). Aknās NO[•] produkcijas samazinājumu novēroja STZ+aminoguanidīna un STZ+1400W grupā (STZ: $117,20\pm 12,40$ ng/g; STZ+aminoguanidīns: $28,00\pm 2,80$ ng/g; STZ+1400W: $60,60\pm 10,50$ ng/g; $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu, nepāra *t*-tests) (sk. 3.42. att.).

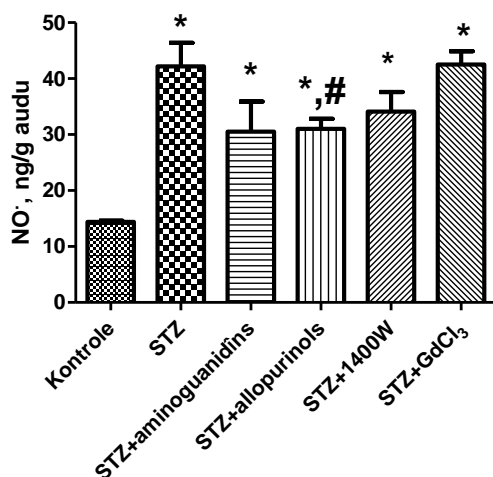


3.42. att. NO[•] koncentrācijas izmaiņas aknās dzīvniekiem ar STZ cukura diabētu (9 dienas pēc STZ injekcijas)pēc NO[•] biosintēzes inhibitoru ievadīšanas (aminoguanidīns 200 mg/kg *i.p.* 30 min pirms eitanāzijas, allopurinols 100 mg/kg *i.p.* 24 stundas pirms eitanāzijas, GdCl₃ 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas, 1400W 6 mg/kg *i.p.* 1 stundu pirms eitanāzijas). * $p<0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu (*Tukey* tests), # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (nepāra *t*- tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

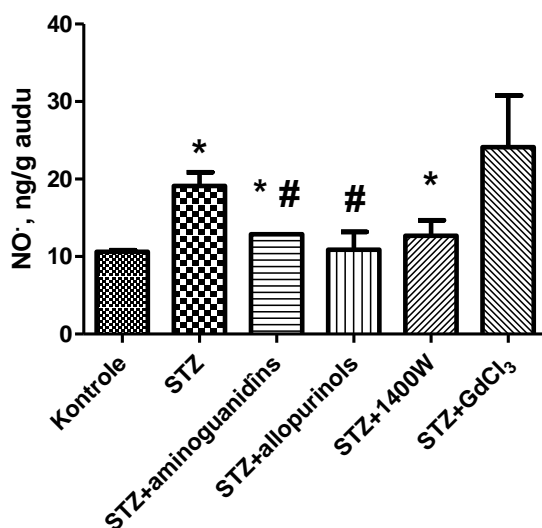
STZ žurku aortas sienā NO vidējā koncentrācija pēc NO sintēzes inhibitoru ievades, uzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp grupām, analizējot ar vienvirziena ANOVA, $F(5,54)=9,35$, $p<0,0001$. STZ grupā aortas sienā novēroja paaugstinātu NO[•] koncentrāciju salīdzinot ar kontroli (kontrolē: $14,40\pm 00,20$ ng/g; STZ: $42,20\pm 4,20$ ng/g; $p<0,05$, *Tukey* tests). Aortas sienā NO[•] produkcijas samazinājumu reģistrējām STZ+allopurinola grupā (STZ: $42,20\pm 4,20$ ng/g; STZ+allopurinols: $31,00\pm 1,80$ ng/g; $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu, nepāra *t*-tests) (sk. 3.43. att.).

STZ žurku skeleta muskuļos NO vidējā koncentrācija pēc NO sintēzes inhibitoru ievades, uzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp grupām, analizējot ar vienvirziena ANOVA, $F(5,54)=3,038$, $p=0,017$. Salīdzinot ar kontroli, STZ grupā dzīvnieku muskuļos

novērojām paaugstinātu NO koncentrāciju (kontrolē: $10,60 \pm 0,20$ ng/g; STZ: $19,10 \pm 1,80$ ng/g; $p < 0,05$, nepāra *t*-tests). Muskuļos NO koncentrācijas samazinājumu reģistrējām STZ+aminoguanidīna un STZ+allopunola grupā (STZ: $19,10 \pm 1,80$ ng/g; STZ+aminoguanidīns: $12,9 \pm 0,00$; STZ+allopurinols: $10,90 \pm 2,30$ ng/g; $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu, nepāra *t*-tests) (3.44. att.).



3.43. att. NO koncentrācijas izmaiņas aortā dzīvniekiem ar STZ cukura diabētu (9 dienas pēc STZ injekcijas) pēc NO biosintēzes inhibitoru ievadīšanas (aminoguanidīns 200 mg/kg *i.p.* 30 min pirms eitanāzijas, allopurinols 100 mg/kg *i.p.* 24 stundas pirms eitanāzijas, GdCl₃ 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas, 1400W 6 mg/kg *i.p.* 1 stundu pirms eitanāzijas). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (Tukey tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (nepāra *t* tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais ± S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

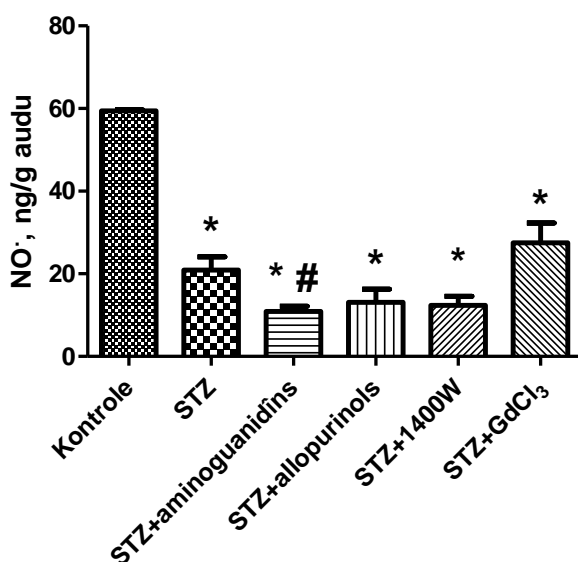


3.44. att. NO koncentrācijas izmaiņas muskuļos dzīvniekiem ar STZ cukura diabētu (9 dienas pēc STZ injekcijas) pēc NO biosintēzes inhibitoru ievadīšanas (aminoguanidīns 200 mg/kg *i.p.* 30 min pirms eitanāzijas, allopurinols 100 mg/kg/d *i.p.* 24 stundas pirms eitanāzijas,

GdCl₃ 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas, 1400W 6 mg/kg i.p. 1 stundu pirms eitanāzijas).

* $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (nepāra t tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (nepāra t tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

STZ žurku taukaudos NO vidējā koncentrācija pēc NO sintēzes inhibitoru ievades, uzrādīja statistiski ticamas atšķirības starp grupām, analizējot ar vienvirziena ANOVA, $F(5,54)=40,69$, $p < 0,0001$. Salīdzinot ar kontroli, STZ grupā dzīvnieku taukaudos novērojām pazeminātu NO koncentrāciju (kontrolē: $59,40 \pm 0,30$ ng/g; STZ: $20,90 \pm 3,20$ ng/g; $p < 0,05$, nepāra t -tests). Taukaudos NO produkcijas samazinājumu, salīdzinot ar STZ grupu, novēroja STZ+aminoguanidīna grupā (STZ: $20,90 \pm 3,20$ ng/g; STZ+aminoguanidīns: $10,9 \pm 1,30$; $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu, nepāra t -tests) (sk. 3.45. att.).



3.45. att. NO koncentrācijas izmaiņas taukaudos dzīvniekiem ar STZ cukura diabētu (9 dienas pēc STZ injekcijas) pēc NO biosintēzes inhibitoru ievadīšanas (aminoguanidīns 200 mg/kg i.p. 30 min pirms eitanāzijas, allopurinols 100 mg/kg i.p. 24 stundas pirms eitanāzijas, GdCl₃ 10 mg/kg 24 stundas pirms eitanāzijas, 1400W 6 mg/kg i.p. 1 stundu pirms eitanāzijas). * $p < 0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, (nepāra t -tests), # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu (nepāra t tests). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem

NO biosintēzes inhibitoru 1400W un allopurinola ietekmē vairākos diabētisko dzīvnieku orgānos mēs novērojām NO koncentrācijas samazinājuma tendenci, tomēr ne vienmēr atšķirības bija statistiski ticamas. Iegūtie rezultāti liecina, ka NO produkcijas

pieaugumā diabētisko dzīvnieku audos, iespējams, ir iesaistītas vairākas NOS izoformas, kā arī var realizēties NOS-neatkarīga NO[•] sintēze.

3.3.3. Dihidropiridīnu grupas preparātu cerebrokrasta, etaftorona un fenoflorona ietekme uz NO[•] biosintēzes procesu STZ diabētisko dzīvnieku nierēs

Ir iegūti dati par dihidropiridīnu grupas preparātu spēju samazināt glikozes līmeni diabētiskiem dzīvniekiem un samazināt DNS bojājuma pakāpi. Tomēr līdz šim nebija informācijas par dihidropiridīnu grupas preparātu cerebrokrasta, etaftorona un fenoflorona ietekmi uz NO[•] biosintēzes efektivitāti STZ diabētisko žurku orgānos.

Ārstējot dzīvniekus no 9 līdz 12 dienai pēc STZ ievadīšanas ar dihidropiridīnu grupas preparātiem etaftoronu (0,5 mg/kg *per os*, 3 dienas), NO[•] koncentrāciju izdevās samazināt asinīs, aknās, nierēs, muskuļaudos un taukaudos (sk. 3.46. att.).

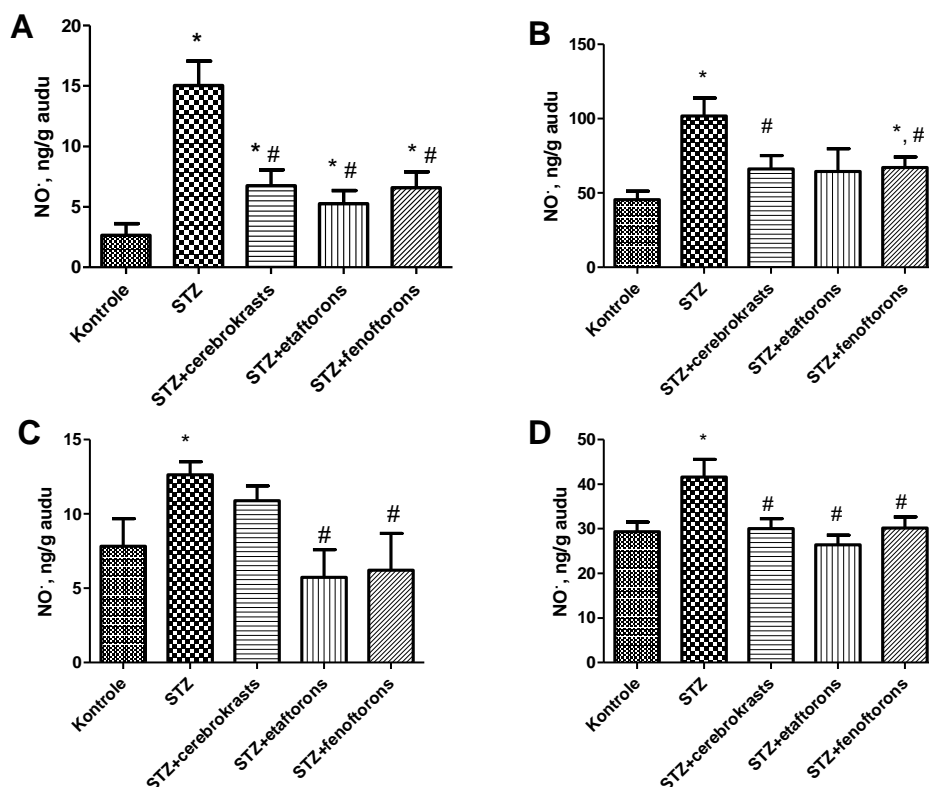
Analizējot ar vienvirziena ANOVA, NO[•] koncentrācija asinīs pētāmo grupu dzīvniekiem statistiski ticami atšķīrās ($F(7,67)=4,63$, $p=0,0003$). STZ grupā novēroja palielinātu NO[•] koncentrāciju ($p<0,05$ salīdzinot ar kontroli), kura statistiski ticami samazinājās, 3 dienas ārstējot STZ modeļa žurkas ar cerebrokrastu, etaftoronu vai fenofloronu (STZ: $41,62\pm 3,93$ ng/g, STZ+cerebrokrasts: $30,01\pm 2,27$ ng/g, STZ+etaftorons: $26,44\pm 2,15$ ng/g; STZ+fenoflorons: $30,13\pm 5,51$ ng/g, $p<0,05$ salīdzinot ar STZ grupu, nepāra *t*-tests) (sk. 3.46 D attēlu).

Aknās NO[•] produkcija statistiski ticami atšķīrās starp pētāmām grupām, kā uzrādīja izmantojot vienvirziena ANOVA, $F(6,67)=5,34$, $p<0,0001$). STZ diabēts izraisīja NO[•] koncentrācijas pieaugumu no $45,39 \pm 5,93$ ng/g kontroles dzīvniekiem līdz $101,81\pm 12,12$ ng/g STZ modeļa dzīvniekiem $p<0,05$ (*Newman-Keuls* tests). Ārstēšana ar cerebrokrastu un fenofloronu statistiski ticami pazemināja palielināto NO[•] koncentrāciju STZ modeļa žurku aknās (STZ: $101,81\pm 12,12$ ng/g, STZ+cerebrokrasts: $66,20\pm 9,03$ ng/g; STZ+fenoflorons: $67,23\pm 6,98$; $p<0,05$ salīdzinot ar STZ grupu, nepāra *t*-tests) (sk. 3.46 B attēlu).

Nierēs, analizējot ar vienvirziena ANOVA, NO[•] vidējās koncentrācijas atšķirības starp grupām bija statistiski ticamas ($F(6,67)=13,07$, $p<0,0001$). Visi trīs pielietotie 1,4-DHP grupas preparāti statistiski ticami samazināja izteikti paaugstināto NO[•] koncentrāciju STZ modeļa žurku nierēs (STZ: $15,04\pm 2,04$ ng/g; STZ+cerebrokrasts: $6,74\pm 1,32$ ng/g, STZ+etaftorons: $5,25\pm 1,09$ ng/g, STZ+fenoflorons: $6,60\pm 1,30$ ng/g, $p<0,05$, *Newman-Keuls* tests), (sk. 3.46 A att.).

Skeleta muskuļos, analizējot ar vienvirziena ANOVA, atšķirības starp NO[•] vidējo koncentrāciju grupās bija statistiski ticamas ($F(7,67)=5,012$, $p=0,0001$). STZ modeļa dzīvniekiem NO[•] produkcija muskuļos bija izteikti palielināta, un to statistiski ticami samazināja etaftorona un fenoflorona ievadīšana (STZ: $12,65\pm 0,87$ ng/g, STZ+etaftorons: $5,74\pm 1,86$ ng/g, STZ+fenoflorons: $6,22\pm 2,46$ ng/g, $p<0,05$ salīdzinot ar STZ grupu, *Newman-Keuls* tests), (sk. 3.46 C attēlu).

NO[•] koncentrācija smadzeņu garozā un smadzenītēs dihidropiridīnu ietekmē nemainījās (nav parādīts).



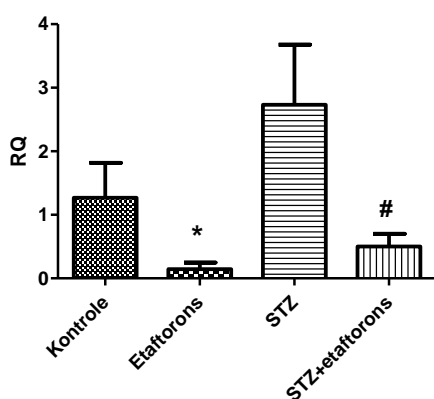
3.46. att. NO[•] koncentrācijas izmaiņas nierēs (A), aknās (B), muskuļos (C) un asinīs (D) dzīvniekiem ar STZ cukura diabētu pēc dihidropiridīnu grupas preparātu cerebrokrasta (0,5 mg/kg/d 3 dienas *p.o.*), etaftorona (0,5 mg/kg/d 3 dienas *p.o.*) un fenoflorona (0,5 mg/kg/d 3 dienas *p.o.*) ievadīšanas no 9 līdz 12 dienai pēc STZ injekcijas. STZ – diabētiskās žurkas; STZ+cerebrokrasts – diabētiskās žurkas, kuras saņēma cerebrokrastu, STZ+fenoflorons - diabētiskās žurkas, kuras saņēma fenofloronu, STZ+etaftorons - diabētiskās žurkas, kuras saņēma etaftoronu. * $p<0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu. Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 8-15 dzīvniekiem. Grupu salīdzināšanā tika izmantota vienvirziena ANOVA ar sekojošu nepāra *t*-testu vai *Newman-Keuls* testu

Analizējot NO[•] produkcijas izmaiņas grupās ar vienvirziena ANOVA, taukaudos novēroja statistiski ticamu atšķirību, $F(7,67)=13,64$, $p<0,0001$. STZ modeļa dzīvniekiem NO[•] daudzums taukaudos statistiski ticami samazinājās (kontrolē 34,00±3,68 ng/g, STZ 18,56±1,81 ng/g, $p<0,05$, *Newman-Keuls* tests). STZ modeļa dzīvnieku ārstēšana ar 1,4-DHP grupas preparātiem vēl vairāk samazināja NO[•] līmeni taukaudos (STZ+cerebrokrasts: 9,33±0,96 ng/g, STZ+etaftorons: 7,74±1,37 ng/g, STZ+fenoftorons: 9,82±1,90 ng/g, $p<0,05$ nepāra *t*-tests) (nav parādīts). Tādējādi mēs konstatējam, ka 1,4-DHP klases preparāti spēj samazināt NO[•] produkcijas pieaugumu dažādos audos dzīvniekiem ar STZ diabēta modeli.

3.3.4. iNOS, eNOS un ksantīna oksidoreduktāzes (XOR) mRNS un proteīnu ekspresija STZ cukura diabēta un etaftorona terapijas ietekmē

Ņemot vērā mūsu interesi par diabētisko komplikāciju patoģenēzi, NO[•] pastiprinātās produkcijas mehānismus pie cukura diabēta nolēmām dziļāk pētīt nierēs, nosakot NOS izoformu un ksantīna oksidoreduktāzes ekspresijas izmaiņas. Tā kā etaftoronam no visiem izmantotajiem dihidropiridīnu grupas preparātiem NO[•] koncentrāciju samazinošais efekts bija visizteiktākais, tad NO[•] veidošanās mehānismu pētīšanai izmantojām šo savienojumu.

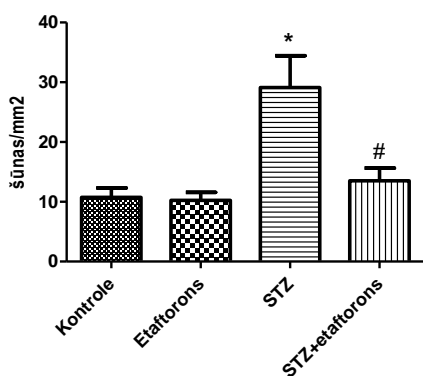
Analizējot iNOS mRNS ekspresijas datus nierēs, konstatējam, ka starp grupu rādītājiem bija statistiski ticama atšķirība (*Kruskal–Wallis tests*, $p=0,0019$). Etaftorona grupā (RQ 0,14±0,10) iNOS mRNS ekspresija bija zemāka, nekā kontroles grupā (RQ 1,27±0,55), $p=0,0317$, *Mann-Whitney U*-tests. STZ grupā (RQ 2,73±0,94) iNOS mRNS ekspresija bija augstāka, nekā kontroles grupā, bet atšķirība nebija statistiski ticama. STZ+etaftorona grupā (RQ 0,50±0,20) iNOS mRNS ekspresija statistiski ticami samazinājās salīdzinot ar STZ grupu ($p=0,0035$, *Dunn's* pēctests), sk. 3.47. attēlu.



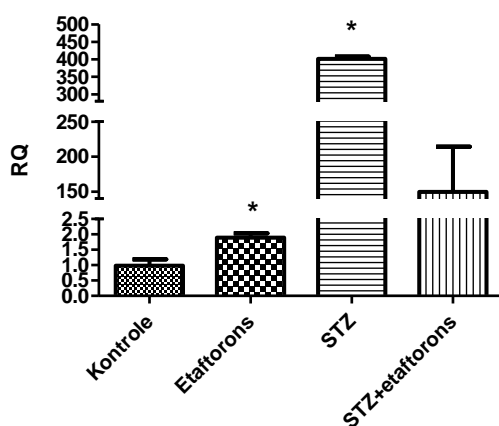
3.47. att. iNOS mRNS ekspresija STZ žurku nierēs pēc etaftorona (0,5 mg/kg, 3 dienas *per os*) ievadīšanas no 9 līdz 12 dienai pēc STZ injekcijas. * $p<0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar

kontroles grupu, # $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar STZ grupu. *Kruskal –Wallis* tests ar sekojošu *Dunn's* pēctestu un *Mann-Whitney U*-testu. Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem.

Analizējot ar vienvirziena ANOVA, iNOS proteīna ekspresijas atšķirības grupās bija statistiski ticamas ($F(3,28)=8,56$, $p=0,0003$). Iegūtie rezultāti liecina, ka iNOS ekspresija STZ diabētiskām žurkām pieaug statistiski ticami proteīna līmenī (kontrolē: $10,75 \pm 1,57$ šūnas/ mm^2 , STZ: $29,13 \pm 5,33$ šūnas/ mm^2 , $p < 0,05$, *Tukey* tests), bet ārstēšana ar etaftoronu to samazina (STZ+etaftorons: $13,50 \pm 2,14$ šūnas/ mm^2 , $p < 0,05$ salīdzinot ar STZ grupu, *Tukey* tests) (sk. 3.48. att.).



3.48. att. iNOS proteīna ekspresija STZ žurku nierēs pēc etaftorona (0,5 mg/kg, 3 dienas *per os*) ievadīšanas no 9 līdz 12 dienai pēc STZ injekcijas. * $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar STZ grupu. Vienvirziena ANOVA ar sekojošu *Tukey* pēctestu. Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem



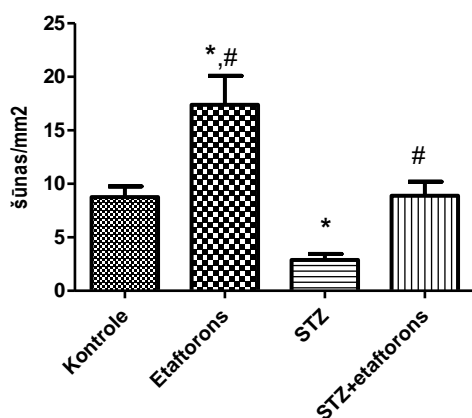
3.49. att. eNOS mRNS ekspresija STZ žurku nierēs pēc etaftorona (0,5 mg/kg, 3 dienas *per os*) ievadīšanas no 9 līdz 12 dienai pēc STZ injekcijas. * $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles

grupu, # $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar STZ grupu. Vienvirziena ANOVA ar sekojošu *Tukey* pēctestu. Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 7-9 dzīvniekiem.

Analizējot eNOS mRNS ekspresijas datus nierēs ar vienvirziena ANOVA, konstatējām, ka starp grupu rādītājiem bija statistiski ticama atšķirība ($F(3,13)=6,73$, $p=0,0056$). Etaftorona grupā (RQ $1,89\pm 0,14$) eNOS mRNS ekspresija bija augstāka nekā kontroles grupā (RQ $0,99\pm 0,20$), $p < 0,05$, *Tukey* tests). STZ grupā (RQ $401,50\pm 6,30$) eNOS mRNS ekspresija bija augstāka nekā kontroles grupā ($p < 0,05$, *Tukey* tests). STZ+etaftorona grupā (RQ $149,50\pm 64,94$) eNOS mRNS ekspresija neatšķīrās no citu grupu rādītājiem (sk. 3.49. att.).

Proteīna līmenī eNOS ekspresija izpētes grupās bija atšķirīga (vienvirziena ANOVA, $F(3,28)=13,59$, $p < 0,0001$). Tā palielinājās etaftorona grupā (kontrolē: $8,75\pm 1,013$; etaftorons: $17,38\pm 2,719$, $p < 0,05$, *Tukey* tests), bet STZ grupā - samazinājās ($2,88\pm 0,58$ šūnas/mm², $p < 0,05$ salīdzinot pret kontroles grupu, *Tukey* tests).

Ārstējot STZ žurkas ar etaftoronu, eNOS ekspresija proteīna līmenī tika atjaunota līdz kontroles rādītājiem (STZ: $2,88\pm 0,58$ šūnas/mm², STZ+etaftorons: $8,88\pm 1,32$ šūnas/mm², $p < 0,05$, *Neuman-Keuls* tests), (sk. 3.50. att.)

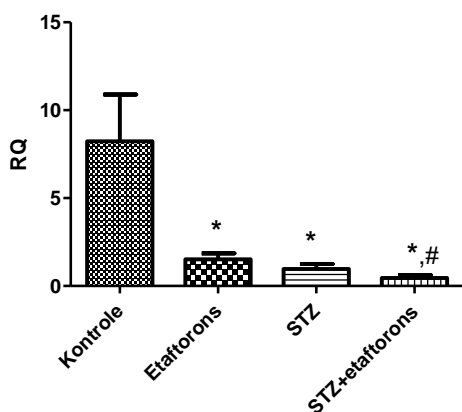


3.50. att. eNOS proteīna ekspresija STZ žurku nierēs pēc etaftorona (0,5 mg/kg, 3 dienas *per os*) ievadīšanas no 9 līdz 12 dienai pēc STZ injekcijas. (* $p < 0,05$ statistiski ticami, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p < 0,05$, salīdzinot ar STZ grupu. Vienvirziena ANOVA ar sekojošu *Tukey* pēctestu un *Newman-Keuls* testu). Vērtības tika izteiktas kā vidējais \pm S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

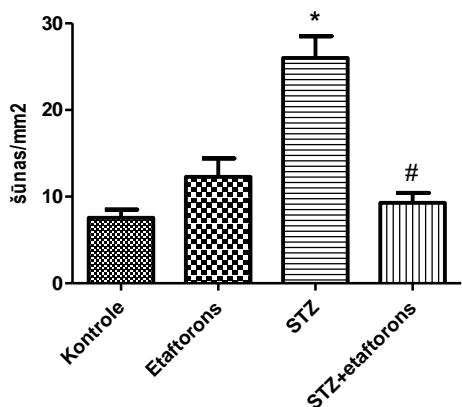
Ksantīna oksidoreduktāzes (XOR) mRNS ekspresijas līmenis izpētes grupās bija atšķirīgs (vienvirziena ANOVA $F(3,33)=8,97$, $p=0,0002$; *Kruskal-Wallis* tests, $p=0,0004$). XOR mRNS līmenis etaftorona, STZ, un STZ+etaftorona grupās samazinājās (kontrolē: RQ $8,23\pm 2,67$, etaftorons: RQ $1,53\pm 0,33$, STZ: $0,97\pm 0,29$, STZ+etaftorons: $0,45\pm 0,17$; $p < 0,05$

pret kontroles grupu, *Tukey tests*) (sk. 3.51. att.). STZ+etaftorona grupā XOR mRNS ekspresija bija mazāka nekā STZ grupā ($p=0,0407$, *Mann-Whitney U tests*), (sk. 3.51. att.)

Salīdzinot XOR proteīna ekspresijas vidējos rādītājus grupās ar vienvirziena ANOVA, konstatējām statistiski ticamu atšķirību ($F(3,24)=21,39$, $p<0,0001$). STZ grupā pieauga XOR proteīna līmenis (kontrolē: $7,57\pm 0,95$ šūnas/mm², STZ: $26,00\pm 2,52$ šūnas/mm², $p<0,05$; *Tukey tests*). Etaftorona terapijas ietekmē palielinātā XOR proteīna ekspresija STZ modeļa dzīvniekiem atkal samazinājās (STZ: $26,00\pm 2,52$ šūnas/mm², STZ+etaftorons: $9,29\pm 1,15$ šūnas/mm², $p<0,05$, *Tukey tests* (3.52. att.).



3.51. att. XOR mRNS ekspresija STZ žurku nierēs pēc etaftorona ievadīšanas (0,5 mg/kg, 3 dienas *per os*) no 9 līdz 12 dienai pēc STZ injekcijas. * $p<0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu. Vienvirziena ANOVA ar sekojošu *Tukey* pēttestu un *Mann-Whitney U*-testu.



3.52. att. XOR proteīna ekspresija STZ žurku nierēs pēc ārstēšanas ar etaftoronu (0,5 mg/kg, 3 dienas *per os*) no 9 līdz 12 dienai pēc STZ injekcijas. * $p<0,05$, salīdzinot ar kontroles grupu, # $p<0,05$, salīdzinot ar STZ grupu. Vienvirziena ANOVA ar sekojošu *Tukey* pēttestu. Vērtības tika izteiktas kā vidējais±S.E.M. no 5-7 dzīvniekiem

Tādējādi STZ diabēta ietekmē izmainās iNOS, eNOS un XOR ekspresija nierēs. Etaftorona terapija spēj to atjaunot proteīna līmenī.

3.4. NO un to metabolītu biosintēze 2. tipa cukura diabēta slimniekiem

3.4.1. Pētījumā iesaistīto personu raksturojums

Pētījumā piedalījās 42 personas (26 pacienti ar 2. tipa cukura diabētu un 16 kontroles grupas pacienti). Pētījuma un kontroles grupas neatšķīrās pēc dzimuma īpatsvara, vecuma, ķermeņa masas indeksa (KMI), arteriālā spiediena, pielietotās kardiovaskulārā profila un hipolipidemizējošās terapijas, kā arī pacientu īpatsvara, kuri smēķē vai ir koronārās sirds slimības (KSS) slimnieki. Kontroles grupā vairāk bija pacientu ar diagnozi „Neprecizēta radiācijas ietekme” (kontroles grupā – 46,7%; gadījumu grupā - 4%; p=0,002), bet pētījuma grupā – pacientu ar diagnozi „Primāra arteriāla hipertensija” (kontroles grupā – 37,5%; gadījumu grupā – 80%; p=0,009). Ņemot vērā cukura diabēta diagnozi pētījuma grupas pacientiem, grupas atšķīrās arī pēc vidējā mikroalbuminūrijas, HbA1c% , C-peptīda līmeņa un GFĀ (sk. 3.1. tabulu). Pētījuma grupā 65% pacientu bija ar diabēta stāžu <10 gadu, bet 35% - ar stāžu >10 gadu. Analizējot diabētisko komplikāciju biežumu pētījuma grupā, 30% pacientu bija konstatēta diabētiskā retinopātija, 48% – diabētiskā polineuropātija, 35% – diabētiskā nefropātija. Diabēta terapija grupā bija šāda: 28% lietoja perorālos antidiabētiskos līdzekļus, 36% – tikai insulīna terapiju, 32% – kombinēto terapiju (tabletes+insulīns).

3.1. tabula. Pētījuma un kontroles grupu personu raksturojums

Vid±SD	Kontroles grupa (N=16)	Pētījuma grupa (N=26)	p vērtība (t-tests)
Vīrieši	50%	50%	$\chi^2=1,000$
Sievietes	50%	50%	$\chi^2=1,000$
Vecums, gadi	53,56±12,19	54,00±15,4	0,924
BMI, kg/m ²	26,19±5,64	30,63±6,56	0,052
STA, mmHg	142,19±37,77	138,96±11,42	0,695
DTA, mmHg	89,38±25,29	84,38±7,12	0,363
C-peptīds, ng/ml	2,48±1,37	1,59±1,12	0,036*
HbA1C,%	5,53±0,40	9,59±1,88	<0,001*
GFĀ, ml/min ¹	86,71±18,83	122,67±33,88	0,002*
KH, mmol/l	5,89±0,80	5,46±1,16	0,229
ZBL, mmol/l	3,73±0,85	3,32±0,918	0,214
ABL, mmol/l	1,85±1,60	1,36±0,49	0,183
Triglicerīdi, mmol/l	1,48±0,68	2,08±1,79	0,257
Mikroalbuminūrija, mg/24st	6,24±7,07	61,09±102,64	0,024*

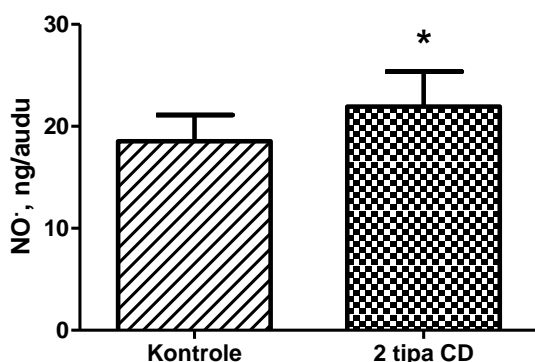
Dati atspoguļoti kā vidējais±SD; *p<0,05; ¹- pēc Kokrofta Golta formulas. BMI – ķermeņa masas indekss; STA – sistoliskais arteriālais spiediens; DTA – diastoliskais arteriālais spiediens;

mmHg – milimetri dzīvsudraba staba; GFĀ – glomerulārās filtrācijas ātrums; KH – kopējais holesterīns; ZBL – zema blīvuma holesterīns; ABL – augsta blīvuma holesterīns; HbA1c% - glikolizētā hemoglobīna procents

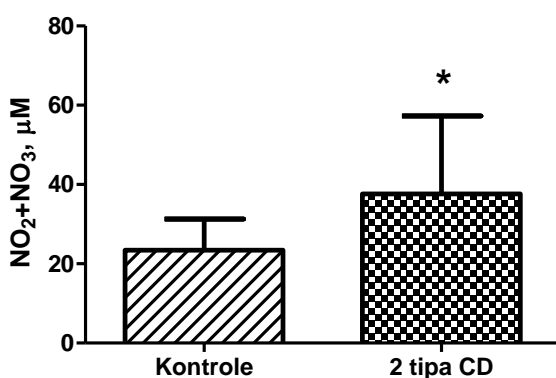
3.4.2. NO[•] un tā stabilo metabolītu NO₂⁻ un NO₃⁻ līmenis kontroles un pētījuma grupās

Viens no darba mērķiem bija noteikt, vai pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu NO[•] un tā stabilo metabolītu produkcija atšķiras no šiem rādītājiem kontroles grupā.

Vidējā NO[•] un NO₂⁻/NO₃⁻ produkcija asinīs pacientiem pētījuma grupā bija augstāka, nekā kontroles grupā (p<0,01) (sk.3.53.att.un 3.54. att).

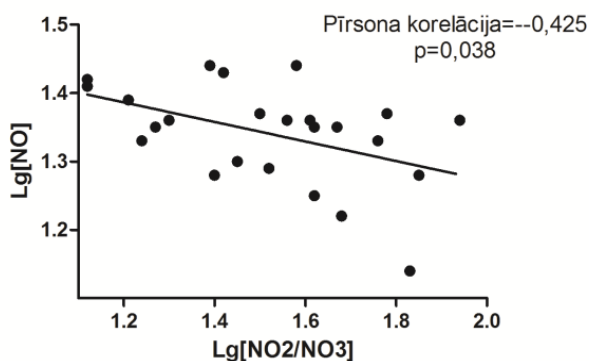


3.53. att. NO[•] produkcija kontroles un pētījuma grupas pacientiem. Abscisa – pacientu grupas, ordināta – NO[•] produkcija, ng/g audu. Svītrainais stabiņš – kontroles grupa (N=16), rūtainais stabiņš – pētījuma grupa (N=26). *p=0,002.



3.54. att. NO₂⁻/NO₃⁻ koncentrācija kontroles un pētījuma grupas pacientiem. Abscisa – pacientu grupas, ordināta – NO₂⁻+NO₃⁻ produkcija, µM. Strīpainais stabiņš – kontroles grupa (N=16), rūtainais stabiņš – pētījuma grupa (N=26). *p=0,003.

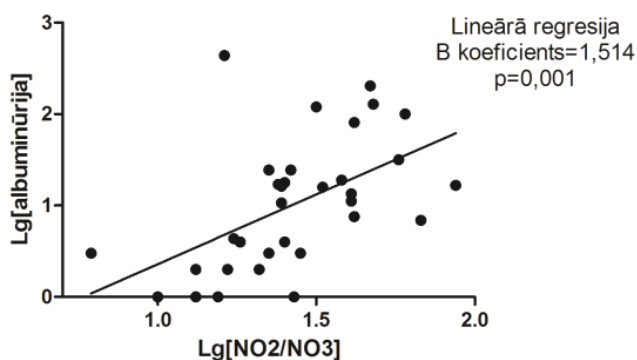
Analizējot korelāciju starp NO^{\cdot} un $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ pētījuma un kontroles grupā, konstatējām, ka kontroles grupā šie divi rādītāji ir tiešā atkarībā viens no otra, taču tas nebija statistiski ticami. Pētījuma grupā NO^{\cdot} un $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ korelācija bija apgriezti proporcionāla, $p=0,038$. (sk. 3.55. att.)



3.55. att. NO^{\cdot} un $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ koncentrāciju korelācija pētījuma grupas pacientiem.

Abscisa – $\lg[\text{NO}^{\cdot}]$, ordināta – $\lg[\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-]$. Pīrsona korelācija - 0,425; $p=0,038$, $N=26$

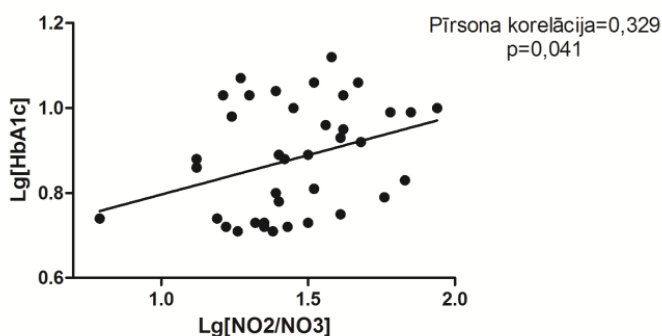
Lai iegūtu datus par iespējamo NO^{\cdot} un $\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-$ lomu cukura diabēta patoģenēzē, pētījām to asociāciju ar mikroalbuminūrijas pakāpi, HbA1c%, GFĀ, cukura diabēta komplikācijām, diabēta stāžu, diabēta terapiju. Lai izslēgtu citu faktoru ietekmi uz NO^{\cdot} un $\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-$, pārbaudījām arī iespējamās korelācijas starp NO^{\cdot} un $\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-$ un arteriālo hipertensiju, kardiovaskulārā profila terapiju, smēķēšanu, NRI, lipīdu profilu.



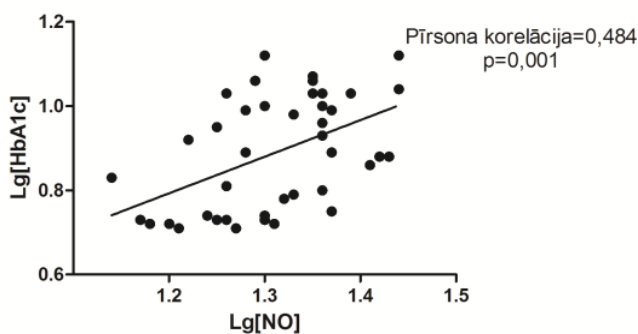
3.56. att. $\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-$ koncentrācijas korelācija ar mikroalbuminūriju kontroles un pētījuma grupas pacientiem. Abscisa – $\lg[\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-]$, ordināta – $\lg[\text{mikroalbuminūrija}]$. Lineārās regresijas B koeficients= 1,514; $p=0,001$, $N=34$

Analizējot $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ koncentrācijas korelāciju ar mikroalbuminūrijas kvantitatīvo rādītāju, konstatējām, ka $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ koncentrācijas pieaugums varētu izraisīt mikroalbuminūrijas pieaugumu (Lineārās regresijas B koeficients=1.514, $p=0,001$) (3.56. att.). NO^+ koncentrācijas korelāciju ar mikroalbuminūriju nenovēroja.

HbA1c% statistiski ticami korelēja gan ar NO^+ (Pīrsona korelācija 0,484, $p=0,001$) (3.58. att.), gan ar $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (Pīrsona korelācija 0,329, $p=0,041$) (sk. 3.57. att.).



3.57. att. $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ koncentrācijas korelācija ar HbA1c% kontroles un pētījuma grupas pacientiem. Abscisa – $\lg[\text{NO}_2^-+\text{NO}_3^-]$, ordināta – $\text{Lg}[\text{HbA1c}\%]$. Pīrsona korelācija= 0,329; $p=0,041$, $N=39$

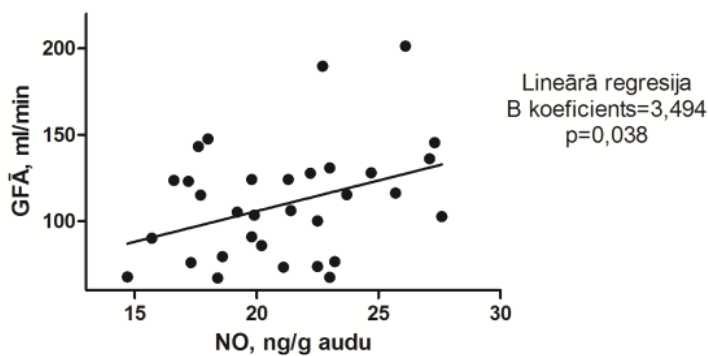


3.58. att. NO^+ koncentrācijas korelācija ar HbA1c% kontroles un pētījuma grupas pacientiem. Abscisa – $\lg[\text{NO}]$, ordināta – $\lg[\text{HbA1c}\%]$. Pīrsona korelācija= 0,484; $p=0,001$, $N=41$

Analizējot NO^+ korelāciju ar GFĀ, konstatējām, ka NO^+ koncentrācijas pieaugums varētu izraisīt GFĀ pieaugumu (lineārās regresijas B koeficients=3,494, $p=0,038$) (sk. 3.59. att.). $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ koncentrācijas korelāciju ar GFĀ nenovēroja (Lineārās regresijas B koeficients =-0,177, $p=0,601$).

Neatradām statistiski nozīmīgas sakarības starp NO^+ , $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, diabēta stāžu un diabētisko komplikāciju esamību pētījuma grupā, kā arī diabēta ārstēšanas veidu ietekmi uz NO^+ , $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ koncentrāciju. Nozīmīga korelācija netika atrasta arī starp NO^+ , NO_2^-

/NO₃⁻ un primāro arteriālo hipertensiju, koronāro sirds slimību, smēķēšanas ieradumu, nespecifisko radiācijas ietekmi, kardiovaskulārā profila terapiju (aspirīns un/vai hipotensīvie līdzekļi, statīni), lipīdu frakcijām asinīs un C-peptīda līmeni.



3.59. att. NO⁻ koncentrācijas korelācija ar glomerulārās filtrācijas ātrumu (GFĀ)

kontroles un pētījuma grupas pacientiem. Abscisa – NO⁻, ng/g audu, ordināta – GFĀ.
Lineārās regresijas B koeficients= 3,494; p=0,038, N=33

4. DISKUSIJA

4.1. Pētījumā izmantoto farmakoloģisko preparātu ietekme uz metabolisma parametriem žurkām ar STZ un HS eksperimentālajiem diabēta modeļiem

4.1.1. Mildronāta un mildronāta kombināciju ar metformīnu un glibenklamīdu ietekme uz oghidrātu un lipīdu metabolisma parametriem žurkām ar STZ un HS eksperimentālajiem modeļiem

Par perspektīviem pret diabēta līdzekļiem tiek uzskatīti taukskābju β -oksidēšanās inhibitori, jo tie veicina glikozes patēriņu (*Vitale et al.*, 2008). Šīs preparātu grupas pārstāvis mildronāts tiek plaši izmantots kā pretišērijas līdzeklis. Šo mildronātam raksturīgo farmakoloģisko iedarbību nodrošina γ -butirotetaīnhidroksilāzes inhibīcija un tās izraisītā karnitīna koncentrācijas un taukskābju β -oksidēšanās ātruma samazināšanās (*Sjakste et al.*, 2006).

L-Karnitīna līmeni asinīs mildronāts pazemina, inhibējot tā sintēzi aknās un nierēs, kā arī nogādi audos un reabsorbciju nierēs. Tas izraisa labvēlīgas audu bioķīmisko procesu pārmaiņas. Pēdējos gados diabetoloģijā intensīvi meklē preparātus, kas spēj vienlaikus uzlabot cukura diabēta kompensāciju, kavēt komplikāciju attīstību un mazināt kardiovaskulāro incidentu skaitu. Pašlaik šajā kontekstā tiek aktīvi pētīti dipeptidilpeptidāzes-4 inhibitori, glikagonam līdzīgā peptīda-1 receptoru agonisti, metformīns un citi preparāti. Tādēļ, ņemot vērā mildronāta antiīšēmisks un cukura līmeni pazeminošo iedarbību, kā arī labvēlīgo ietekmi uz cukura diabēta komplikāciju izpausmēm, ir sagaidāms, ka preparāts varētu ieņemt nozīmīgu vietu tādu perorālo pret diabēta līdzekļu vidū, kurus lieto pacienti ar lielu sirds-asinsvadu sistēmas slimību risku.

Viens no šī darba mērķiem bija noskaidrot, vai citos cukura diabēta eksperimentālajos modeļos novērotie mildronāta labvēlīgie efekti uz metabolismu izpaudīsies arī žurkām ar stretozotocīna izraisītu diabētu. Tāpat vēlējamies noskaidrot, vai šajos modeļos mildronāta kombinācijām ar metformīnu vai glibenklamīdu piemīt izteiktāki terapeitiski efekti nekā mildronātam pašam.

Mēs novērojām, ka STZ modeļa diabētiskajām žurkām mildronāts pēc 6 nedēļu ārstēšanas samazina HbA1c%, glikozes koncentrāciju tukšā dūšā un pēc ēšanas, kā arī uzlabo glikozes toleranci. Mildronāta efekts bija līdzīgs metformīna efektam, bet izteiktāks nekā

glibenklamīdam. Mildronāta kombinācijām ar metformīnu vai glibenklamīdu streptozotocīna izraisītajā diabēta modelī aditīvus efektus mēs nenovērojam (sk. 3.2-3.7.att, 3.9-3.10.att.). Žurkām ar mērenu hiperglikēmiju un hiperlipidēmiju (HS modelis) mildronāta ietekmē HbA1c% līmenis samazinājās, kā arī uzlabojās glikozes tolerance. Tāpat kā STZ modelī, mildronāta kombinācijām ar metformīnu un glibenklamīdu aditīvus efektus nenovērojam (sk. 3.16., 3.17. att).

Iepriekš mildronāta iedarbība uz cukura diabēta izraisītajām metabolisma izmaiņām jau tika pētīta gan dzīvnieku diabēta modeļos, gan pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu. Eksperimentālajā 2. tipa diabēta modelī Goto-Kakizaki līnijas žurkām pēc četras nedēļas ilgas ievadīšanas devā 200 mg/kg mildronāts pazemināja glikozes līmeni tukšā dūšā, kaut arī insulīna līmenis nemainījās. Savukārt astoņas nedēļas ilga mildronāta ievadīšana devā 100 un 200 mg/kg dienā diabētiskajām Goto-Kakizaki līnijas žurkām veicināja fruktozamīna (glikozilētā albumīna) līmeņa pazemināšanos līdz veselām Wistar žurkām raksturīgajam lielumam. Pētījuma autori uzskata, ka iegūtie rezultāti norāda uz to, ka mildronāta pretdiabētisko iedarbību nosaka taukskābju oksidācijas ātruma samazināšanās un glikozes metabolisma pastiprināšanās (Liepinsh *et al.*, 2009).

Tā pati zinātnieku grupa pētīja arī mildronāta (kombinācijā ar metformīnu vai bez tā) iedarbību uz Zucker žurkām (aptaukošanās modelis). Eksperimentu rezultāti parādīja, ka mildronāts (200 mg/kg p.o.) un metformīns (300 mg/kg p.o.) Zucker žurkām glikozes līmeni pazemina līdzīgi gan pie akūtas (nosakot vienas stundas laikā pēc ievadīšanas), gan ilgstošas ievadīšanas (nosakot pēc četru nedēļu kursa). Tika konstatēts, ka minētā abu preparātu kombinācija neizraisa izteiktāku glikozes līmeņa pazemināšanos nekā tas notiek, ja preparātus lieto monoterapijas veidā (Liepins *et al.*, 2011). Tādējādi, arī citos pētījumos aditīvs efekts mildronāta un metformīna kombinācija netika konstatēts.

Mūsu darbā žurku eksperimentālā diabēta modeļos ar izteiktu vai mērenu insulīna deficītu mildronāts tā koncentrāciju neietekmēja (sk. 3.15. att). Savukārt Liepiņš ar līdzstrādniekiem parādīja, ka tuklām Zucker žurkām mildronāta un metformīna vienlaicīga lietošana pazemina insulīna līmeni pēc ēšanas un palēnina dzīvnieku ķermeņa masas pieaugumu (aptaukošanos). Tas norāda, ka šīs kombinācijas lietošana palielina organisma jutību pret insulīnu (Liepinsh *et al.*, 2011). Ievadot mildronātu lielās devās (200 mg/kg, 20 dienas) pelēm bez diabēta, tas izraisīja ievērojamu glikozes līmeņa pazemināšanos (Liepinsh *et al.*, 2008).

Mūsu pētījumā STZ diabēta modeļa žurkām triglicerīdu, kopējā holesterīna un ketonvielu koncentrācija neatšķīrās no kontroles grupas līmeņa, un mildronāts, kā arī tā kombinācijas ar metformīnu vai glibenklamīdu, lipīdu vielmaiņas parametrus neizmainīja. Tomēr HS

žurkām, kurām hiperlipidēmija attīstījās, mildronāts triglicerīdu, ketonvielu un kopējā holesterīna līmeni pazemināja, bet metformīnam šādu efektu nenovērojām (sk. 3.13-3.13. att).

Liepiņš ar līdzstrādniekiem parādīja, ka mildronāta ievadīšana devā 200 mg/kg/dienā 8 nedēļu garumā izraisa β -hidroksibutirāta koncentrācijas pazemināšanos diabētisku žurku organismā, un tas norāda uz taukskābju lēnāku oksidēšanos un glikozes metabolisma pastiprināšanos. Turklāt pēc astoņas nedēļas ilgās ārstēšanas diabētisku žurku organismā tika novērots palielināts augsta blīvuma lipoproteīnu līmenis (Liepiņš *et al.*, 2009). Tādējādi, mūsu iegūtie dati par mildronāta pozitīvo ietekmi uz lipīdu vielmaiņu HS žurkām korelē ar citu autoru datiem par šī preparāta iedarbību uz cukuru un lipīdu metabolismu.

4.1.2. Iespējamie mildronāta darbības mehānismi pie cukura diabēta

Ir zināms, ka mildronāts inhibē L-karnitīna biosintēzi (Simkhovich *et al.*, 1988), kā arī tā transportu audos un reabsorbiju nierēs (Kuwayama *et al.*, 1999). Tādējādi L-karnitīna koncentrācijas pazemināšana ir galvenais mildronāta darbības mehānisms, un šī pazemināšana ir nepieciešama šūnu enerģētiskā metabolisma pārmaiņu ierosināšanai.

Tā kā L-karnitīns taukskābes nogādā mitohondrijos, varēja sagaidīt, ka tā koncentrācijas samazināšanās izraisīs taukskābju β -oksidēšanās ātruma palēnināšanos un kompensatoru aerobās glikolīzes procesa pastiprināšanos. Lai notiktu adaptācija samazinātai taukskābju pieejamībai mitohondrijos un atbilstošo glikolīzes procesā iesaisto proteīnu kontrolējošo gēnu ekspresijas izmaiņas, ir nepieciešama ilgstoša (vismaz 10–14 dienas) mildronāta lietošana. Eksperimentāli ir pierādīts, ka L-karnitīna koncentrācijas samazināšanās patiešām aktivē adaptācijas mehānismus, kuri šūnās pastiprina glikozes metabolismu, kā arī uzlabo metabolisma plasticitāti un adaptīvo atbildes reakciju uz hiperglikēmijas un hiperlipidēmijas izraisītiem metabolisma traucējumiem (Dambrova *et al.*, 2002).

Šī darba ietvaros mēs novērojām, ka mildronāts veicina GLUT4 ekspresiju sirdī un skeleta muskuļos žurkām ar streptozotocīna izraisītu diabētu, neietekmējot insulīna koncentrāciju. Tā kā ir zināms, ka mildronāts uzlabo šūnu receptoru sensitivitāti pret insulīnu, tad bija sagaidāms, ka GLUT4 ekspresija varētu vēl vairāk pastiprināt preparāta hipoglikemizējošo efektu.

Pēc citu autoru datiem, arī Zucker žurkām ar aptaukošanos mildronāts izsauc GLUT4 ekspresijas pastiprināšanos (Liepiņš *et al.*, 2011). Ietekmējot GLUT 4, HK-2 un INSR ekspresijas līmeni un aktivitāti, mildronāts stimulē insulīnatkarīgo glikozes patēriņu izolētās

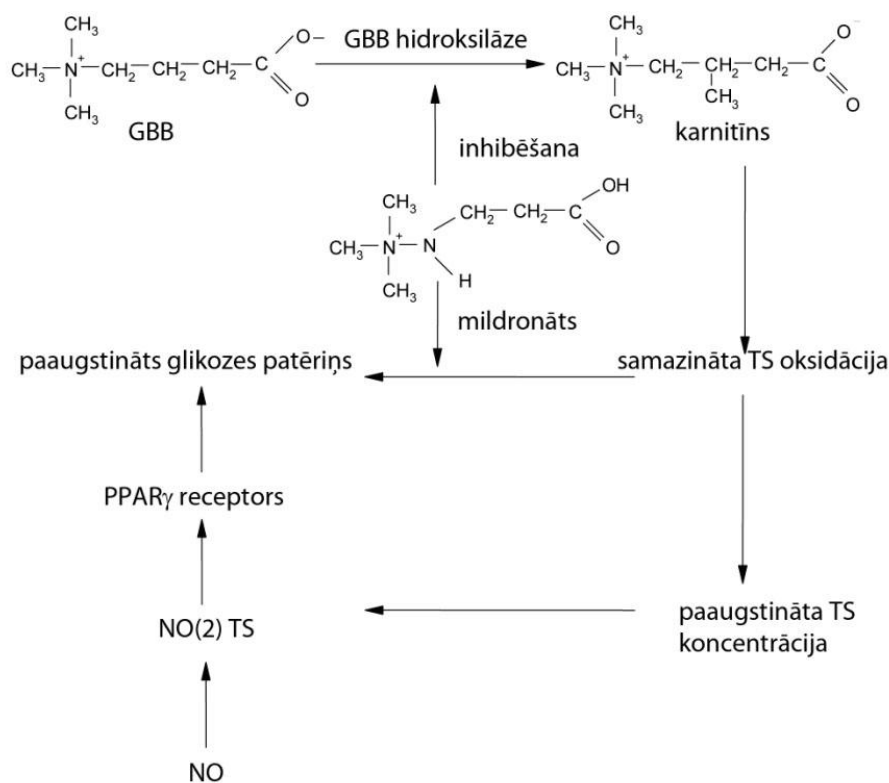
peļu sirdīs (Liepinsh *et al.*, 2008). Tāpat ir parādīts, ka mildronāts paātrina glikozes aerobo oksidēšanos žurku sirdīs arī hipoksijas apstākļos (Asaka *et al.*, 1998).

Liepiņš ar līdzstrādniekiem ir novērojis, ka mildronāts ietekmē peroksisomu proliferatora aktivēto alfa receptoru (PPAR- α) aktivitāti. Peroksisomu α - un γ -receptoru proliferatori ir centrālie enerģētiskās vielmaiņas regulētāji, kas regulē adaptācijas mehānismus, šūnu metabolismam pielāgojoties palielinātai lipīdu koncentrācijai. Lipīdiem un to atvasinājumiem piesaistoties PPAR- α un PPAR- γ receptoriem, tie tiek aktivēti (Penumetcha *et al.*, 2012). Mildronāts atjauno PPAR- α receptoru jutību un pastiprina PPAR- α ekspresiju šūnu kodolos, kā arī pastiprina to gēnu ekspresiju, kas sirds audos piedalās taukskābju metabolismā (gēnu, kas nosaka karnitīn-palmitoil-transferāzes-1, acilkoenzīma-A-oksidāzes-1, garķēžu taukskābju acilkoenzīma-A-sintetāzes, peroksisomu membrānu olbaltumvielu un lipoproteīnu lipāzes aktivitāti). Protī, aktivējot PPAR- α , mildronāts samazina taukskābju uzkrāšanos miokarda šūnu mitohondrijos, vienlaikus inhibējot ne tikai to transportu uz mitohondrijiem, bet arī stimulējot tur jau nokļuvušo taukskābju β -oksidēšanos. Jāatzīmē, ka šo mildronāta inducēto procesu rezultātā kopējais taukskābju oksidēšanās ātrums tomēr samazinās. Samazinot taukskābju krājumus mitohondrijos, mildronāts nomāc arī to lipotoksisko iedarbību – vienu no insulīna rezistenci pastiprinošajiem faktoriem (Liepinsh *et al.*, 2011).

Ir iespējams vēl viens hipotētisks mildronāta darbības mehānisms, ar kura palīdzību mildronāts varētu pazemināt cukura līmeni. Ir novērots, ka diabētisku dzīvnieku asinsvados pastiprinās NO[•] biosintēze (Stadler *et al.*, 2005). Arī mēs novērojām palielinātu NO[•] koncentrāciju STZ žurku asinīs, nierēs, aknās un aortas sieniņā (sk. 3.40-3.44. att.). Mildronāts kavē taukskābju oksidēšanos. Tāpēc var sagaidīt, ka taukskābju koncentrācija asinsritē preparāta ietekmē varētu palielināties. Tā kā diabēts izraisa pastiprinātu NO[•] sintēzi, tas var veicināt taukskābju nitroatvasinājumu sintēzi. Nitrotaukskābju saistīšanās ar PPAR- γ receptoriem, savukārt, var izraisīt glikozes līmeņa pazemināšanos (sk. 4.1. att).

Interesants ir jautājums par to, vai, salīdzinot ar mildronāta *per se* lietošanu, mildronāta un metformīna vai mildronāta un glibenklamīda kombinācijas varētu palielināt diabēta ārstēšanas efektivitāti. Diemžēl šo preparātu kombinācijām nekādus aditīvus efektus uz HbA1c%, glikozes līmeni un glikozes toleranci mēs nenovērojām.

Nemot vērā eksperimentālā diabēta modeļu izraisīta insulīna deficīta līmeni, iespējams, ka atsevišķi lietotie preparāti jau nodrošina maksimāli iespējamo iedarbības līmeni uz pētāmajiem parametriem, un tāpēc to kombinācijas ārstēšanas efektivitāti papildus neuzlaboja. Tomēr nevar izslēgt arī iespēju, ka preparāti savstarpēji konkurē par saistību ar attiecīgajiem receptoriem, kas mazina to iedarbības summāro efektu. Tāpēc, lai zinātniski pamatotu un izskaidrotu novērotās likumsakarības, ir nepieciešami tālāki pētījumi.



4.1.att. Hipotētisks mildronāta glikozes pazeminošā efekta mehānisms. NO[•]-slāpekļa oksīds; TS – taukskābes; GBB – γ-butiro-betaīns; NO(2)TS - taukskābju nitroatvasinājumi.

Kopumā šajā darbā tika apstiprināta mildronāta labvēlīgā ietekme uz glikozes un lipīdu metabolismu dzīvniekiem ar eksperimentālo cukura diabētu. Tāpēc jāsecina, ka šī preparāta lietošanas efektivitātes izpēte diabētisko komplikāciju profilaksei un ārstēšanai klīnikā ir patoģenētiski pamatota.

4.1.3. 1,4-dihidropiridīnu ietekme uz glikozes līmeni

Otra šajā darbā pētīto preparātu grupa bija 1,4-dihidropiridīni: cerebrokrasts, etaftorons un fenoflorons. Vispirms pēc šo preparātu 3 dienu ievadīšanas STZ žurkām tika noteikts glikozes līmenis. Mēs noskaidrojām, ka eksperimentālā STZ diabēta modelī tikai etaftorons pazemina glikozes līmeni dzīvnieku asinīs. (sk. 3.8.att.).

Citu autoru darbos (Briede *et al.*, 2004) sastopamas norādes par to, ka devā 0,005 mg/kg, 0,05 mg/kg un 0,5 mg/kg trīs stundas pēc ievadīšanas un 76 stundas pēc ievadīšanas cerebrokrasts un etaftorons pazemina glikozes līmeni STZ žurkām. Pie tam cerebrokrastam

tika novēroti izteiktāki efekti. Citā darbā Biede ar līdzstrādniekiem pielietoja modificētu protokolu un ievadīja STZ žurkām cerebrokrastu devās 0,05 mg/kg un 0,5 mg/kg dažas stundas vai dienas pirms diabēta ierosināšanas, kā arī 24 un 48 stundas pēc tā ievadīšanas, vai arī 3 dienas pēc kārtas pēc diabēta ierosināšanas (48 stundas pēc STZ). Glikozes koncentrācijas pazemināšanās tika novērota, sākot ar ceturto dienu pēc pēdējās ievadīšanas, ja cerebrokrasta ievadīšana tika uzsākta pirms STZ injekcijas, un sākot ar astoto dienu pēc pēdējās cerebrokrasta ievadīšanas, ja preparātu ievadīja 48 stundas pēc STZ. Autori uzskata, ka cerebrokrasta izsauktais hipoglikemizējošais efekts ir saistīts ar aizkuņģa dziedzera saliņu β -šūnu bojāejas samazināšanos vai to reģenerāciju, jo tika novērots arī insulīna sekrēcijas pieaugums (Briede *et al.*, 2007).

Mūsu eksperimentos 1,4-DHP tika ievadīti 10-12 dienā pēc STZ, kas atbilst diabēta komplikāciju pētīšanas protokolam. Glikozes koncentrāciju asinīs noteicām nākamajā dienā pēc pēdējās preparātu ievadīšanas. Iespējams, ka mūsu modelī glikozes līmeņa izteiktu pazemināšanos 1,4-dihidropiridīna atvasinājumu gadījumā varētu novērot vēl pēc dažām dienām, vai arī – ja ievadītu 1,4-DHP uzreiz pēc diabēta simptomu konstatēšanas, taču tas neatbilda mūsu izvēlētajam protokolam.

Tādējādi, mūsu iegūtie rezultāti par etaforona ietekmi uz glikozes līmeni STZ žurkām 10-12 dienas pēc diabēta ierosināšanas, iespējams, liecina par etaforona ietekmi uz glikozes līmeņa pazemināšanas ekstrapankreatiskiem mehānismiem.

4.2. Glikozes transportieru ekspresijas un NO[•] biosintēzes izmaiņas eksperimentālā diabēta modeļos

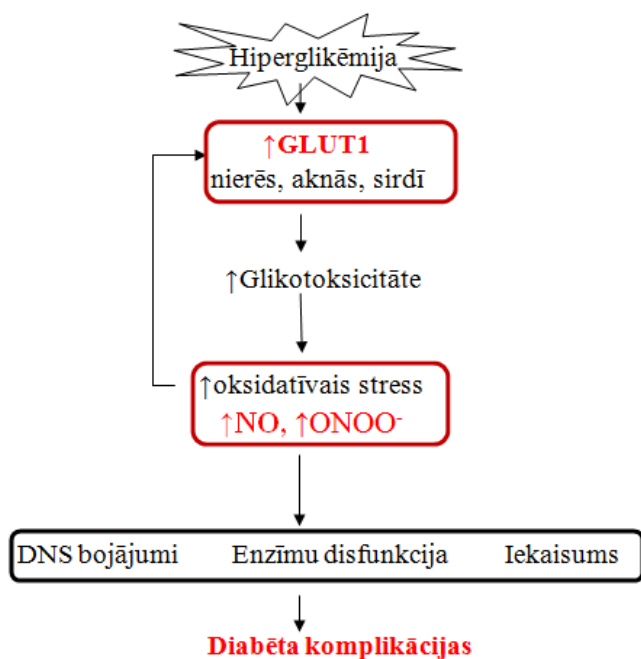
GLUT1 tiek ekspresēts vairākos audos, un tā galvenā funkcija ir nervu sistēmas nodrošināšana ar glikozi (Mueckler *et al.*, 2013). Tomēr šis glikozes transportieris tiek intensīvi pētīts arī kā diabētisko komplikāciju patoģenēzes elements.

Ir dati par to, ka oksidatīvais stress pie cukura diabēta pastiprina GLUT1 ekspresiju (Carruthers *et al.*, 2009). Tieši GLUT1 pastiprināta ekspresija veicina intracelulāro hiperglikēmiju ar tai sekojošiem metabolisma traucējumiem, un tā tiek saistīta ar glikotoksicitātes fenomenu (Forbes *et al.*, 2008). Turklāt nierēs GLUT1 hiperekspresija korelē ar ekstarcelulārā matricsa pastiprinātu veidošanos ar tai sekojošu fibrozes attīstību (Brosius *et al.*, 2009). GLUT1 loma tiek pētīta arī pie diabētiskās retinopātijas.

Kopumā GLUT1 hiperekspresija ir uzskatāma par negatīvu faktoru diabēta mikrovaskulāro un citu komplikāciju patoģenēzē, un to apstiprina arī pētījumi par GLUT1

ekspresijas vai šī receptora inhibīciju pie diabētiskās nefropātijas, kardiopātijas un retinopātijas (Heilig *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013).

Mēs novērojām GLUT1 ekspresijas pieaugumu STZ diabētisko žurku nierēs, aknās un sirdī paralēli ar NO[•] koncentrācijas pieaugumu. Tādējādi mūsu iegūtie dati par GLUT1 hiperekspresiju liecina par to, ka GLUT1 pārprodukcija varētu būt saistīta ar NO[•] un peroksinitrīta izraisītajiem audu bojājumiem un veicināt diabētisko komplikāciju attīstību. Hipotētiskā GLUT1 hiperekspresijas un NO[•] pārprodukcijas asociācija ir parādīta 4.2. attēlā.



4.2.att. Hipotētiskā GLUT1 hiperekspresijas un slāpekļa oksīda pārprodukcijas saistība diabētisko komplikāciju patoģenēzē

4.2.1. GLUT1 ekspresijas un NO[•] koncentrācijas izmaiņas nierēs un to loma diabētiskās nefropātijas patoģenēzē

Žurkām ar STZ un HS diabētu mēs novērojām GLUT1 ekspresijas izteiktu pieaugumu nierēs kā mRNS, tā arī proteīna līmenī. STZ modelī šis pieaugums bija izteiktāks un tika novērots kā 12 dienas, tā arī 6 nedēļas pēc diabēta ierosināšanas (3.18. att; 3.19. att., 3.27.att., 3.28. att., 3.35. att.). Vairums agrāk publicēto pētījumu norāda uz GLUT1 ekspresijas pieaugumu nierēs pie hiperglikēmijas, taču dažos gadījumos tika novērots pretējs efekts. GLUT1 ekspresijas pieaugums konstatēts arī mezangija šūnu kultūrās, kam sekoja pastiprināta glikozes uzņemšana un ekstracelulārā matricsa proteīnu ekspresijas pieaugums (Heilig *et al.*, 1995).

Pētījumos ar mezangija šūnām *in vitro* tika parādīts, ka GLUT1 inhibīcija spēj samazināt glikozes uzņemšanu un ar to saistītā ekstracelulārā matricas izplatīšanos (Heilig *et al.*, 2013). STZ diabētiskām žurkām vairākos pētījumos tika novērota GLUT1 proteīna pastiprināta ekspresija nieru garozā (Linden *et al.*, 2006, D'Agord Schaan *et al.*, 2001, daSilva *et al.*, 2013, Lv *et al.*, 2014). Tomēr literatūrā ir dati arī par GLUT1 proteīna ekspresijas samazināšanos STZ žurku proksimālos kanāļiņos 2-4 nedēļas pēc diabēta ierosināšanas (Dominguez *et al.*, 1994).

Lai pārliecinātos par iespējamo GLUT1 un NO[•] biosintēzes izmaiņu asociāciju ar nieru bojājumiem dzīvniekiem cukura diabēta agrīnajā fāzē, mēs noteicām NO[•] koncentrāciju STZ žurku nierēs – sākot ar 48 stundām un līdz 6 nedēļām pēc diabēta ierosināšanas, un konstatējām NO[•] pastiprinātu biosintēzi šajā periodā (3.36. att.). NO[•] koncentrācijas pieaugumu streptozotocīna diabētisko žurku nierēs novēroja arī Stadler ar līdzstrādniekiem. Viņu darbā paaugstināts NO[•] līmenis (noteikts ar EPR metodi) saglabājās līdz 7 nedēļām pēc diabēta ierosināšanas un tika novērots vienlaicīgi ar pastiprinātu peroksinitrīta veidošanos (Stadler *et al.*, 2003). Tā pati pētnieku grupa parādīja, ka insulīna ievadīšana samazina palielināto NO[•] produkciju aknās un nierēs, kas apstiprina hiperglikēmijas lomu NO[•] biosintēzes veicināšanā šajos orgānos pie diabēta.

Tomēr tika konstatēts, ka insulīns nespēj novērst proteīnu karbonilēšanu un sirds hipertrofijas attīstību diabētiskiem dzīvniekiem. Aminoguanidīns, kas ir NOS neselektīvais inhibitors, samazināja NO[•] koncentrāciju nierēs, aknās un aortā, kā arī peroksinitrīta produkciju aortā, proteīnu karbonilproduktu koncentrāciju un sirds hipertrofiju, neietekmējot glikozes līmeni (Stadler *et al.*, 2005). Cita autora darbā ir publicēti dati par to, ka NO[•] koncentrācija nieru kanālišu filtrātā STZ žurkām glomerulārās hiperfiltrācijas fāzē ir paaugstināta (Levine, 2008).

Literatūras dati par NOS izoformu iesaistīšanos NO[•] pastiprinātā biosintēzē nierēs pie cukura diabēta ir pretrunīgi.

Lai noskaidrotu NO[•] pārprodukcijas avotus STZ žurku nierēs, mēs pielietojām vairākus NO[•] biosintēzes inhibitorus, kā arī noteicām iNOS un eNOS ekspresijas izmaiņas. Mēs konstatējām, ka aminoguanidīns (neselektīvais NOS inhibitors) un allopurinols (ksantīna oksido-reduktāzes inhibitors) NO[•] koncentrāciju nierēs samazina. Arī selektīvais NOS inhibitors 1400W uzrādīja tendenci samazināt NO[•] koncentrāciju, taču statistiskā ticamība netika sasniegta (sk. 3.41.att).

Tāpat mēs konstatējam, ka STZ modeļa žurkām iNOS un XOR proteīna ekspresija nierēs ir paaugstināta, bet eNOS ekspresija – samazināta (sk. 3.47-3.52. att). eNOS un XOR mRNS ekspresijas izmaiņas atšķirās no proteīna ekspresijas. Salīdzinot mūsu datus ar literatūras datiem, konstatējam, ka ir zināmas norādes par eNOS ekspresijas samazināšanos vai atjūgšanu pie diabētiskās nefropātijas - paralēli ar iNOS hiperekspresiju, kas noved pie peroksinitrīta pārprodukcijas un tās izraisītiem DNS bojājumiem (Pacher *et al.*, 2007 un atsaucies tajā). Tāpat ir dati par to, ka STZ žurku nierēs - vienlaikus ar palielinātu glomerulāro filtrācijas ātrumu un nieru plazmas plūsmu - eNOS ekspresija pastiprinās nieru glomerulos, savukārt iNOS ekspresija netiek konstatēta vispār. NOS inhibitora L-NAME ievadīšana normalizēja nieru asinsriti, kas norāda un NO[•] lomu diabētiskās nefropātijas agrīnajā fāzē (Veelken *et al.*, 2000). Daži zinātnieki ziņo gan par iNOS, gan eNOS iesaistīšanos ekspresijas veicināšanā diabētisko žurku nieru garozā (Choi *et al.*, 1999).

Aktīvas diskusijas pētnieku vidū notiek arī par ksantīna oksidoreduktāzes (XOR) iesaistīšanos iekaisuma procesos nierēs pie diabēta. Piemēram, ir publicēti dati par XOR pastiprinātu ekspresiju nieru kanāliņu šūnu kultūrās, audzējot tos barotnēs ar paaugstinātu fruktozes koncentrāciju (Cirillo *et al.*, 2009). Streptozotocīna modeļa diabētiskām pelēm XOR hiperekspresija nierēs tika novērota paralēli ar nitrotirozīna paaugstinātu koncentrāciju šajā orgānā (Kiss *et al.*, 2013). XOR aktivitātes pieaugums eksperimentālos diabēta modeļos nierēs korelēja ar pazeminātu glutaciona peroksidāzes aktivitāti un lielāku nitrīta koncentrāciju, kas norāda uz XOR iesaistīšanos NO[•] sintēzē un oksidatīvā stresa attīstībā (Aliciguzel *et al.*, 2003).

Tādējādi mūsu un citu autoru dati norāda gan uz NOS, gan XOR iesaistīšanos NO[•] pārprodukcijā nierēs.

4.2.2. GLUT1 ekspresijas un NO[•] koncentrācijas izmaiņas aknās un to loma nealkoholiskā steatohepatīta sākumstadijā

Cukura diabēta gadījumā GLUT1 ekspresijas līmenis eksperimentālo dzīvnieku aknās ir maz pētīts. Dažos darbos tiek ziņots par GLUT1 ekspresijas pieaugumu diabētiskiem dzīvniekiem (Ybarra *et al.*, 1997, Tal *et al.*, 1991). GLUT1 pastiprināta ekspresija tika novērota arī aknu karcinomu gadījumā, kas varētu liecināt par šī glikozes transportiera ekspresijas saistību ar hipoksiju (Roh *et al.*, 2004).

Savā pētījumā mēs novērojām pastiprinātu GLUT1 proteīna ekspresiju STZ žurku aknās, bet atbilstošo mRNS līmenis nebija izmainīts (sk. 3.20-3.21.att.). Iespējams, tas norāda

uz GLUT1 ekspresijas pēctranskripcijas regulāciju, jo GLUT1 ekspresija var tikt regulēta kā transkripcijas, tā arī pēctranskripcijas līmenī, un to ietekmē glikozes līmeņa svārstības un hipoksija (Carruthers *et al.*, 2009).

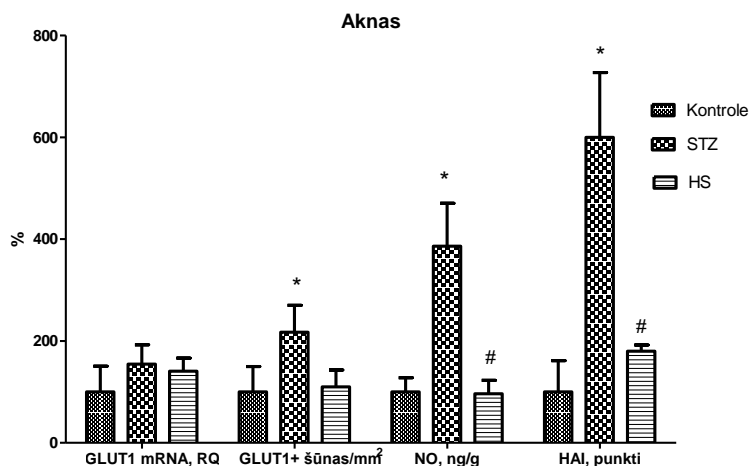
Interesanti, ka pretēji STZ diabētiskajos dzīvniekos novērotajam, HS žurkām GLUT1 ekspresija proteīna līmenī nebija pastiprināta, bet tā, savukārt, bija palielināta mRNS līmenī (sk. 3.25-3.26. att). Tas ir vēl viens norādījums uz to, ka GLUT1 ekspresijas līmenis tiek nepārtraukti regulēts - atbilstoši glikozes un lipīdu metabolisma izmaiņām dzīvnieku organismā.

STZ diabēta modeļa dzīvniekiem tika novērots arī izteikts aknu bojājums, kuru novērtējām pēc HAI skalas. Savukārt HS modeļa dzīvniekiem aknu bojājums bija maz izteikts (3.22. att). Šie rezultāti saskan ar Freemerman un līdzstrādnieku datiem, kuri liecina par to, ka GLUT1 hiperekspresija makrofāgos veicina proinflaturo mediatoru sekrēciju un ROS produkciju, savukārt glikolīzes inhibīcija šos efektus neitralizē. Autori uzskata, ka pastiprināta glikozes utilizācija veicina ROS-ierosināto proinflaturo stāvokli, un aknās tas var veicināt insulīna rezistences attīstību (Freemerman *et al.*, 2014).

Mūsu iegūtie rezultāti netieši apstiprina šī pieņēmuma pamatotību, jo arī mēs novērojām NO[•] biosintēzes intensifikāciju STZ žurku aknās (sk. 3.37.att.). Savukārt HS modeļa žurkām NO[•] koncentrācija aknās nebija lielāka kā kontroles grupas dzīvniekiem. STZ žurku aknās NO[•] līmeni samazināja kā 1400W, tā arī aminoguanids, kas, pēc mūsu domām, norāda uz iNOS nozīmi aknu bojājuma patoģenēzē pie STZ diabēta.

iNOS iesaistīšanās, kā arī pastiprināta brīvo radikāļu veidošanās un lipīdu peroksidēšanās STZ žurku aknās tika novērota arī citu zinātnieku eksperimentos (Stadler *et al.*, 2008). Savukārt, mūsu novērojumi par to, ka allopurinols (ksantīna oksido-reduktāzes inhibitors) NO[•] koncentrāciju aknās nemaina, sakrīt ar to pētnieku datiem, kuri cukura diabēta dzīvnieku aknās XOR hiperekspresiju nav novērojuši (Aliciguzel *et al.*, 2003). Tomēr ir publicēti rezultāti arī par šī enzīma ekspresijas palielināšanos aknās dzīvniekiem ar eksperimentālo streptozotocīna diabētu (Jin *et al.*, 2004). Iespējams, kā šīs atšķirības rezultātos ir saistītas ar dažādu eksperimentālo protokolu izmantošanu.

Tādējādi jāsecina, ka diabētiskā steatohepatīta attīstības sākumstadijā augstam glikozes līmenim kopā ar GLUT1 hiperekspresiju ir lielāka ietekme uz aknu bojājuma attīstību nekā hiperlipidēmijai. Rezultātu apkopojums par GLUT1 un NO[•] koncentrācijas sakarību ar aknu bojājuma intensitāti divos diabēta modeļos ir sniegts 4.3. attēlā.



4.3. att. GLUT1 ekspresijas, slāpekļa oksīda produkcijas un aknu bojājuma pakāpes novērtējums STZ un HS modeļu žurkām

4.2.3. NO[•] koncentrācijas izmaiņas asinīs un aortas sienīņā un to loma diabēta makrovaskulāro komplikāciju patoģenēzē

Mēs novērojām izteiktu NO[•] koncentrācijas pieaugumu asinīs 48 stundas un 1 nedēļu pēc STZ ievadīšanas, kā arī abdominālās aortas sienīņā – 9-12 dienas pēc diabēta ierosināšanas (3.39., 3.43. att). Tas saskan ar literatūras norādēm par to, ka 4 nedēļas pēc diabēta indukcijas STZ modeļa žurku serumā antioksidatīvo enzīmu aktivitāte samazinās, bet NO[•] metabolītu NO₃⁻ un NO₂⁻ līmenis ir paaugstinās (Coskun *et al.*, 2004).

Pēc mūsu datiem aortas sienīņā NO[•] koncentrāciju statistiski ticami samazina allopurinols (sk. 3.43.att), kas norāda uz XOR iesaistīšanos NO[•] metabolismā asinsvados pie hiperglikēmijas. Tomēr arī aminoguanidīnam, kurš inhibē NOS, bija līdzīgs efekts. Citi pētnieki STZ diabētisko žurku aortā ir novērojuši pastiprinātu superoksīda veidošanās un palielinātu NADPH oksidāzes aktivitāti, kā arī eNOS dimēru/monomēru attiecības samazināšanās, kas norāda uz eNOS atjūgšanu (Wenzel *et al.*, 2007).

Palielināta XOR aktivitāte ir novērota diabētisko žurku plazmā un sirdī (Wendt *et al.*, 2005). Neskatoties uz to, ka NO[•] ir vazorelaksants, un tā deficīts tiek novērots pie aterosklerozes (Cantu-Medellin *et al.*, 2013), mēs uzskatām, ka mūsu un citu pētnieku novērotais NO[•] koncentrācijas pieaugums aortas sienīņā dzīvniekiem ar eksperimentālo diabētu nav labvēlīgs faktors, jo tas var veicināt oksidatīvo stresu un ar to saistīto endoteliālo disfunkciju.

Tomēr literatūrā atrodami arī citi viedokļi. Tā, piemēram, notiek aktīvas diskusijas par XOR lomu NOS neatkarīgajā NO[•] sintēzē pie hipoksijas un iekaisuma, un tas attiecas arī uz diabētu. Daudzi zinātnieki uzskata, ka nitrīta reducēšanās līdz NO[•] ksantīna oksidoreduktāzes darbības rezultātā ir diabēta komplikācijas kavējošs faktors, jo tādējādi tiek novērsts NO[•] deficīts un ar to saistītais kardiovaskulārais risks (Cantu-Medellin *et al.*, 2013). Tomēr pārlicinošie dati par XOR nozīmi oksidatīvā stresa attīstībā liek domāt, ka galvenā nozīme dažādu radikālu ietekmei uz diabēta komplikāciju attīstību tomēr ir to aktuālajai koncentrācijai audos un to veidošanās vietai. Tāpēc, interpretējot rezultātus par tādu signālmolekulu kā NO[•] radikāla ietekmi uz diabēta attīstību, jāņem vērā NO[•] radikāla augstā reaģētspēja un niecīgā dzīvildze, kas nosaka tā iedarbības efekta atkarību no tā veidošanās vietas šūnā (uz citoplazmatiskās membrānas, endoplazmatiskajā retikulumā, citosolā vai uz mitohondriālās membrānas).

Atkarībā no citu radikālu koncentrācijas NO[•] rašanās vietā, tai skaitā aktivēto skābekļa formu klātbūtnes, var notikt vai nu NO[•] radikālu rekombinācija, vai proteīnu S-nitrozilēšana, oksidēšana vai arī reakcija ar citām aktivētajām skābekļa formām un tā rezultātā - citotoksisku produktu veidošanās. Tāpēc jautājums par to, kuru NOS aktivēšanai ir pozitīva ietekme uz diabēta komplikāciju attīstību, bet kuru – negatīva, paliek atklāts un prasa padziļinātu izpēti. Tomēr patoloģiski augsta NO[•] koncentrācija nedz audos, nedz asinsritē nenoliedzami nav vēlama, jo tā izsauc šūnu bojājumus un asinsspiediena pārmērīgu samazinājumu.

4.2.4. GLUT1 un GLUT4 ekspresijas izmaiņas sirdī un to iespējamā saistība ar diabētiskās kardiomiopātijas attīstību

GLUT1 ekspresijas izmaiņas sirdī tiek saistītas ar diabētiskās kardiomiopātijas attīstību. Mēs reģistrējām GLUT1 ekspresijas pieaugumu STZ modeļa žurku sirdī mRNS un proteīna līmenī (3.24. att., 3.24. att). Toties HS žurkām GLUT1 hiperekspresiju novērojām tikai proteīna līmenī (3.29. att; 3.30. att). Kaut arī daži autori STZ modeļa žurkām ir konstatējuši GLUT1 ekspresijas samazinājumu (Depre *et al.*, 2000; Kainulainen *et al.*, 1994, Soltésová *et al.*, 2013), tomēr ir publicēti dati arī par to, ka GLUT1 gēnu ekspresijas līmenis STZ diabēta žurkām nemainās (Ybarra *et al.*, 1997).

GLUT1 ekspresijas palielinājums miokardā tika novērots žurkām ar aizkavētu intrauterīno augšanu, hipertensiju un hiperinsulinēmiju (Langdown *et al.*, 2001). GLUT1 hiperekspresija miokardā tiek saistīta ar samazinātu metabolo fleksibilitāti un uzskata, ka tā veicina sirds disfunkciju aptaukošanās modeļos (Yan *et al.*, 2009).

Kopumā uzskati par GLUT1 lomu sirdī pie cukura diabēta joprojām ir atšķirīgi, jo tās izpēte ir apgrūtināta sakarā ar to, ka šī glikozes transportiera ekspresijas pakāpe dzīvniekiem mainās atkarībā no to barošanas režīma un/vai insulīna līmeņa organismā (Kraegen *et al.*, 1993).

Literatūrā ir dati par GLUT4 ekspresijas samazināšanos eksperimentālo dzīvnieku un cilvēku insulīnatkarīgajos audos pie cukura diabēta. Tā ir raksturīga gadījumos, kad veidojas insulīna deficīts vai insulīna rezistence. GLUT4 ekspresija samazinās arī oksidatīvā stresa ietekmē (Katz, 2007). Miokardā GLUT4 ekspresijas samazināšanās tiek saistīta ar kontraktīlās disfunkcijas attīstību un lielāku aritmiju risku (Huang *et al.*, 2009).

Šo parādību pamatā ir dažādi molekulārie mehānismi, tostarp arī GLUT4 ekspresijas samazināšanās. GLUT4 hipoekspresija miokardā nozīmē samazinātu glikozes oksidāciju un palielinātu brīvo taukskābju oksidāciju kardiomiocītos, kas noved pie palielināta skābekļa patēriņa ATP sintēzei mitohondrijos un samazinātas miokarda enerģētiskā metabolisma efektivitātes (Bugger *et al.*, 2014).

Savā pētījumā mēs novērojām GLUT4 ekspresijas samazinājumu STZ modeļa dzīvnieku miokardā (3.33. att., 3.34. att.).

4.2.5. GLUT1, GLUT4 ekspresijas un NO[•] koncentrācijas izmaiņas skeleta muskulatūrā un to iespējamā saistība ar insulīna rezistenci

Dzīvniekiem ar eksperimentālo cukura diabētu skeleta muskuļos mēs novērojām niecīgu GLUT1 ekspresiju, savukārt GLUT4 ekspresija bija samazināta (3.31. att., 3.32. att.). Tajā pašā laikā diabētisko dzīvnieku skeleta muskuļos mēs novērojām izteiktu NO[•] pārprodukciju (3.38. att.). NO[•] koncentrāciju muskuļos samazināja kā NOS inhibitors aminoguanidīns, tā arī XOR inhibitors allopurinols (3.44. att.).

Šie rezultāti sakrīt ar citu zinātnieku datiem par XOR hiperekspresijas izsaukto oksidatīvo stresu muskuļaudos cukura diabēta gadījumā (Bravard *et al.*, 2011). Vairākos pētījumos ir konstatēts oksidatīvā stresa intensitātes pieaugums arī diabētisko dzīvnieku skeleta muskuļos (Forbes *et al.*, 2013). Pretēji tam, ir arī publikācijas, kurās dzīvniekiem ar insulīna rezistenci un aptaukošanās skeleta muskuļos paaugstināta nitrīta, nitrotirozīna un lipīdu peroksidēšanās gala produktu koncentrācija netika konstatēta (Kadiiska *et al.*, 2012).

Tāpēc, interpretējot mūsu iegūtos rezultātus, jāsecina, ka pie hipoinsulīnēmiskā cukura diabēta skeleta muskuļos glikotoksicitāte nav noteicošais faktors oksidatīvā stresa veicināšanā, jo glikozes ieplūšana šūnā ir samazināta GLUT4 hipoekspresijas dēļ, un arī

GLUT1 ekspresija irniecīga. Acīmredzot oksidatīvo stresu muskuļos hiperglikēmija veicina kādā citā - netiešā veidā, piemēram, caur pastiprinātu olbaltumvielu un lipīdu katabolismu un/vai citiem šūnas metabolisma traucējumiem. Tādējādi mēs domājam, ka oksidatīvā stresa attīstības ceļi atšķiras insulīnatkarīgos un insulīnneatkarīgos audos. Tā kā ir parādīts, ka skeleta muskuļos oksidatīvajam stresam ir zināma ietekme uz insulīna rezistences patoģenēzi, jāsecina, ka NO[•] metabolisma regulācijas tālāka izpēte ir nepieciešama, jo pašreiz pieejamie dati nedod iespēju izdarīt viennozīmīgus secinājumus par NO[•] biosintēzes intensitātes ietekmi, jo insulīna rezistenci bieži novēro ne tikai pie 2. tipa cukura diabēta, bet arī pie 1. tipa cukura diabēta.

4.3. Farmakoloģisku preparātu ietekme uz NO[•] veidošanos un glikozes transportētāju ekspresiju dzīvniekiem ar eksperimentālo STZ un HS diabētu

4.3.1. Mildronāta ietekme uz GLUT1 un GLUT4 koncentrāciju nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos

Nelielos klīniskos izmēģinājumos ir novērota mildronāta labvēlīga ietekme uz glikozes metabolismu un diabētisko komplikāciju izpausmēm (Statsenko et al. и др., 2007, Кузнецова и др., 2007; Statsenko et al. и др., 2010; Botabekoba *et al.*, 2004). Lai noskaidrotu iespējamo mildronāta iedarbības mehānismu, mēs pētījām šī preparāta ietekmi uz GLUT1 un GLUT4 ekspresiju diabētisko žurku audos, jo, saskaņā ar literatūras datiem, glikozes transportētāji ir iesaisti diabētisko komplikāciju un insulīna rezistences patoģenēzē (sk. sadaļu 4.2.).

Mēs konstatējām, ka nierēs žurkām ar eksperimentālo STZ un HS diabētu mildronāts normalizē pastiprināto GLUT1 ekspresiju (sk. 3.18. att., 3.19. att., 3.27. att., 3.28. att.). STZ dzīvnieku aknās mildronāts samazināja palielināto GLUT1 proteīna ekspresiju (sk. 3.20.att., 3.21. att.), bet HS modelī tas mildronāts šī proteīna līmeni neietekmēja (sk. 3.25. att., 3.26. att.). Novērtējot aknu bojājuma pakāpi ar HAI indeksa palīdzību, mēs konstatējām, ka STZ modeļa žurkām mildronāts to samazina (sk. 3.22. att.).

Tādējādi jāsecina, ka pie eksperimentālā cukura diabēta, lietojot klīniski atbilstošās devās, mildronātam piemīt spēja samazināt nealkoholiskam steatohepatītam raksturīgās histoloģiskās pārmaiņas aknās. Tā kā nealkoholiskais steatohepatīts ir saistīts ar insulīna rezistenci, šis efekts varētu būt nozīmīgs kā mildronāta hipoglikemizējošā mehānisma sastāvdaļa.

Ņemot vērā GLUT1 hiperekspresijas iesaisti diabētisko komplikāciju patoģenēzē (Brosius *et al.*, 2013), mildronāta normalizējošā iedarbība uz GLUT1 līmeni ir vērtējama kā protektīva. Kaut arī mildronāta ietekme uz GLUT1 ekspresiju diabētiskiem dzīvniekiem nierēs un aknās agrāk nav pētīta, tomēr ir dati, kuri palīdz izprast mūsu novērotos rezultātus. Eksperimentos ar STZ un Goto-Kakizaki diabētiskām žurkām tika konstatēts, ka mildronāts kavē sāpju sliekšņa pazemināšanos žurkām ar diabētisku nervu bojājumu, tātad - bremsē diabētiskās polineuropātijas attīstību (²Sokolovska *et al.*, 2011; Liepinsh *et al.*, 2009). Mēs konstatējām, ka diabētisku žurku nierēs mildronāts normalizē pastiprināto iNOS mRNS ekspresiju (nepublicēti dati). Tas nozīmē, ka mildronāts nomāc iekaisuma procesus nierēs, kurus ir izsaukusi STZ ievadīšana un hiperglikēmija.

Ņemot vērā to, ka oksidatīvais stress un iekaisuma procesi, aktivējot TGF β -1, arī veicina GLUT1 hiperekspresiju (Gnudi *et al.*, 2007), iespējams, ka mildronāts kavē GLUT1 ekspresiju, iedarbojoties uz TGF β -1 aktivācijas mehānismiem.

Cītu pētnieku dati norāda uz mildronāta protektīvajām īpašībām, tas ir – spēju novērst patoloģisku kodola faktora NF κ B ekspresiju azidotimidīna ierosinātos kardiotoksicitātes, neurotoksicitātes un hepatotoksicitātes modeļos. Pēc šo autoru domām, protektīvo efektu nodrošina mildronāta pozitīvā ietekme uz mitohondriālo disfunkciju (Pupure *et al.*, 2008a; Klusa *et al.*, 2013; Klusa *et al.*, 2010).

Ir novērots, ka hronisko hiperglikēmiju pavada hipoksija. Tāpēc daudzi zinātnieki uzskata, ka nieru kanālīšu hipoksija ir nieru bojājuma palaidējmehānisms (Singh *et al.*, 2008). Ņemot vērā to, ka mildronāts uzlabo šūnas metabolismu un samazina mitohondriju bojājuma pakāpi hipoksijas apstākļos (Dambrova *et al.*, 2002), mildronāta antioksidatīvās īpašības arī varētu būt viens no GLUT1 ekspresijas normalizāciju veicinošiem faktoriem pie hiperglikēmijas.

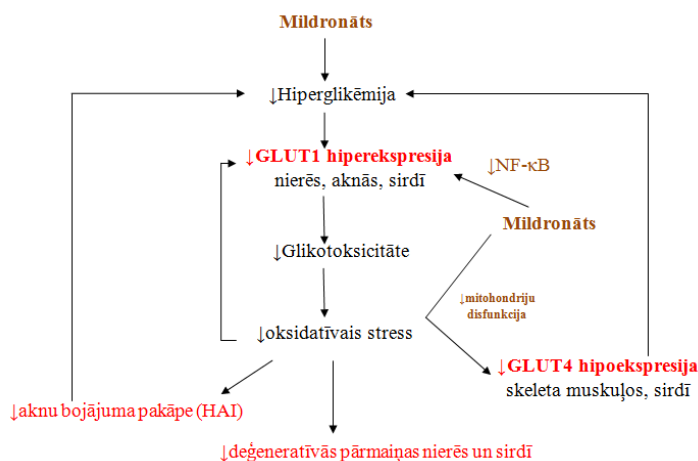
Tādējādi mūsu iegūtie rezultāti par GLUT1 hiperekspresijas samazinājumu nierēs un aknās dzīvnieku STZ inducētā cukura diabēta modeļos papildina iepriekš iegūtos rezultātus par mildronāta labvēlīgo ietekmi uz cukura diabēta izraisītām mikrovaskulārajām komplikācijām.

Mēs novērojām, ka sirdī STZ un HS modeļa dzīvniekiem mildronāts samazina diabēta ietekmē pastiprināto GLUT1 ekspresiju (3.23., 3.24., 3.30. att.). Tāpat mildronāts atjaunoja STZ ietekmē nomākto GLUT4 ekspresiju kardiomiocītos (3.33. att., 3.34. att.). Kopumā šos efektus pie cukura diabēta var uzskatīt par kardioprotektīviem, jo gan GLUT1 hiperekspresija, gan GLUT4 hipoekspresija ir iesaistīta kontraktīlās disfunkcijas patoģenēzē pie diabētiskās kardiopātijas (sk. 4.2.4. sadaļu).

Literatūrā ir daudz datu par mildronāta ietekmi uz sirds funkciju un metabolismu diabētiskiem dzīvniekiem. Ir novērots, ka pēc mildronāta terapijas (200 mg/kg, p.o, 8 nedēļas) diabētiskām Goto-Kakizaki līnijas žurkām koronārajās artērijās uzlabojas asinsrite, kā arī samazinās infarkta apjoms izolētas sirds infarkta modelī (Liepinsh *et al.*, 2009). Turklāt kombinācijā ar metformīnu mildronāts tuklām Zucker žurkām pastiprināja GLUT4, PPAR- α un taukskābju metabolismā iesaistīto gēnu ekspresiju, tādā veidā regulējot miokarda enerģētisko vielmaiņu (Liepinsh *et al.*, 2011).

Ir parādīts, ka mildronāts stimulē insulīn-atkarīgo glikozes patēriņu izolētās peļu sirdīs un pastiprina dažu glikozes metabolismā iesaistīto gēnu un enzīmu ekspresiju, ietekmējot GLUT4, heksokināzes-2 un insulīna receptoru līmeni un aktivitāti (Liepinsh *et al.*, 2008). Tā kā mildronāta ietekmē STZ žurkām skeleta muskuļos mēs arī novērojām GLUT4 ekspresijas atjaunošanos, tā varētu būt viena no preparāta hipoglikemizējošā mehānisma sastāvdaļām (3.32. att.).

Tādējādi mildronāta pozitīvā ietekme uz insulīna sensitivitāti izpaužas gan veseliem dzīvniekiem (pelēm), gan arī mērena insulīna deficīta gadījumā (Zucker diabētiskām žurkām), un tāpat arī pie izteikta insulīna deficīta (STZ žurkām). GLUT4 ekspresijas veicināšana varētu būt daļa no mildronāta kardioprotektīvā un hipoglikemizējošā efekta, kas ir īpaši svarīgi diabēta apstākļos, kad kardiovaskulāro patoloģiju risks ir palielināts.



4.4.att. Mildronāta ietekme uz GLUT1 un GLUT4 ekspresiju dažādos orgānos, un tās indukcijas iespējamie mehānismi. Mildronāts pazemina glikozes līmeni, veicinot glikolīzi un potencējot insulīna darbību. Mildronāta spēja samazināt GLUT1 ekspresiju un veicināt GLUT4 ekspresiju varētu būt saistīta ar preparāta protektīvo iedarbību uz mitohondrijiem, mazinot oksidatīvo stresu, kā arī uz iekaisuma signālceļiem (tai skaitā caur NF- κ B)

Liepiņš ar kolēģiem konstatēja, ka veselām pelēm mildronāts neietekmē GLUT1 proteīna ekspresiju sirdī (Liepinsh *et al.*, 2008). Kaut arī diabētisko dzīvnieku sirdī GLUT1 ekspresija iepriekš nav pētīta, tomēr varēja sagaidīt, ka, uzlabojot miokarda enerģētisko metabolismu, mildronāts samazinās diabēta apstākļiem raksturīgo oksidatīvo stresu un

GLUT1 hiperekspresiju. Kā redzams 4.4. attēlā, mēs patiešām novērojām GLUT1 un GLUT4 ekspresijas izmaiņas mildronāta ietekmē, kuras korelēja ar orgānu histoloģiskajām pārmaiņām.

4.3.2. Mildronāta kombināciju ar metformīnu vai glibenklamīdu ietekme uz GLUT1 ekspresiju

Līdzīgi kā situācijā ar glikozes un lipīdu metabolisma parametriem, mēs nenovērojām mildronāta un metformīna vai mildronāta un glibenklamīda aditīvus efektus attiecībā uz GLUT1 ekspresiju. Tomēr dažos gadījumos bija redzama kombinācijas efekta atšķirības, salīdzinājumā ar individuāli ievadīto preparātu iedarbību.

Tā, piemēram, STZ modeļa dzīvnieku sirdīs, salīdzinot ar STZ kontroli, GLUT1 ekspresija glibenklamīda ietekmē nemainījās, bet, ievadot glibenklamīdu kombinācijā ar mildronātu, GLUT1 ekspresija normalizējās - līdzīgi tam, kā to novērojām mildronāta grupā (3.23. att.). Tādējādi šajā kombinācijā dominēja mildronāta efekts uz GLUT1 ekspresiju sirdī.

Interesants ir arī piemērs ar GLUT1 mRNS ekspresiju HS modeļa dzīvnieku sirdīs. Ievadot eksperimentālā HS diabēta žurkām metformīnu, mRNS ekspresija tika izteikti nomākta. To pašu novēroja arī metformīna kombinācijai ar mildronātu. Savukārt mildronātam *per se* ietekmes uz GLUT1 mRNS nebija (3.29. att.). Var secināt, ka šajā gadījumā kombinācijas efektu uz GLUT1 mRNS noteica metformīns.

Ņemot vērā to, ka GLUT1 ekspresija, šķiet, visvairāk ir atkarīga no šūnas oksidatīvā stresa stāvokļa un glikozes līmeņa asinsritē (Heilig *et al.*, 2013), GLUT1 ekspresijas izmaiņas ierobežo šo parametru svārstību diapazons. Proti, ja tie pietuvinās normas robežai, iespējams, GLUT1 ekspresijas izmaiņas preparātu ietekmē ir nelielas, un tāpēc ir vāji pamanāmas. Līdz ar to, ja kāds no pielietotajiem preparātiem pats par sevi izsauc labi izteiktu efektu, otra preparāta pievienošana šo efektu papildus potencēt nespēj. Tāpat arī gadījumos, kad glikēmija nav īpaši izteikta, sagaidāms, ka mazākas būs arī GLUT1 ekspresijas izmaiņas. Šim pieņēmumam atbilst arī mūsu iegūtie rezultāti, kas liecina par to, ka vienos un tajos pašos audos HS modeļa dzīvniekiem ir mazāk izteikta GLUT1 ekspresija, salīdzinot ar STZ modeļa dzīvniekiem, kam pašiem par sevi arī diabēta izpausmes ir smagākas nekā HS dzīvniekiem.

4.3.3. Glibenklamīda ietekme uz GLUT1 un GLUT4 ekspresiju nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos

Mēs novērojām, ka eksperimentālā STZ diabēta modeļa dzīvniekiem glibenklamīds nierēs samazina STZ izraisīto GLUT1 ekspresijas pieaugumu kā gēna, tā proteīna līmenī. Turpretī HS modeļa dzīvniekiem GLUT1 saturs nemainījās (3.18. att., 3.19. att.). Iepriekš

tika parādīts, ka glikozes koncentrāciju pazeminošais sulfonilurīnvielu grupas preparāts tolazamīds *in vitro* paaugstinātas glikozes līmeņa apstākļos pastiprina GLUT1 ekspresiju mezangiālo šūnu membrānās (Cortes *et al.*, 1998). Tomēr mums neizdevās atrast datus par sulfonilurīnvielu ietekmi uz GLUT1 ekspresiju nierēs diabēta modeļos *in vivo*.

Iepriekš tika parādīts, ka sulfonilurīnvielas pastiprina GLUT1 ekspresiju kardiomiocītu šūnu kultūrās (Bähr *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1998, Eckel *et al.*, 1996). Diemžēl literatūrā nav datu par sulfonilurīnvielu ietekmi uz GLUT1 ekspresiju pie cukura diabēta miokardā *in vivo*. Tāpēc jāsecina, ka sulfonilurīnvielu ietekme uz GLUT1 līmeni *in vivo* un tā nozīmi miokarda metabolismā nav pietiekami izpētīta.

Savā darbā mēs noskaidrojām, ka STZ modeļa žurkām glibenklamīds samazina GLUT1 mRNS līmeni sirdī, bet neietekmē diabēta inducēto pastiprināto GLUT1 proteīna ekspresiju (3.23.att., 3.25. att). HS žurkām efekts bija tieši pretējs – tika novērota palielināta GLUT1 mRNS ekspresija, savukārt GLUT1 proteīna ekspresijas līmeni glibenklamīds samazināja (3.29. att., 3.30. att.).

Mēs atradām, ka STZ modeļa dzīvnieku aknās GLUT1 proteīna (bet ne mRNS) ekspresija ir palielināta, un glibenklamīds to samazina. Savukārt HS modelī šādu efektu nenovērojām (3.20. att., 3.25. att.). Tāpat mēs konstatējām, ka glibenklamīda ievadīšana samazina aknu bojājuma izpausmes STZ modeļa dzīvniekiem (3.22. att.).

Literatūras datu analīze liecina, ka ir novērota gan negatīva (Kato *et al.*, 2001;), gan pozitīva (Wiggins *et al.*, 1992, Broadway *et al.*, 1995) glibenklamīda ietekme uz lipīdu metabolismu aknās cilvēkiem. Tāpēc GLUT1 ekspresijas atšķirības STZ un HS modeļa dzīvniekiem glibenklamīda ievadīšanas rezultātā varētu skaidrot ar dažādu insulīna līmeni abos modeļos. Tā kā GLUT1 daļēji atkarīgs no insulīna, ar to var pamatot, kāpēc HS žurkām glibenklamīda ietekmē GLUT1 izteiktāku ekspresiju novēro tikai nierēs (Bouché *et al.*, 2004).

Viens no GLUT1 ekspresiju ietekmējošiem faktoriem ir arī glikozes līmenis (Heilig *et al.*, 2013). Mūsu rezultāti liecina, ka HS dzīvniekiem glibenklamīds glikozes koncentrāciju nesamazina un neietekmē arī HbA1c% saturu (3.17. att.). Tas korelē ar mūsu novērojumiem, ka glibenklamīds GLUT1 ekspresijas līmeni HS diabēta modeļa dzīvniekiem nesamazina.

Toties STZ žurkām, kurām diabēta izpausmes ir daudz izteiktākas kā HS modeļa dzīvniekiem, ar glibenklamīdu ārstētām žurkām mēs novērojām GLUT1 ekspresijas samazinājumu, kaut arī tika novērots tikai daļējs glikozes metabolisma regulācijas uzlabojums.

Šādu iedarbību var skaidrot ar dažādiem mehānismiem. Iepriekš tika parādīts, ka KATP kanāli modulē kā bazālo, tā arī insulīna vai augstas glikozes stimulēto glikozes transportu (Wasada *et al.*, 2001). Tomēr šī efekta mehānismi netika noskaidroti. Tomēr var

sagaidīt, ka KATP kanālu atvēršana stimulēs GLUT1 ar tam sekojošu nātrija un glikozes ieplūšanu šūnā. Šo kanālu blokāde glibenklamīda ietekmē, savukārt, var samazināt GLUT1 ekspresiju ar atgriezeniskās saites palīdzību.

Glibenklamīdam novērotais GLUT1 ekspresiju pazeminošais efekts varētu būt saistīts ar uzlaboto glikozes utilizācijas un enerģijas ražošanas efektivitāti. Ir parādīts, ka, atverot anjonu kanālu un veicinot Cl^- jonu ieplūšanu mitohondrijos, glibenklamīds izraisa mitohondriju membrānas caurlaidības pieaugumu. Cl^- koncentrācijas pieaugums, savukārt, veicina K^+ iekļūšanu mitohondrijos (Cl^-/K^+ ko-transport) un mitohondriālo elpošanu (Fernandes *et al.*, 2004). Tādējādi uzlabotā šūnas apgāde ar enerģiju var veicināt arī GLUT1 ekspresijas normalizāciju (Wasada *et al.*, 2001).

Pētot glibenklamīda ietekmi uz GLUT4 ekspresiju skeleta muskuļos un sirdī, mēs konstatējām, ka glibenklamīds nespēj atjaunot nomākto GLUT4 ekspresiju STZ dzīvnieku skeleta muskuļos, taču veicina to miokardā (3.32. att., 3.34. att.). Jāatzīmē, ka glibenklamīds - kā vienīgais no trijiem mūsu pētītajiem preparātiem- palielināja arī insulīna koncentrāciju STZ modeļa dzīvniekiem. Tomēr nav pilnībā skaidrs, kāpēc glibenklamīda ietekme uz GLUT4 līmeni sirdī un muskuļos atšķiras.

Pēc literatūras datiem dzīvnieku diabēta un insulīna rezistences modeļos sulfonilurīnvielas GLUT4 ekspresiju skeleta muskuļos neiespaido, un neizmaina to arī muskuļu šūnu kultūrās (Kern *et al.*, 1993; Tsiani *et al.*, 1995; Tosegawa *et al.*, 1999). Tajā pašā laikā ir parādīts, ka miocītos sulfonilurīnvielas veicina GLUT4 translokāciju no intracelulārā kompartimenta uz šūnas membrānām, kā arī stimulē GLUT4 ekspresiju muskuļos diabētiskiem dzīvniekiem (Müller *et al.*, 1995; Sudraham *et al.*, 2013). Kardiomiocītu kultūrās šīs preparātu grupas ietekmē tika novērota GLUT4 pastiprināta ekspresija (Nguyen *et al.*, 1998).

Glibenklamīda un citu sulfonilurīnvielu stimulējošais efekts uz GLUT4 varētu būt saistīts ar insulīna sekrēcijas veicināšanu, kaut tiek ziņots arī par šīs medikamentu grupas ekstrapankreātiskiem efektiem (Müller *et al.*, 1996). Tādējādi glibenklamīda molekulārajiem efektiem uz diabētisko komplikāciju patoģenēzi ir nepieciešama tālāka izpēte.

4.3.4. Metformīna ietekme uz GLUT1 un GLUT4 ekspresiju nierēs, sirdī, aknās un skeleta muskuļos

Metformīna ietekme uz GLUT1 ekspresiju nierēs ir maz pētīta. Pēc literatūras datiem metformīna ievadīšana mezangiālo šūnu kultūrā GLUT1 ekspresiju šo šūnu membrānās

nepalielina (Cortes *et al.*, 1998). Savukārt publicētus datus par metformīna efektiem uz GLUT1 ekspresiju nierēs diabēta modeļos *in vivo* mums atrast neizdevās.

Savā pētījumā mēs novērojām, ka gan STZ, gan HS modeļa žurkām metformīns pazemina GLUT1 ekspresiju nierēs kā mRNS, tā arī proteīna līmenī (sk. 3.18.-3.19. att.; 3.27.-3.28. att.).

Mēs novērojām, ka STZ modeļa dzīvnieku aknās metformīns normalizē paaugstināto GLUT1 ekspresiju proteīna līmenī (sk. 3.20. att). Pēc citu pētnieku datiem veselām žurkām (Hirode *et al.*, 2008) vai diabētiskām db/db pelēm (Heishi *et al.*, 2008) metformīns GLUT1 gēna ekspresiju aknās neietekmē. Mūsu rezultāti liecina, ka STZ modeļa dzīvniekiem metformīns samazina GLUT1 proteīna ekspresiju arī sirdī (sk. 3.23. att.). Publicētie dati liecina, ka metformīns nestimulē GLUT1 ekspresiju kardiomiocītu šūnu kultūrās (Yang *et al.*, 2006), bet izraisa GLUT1 translokāciju no intracelulārās vides uz plazmatisko membrānu (Fischer *et al.*, 1995).

Mēs novērojām arī, ka STZ modeļa dzīvniekiem metformīns palielina samazināto GLUT4 ekspresiju skeleta muskuļos un miokardā. Skeleta muskuļos GLUT4 proteīna ekspresija pārsniedza pat veseliem dzīvniekiem raksturīgo. Šie rezultāti saskan ar iepriekš publicētajiem datiem par metformīna stimulējošo iedarbību uz GLUT4 ekspresiju (Fischer *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2006).

Diskutējot par iespējamiem mehānismiem, kādā veidā metformīns ietekmē GLUT1 un GLUT4 ekspresiju, jāņem vērā daži fakti. Ir dati par to, ka nieru kanālīšu šūnu kultūrās metformīns samazina TGF- β , angiotenzīna II, aldosterona, augstas glikozes koncentrācijas vai albumīna izraisīto oksidatīvo stresu. Ir zināms, ka šie paši faktori ir arī GLUT1 hiperekspresijas cēloņi un sekas, un ir pamats domāt, ka metformīns ietekmē GLUT1 ekspresiju nepastarpināti.

Literatūrā ir dati par to, ka metformīns aktivē AMPK un GLUT4 translokāciju uz šūnas membrānām. Tāpēc, līdztekus glikoneoģenēzes inhibīcijai, šo receptoru iesaiste glikozes transporta un utilizācijas procesos var noteikt metformīna antidiabētisko aktivitāti (Lee *et al.*, 2012). Arī metformīna nefroprotektīvo efektu saista ar AMPK aktivāciju (Lee *et al.*, 2013, Hardie *et al.*, 2006). Daudzos darbos dzīvnieku diabēta modeļos ir parādīts, ka metformīns samazina oksidatīvā stresa marķierus nierēs (Nasri *et al.*, 2013, Alheider *et al.*, 2011). Oksidatīvais stress nieru audos rodas intracelulārās hiperglikēmijas dēļ, jo pie izteiktas hiperglikēmijas insulīn-neatkarīgajos audos šūnās glikoze ieplūst nekontrolēti. Tas notiek arī ar GLUT1 palīdzību. Tāpēc ir iespējams, ka, samazinot hiperglikēmiju, metformīns nomāc šī glikozes transportiera ekspresiju, un, tādējādi, arī oksidatīvā stresa marķierus.

No otras puses, oksidatīvais stress *per se* veicina GLUT1 ekspresiju (Gnudi *et al.*, 2007), tādējādi oksidatīvajam stresam samazinoties, arī GLUT1 ekspresijas līmenis kritīsies. Saskaņā ar šo pieņēmumu, literatūrā prevalē dati par labvēlīgiem metformīna efektiem uz diabētisko kardiomiopātiju (Andersson *et al.*, 2010, Forsheron *et al.*, 2009, Apaijai *et al.*, 2012).

Tādējādi mūsu iegūtie rezultāti papildina publicētos datus par metformīna iedarbības mehānismiem, kuri varētu būt labvēlīgi pie diabētiskām komplikācijām.

4.3.5. 1,4-Dihidropiridīnu ietekme uz NO[•] veidošanos dažādos orgānos, kā arī uz iNOS, eNOS, XOR un GLUT1 ekspresiju nierēs

Ņemot vērā datus par 1,4-dihidropiridīnu grupas preparātu (1,4-DHP) antioksidatīvajām īpašībām, mēs sagaidījām, ka tiem varētu būt labvēlīga ietekme uz diabētisko komplikāciju patoģenēzi, īpaši NO[•] pārprodukciju. Mēs konstatējām, ka 1,4-DHP - cerebrokrasta, etaftorona un fenoflorona - ievadīšana STZ modeļa žurkām samazina diabēta izraisīto NO[•] koncentrācijas pieaugumu nierēs, aknās, asinīs un skeleta muskuļos, kā arī taukaudos (3.46. att.).

Lai noskaidrotu iespējamus mehānismus, kā 1,4-DHP ietekmē NO[•] biosintēzi, mēs noteicām etaftorona ietekmi uz eNOS, iNOS un XOR ekspresiju STZ žurku nierēs, kā arī AV-153 ietekmi uz GLUT1 saturu nierēs. Atbilstoši mūsu iegūtajiem datiem, AV-153 samazina diabētiska stāvokļa izraisītu GLUT1 hiperekspresiju STZ žurku nierēs (sk. 3.35.att.). Tāpat mēs konstatējām, ka etaftorons spēj samazināt pastiprināto iNOS un XOR ekspresiju, kā arī normalizēt samazināto eNOS ekspresiju (sk. 3.47.att.-3.52.att.).

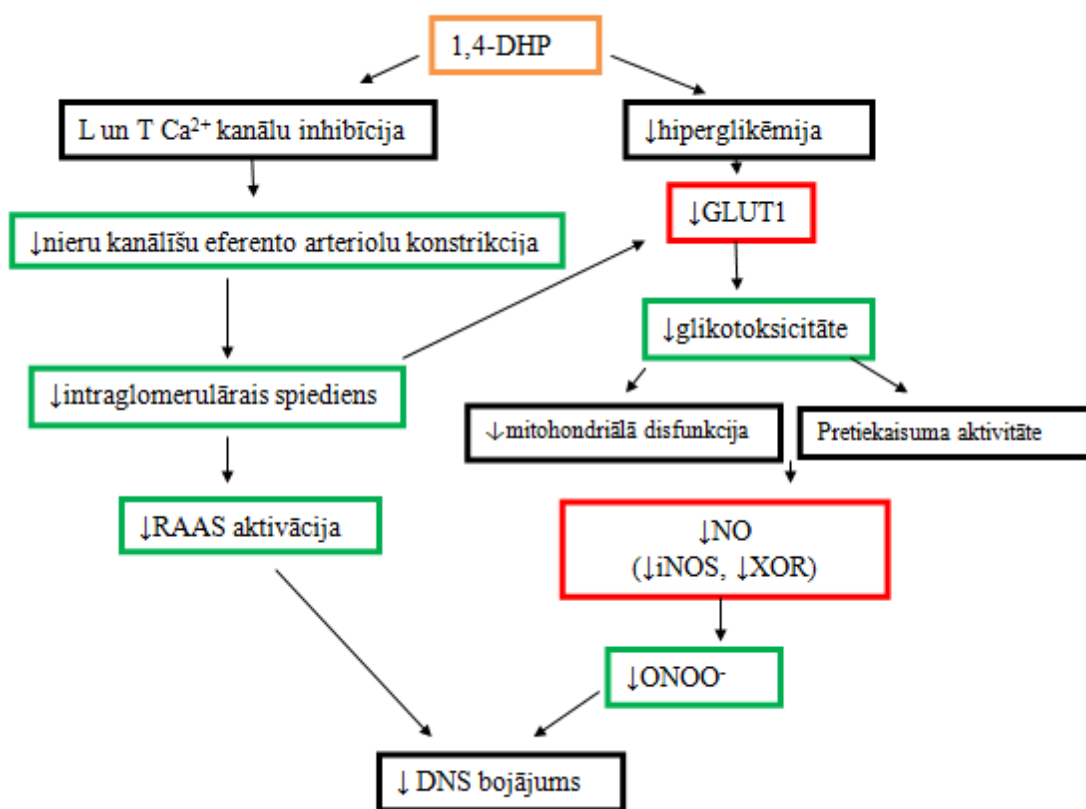
Tādējādi šķiet, ka 1,4-DHP ietekmē NO[•] koncentrāciju diabētisko dzīvnieku nierēs, inhibējot NO[•] biosintēzi caur NOS-atkarīgiem un NOS-neatkarīgiem ceļiem, kā arī samazina glikotoksicitāti, ierobežojot GLUT1 ekspresiju.

Mūsu iegūtie rezultāti korelē ar iepriekš publicētajiem citu zinātnieku datiem. Pirmkārt, ir parādīts, ka 1,4-DHP piemīt hipoglikemizējošs efekts (Briede *et al.*, 2004; Briede *et al.*, 2007), ko pavada intracelulārās hiperglikēmijas un glikotoksicitātes samazināšanās. Otrkārt, ir konstatēts, ka cerebrokrasts inhibē L- un T-tipa kalcija kanālus. Tādējādi tas varētu novērst vazokonstrikciju nieru eferentajās arteriolās un aldosterona sekrēciju (Briede *et al.*, 2008). Šādā veidā cerebrokrasts un citi 1,4-DHP varētu samazināt intrarenālo asinsplūsmu, samazinot intraglomerulāro spiedienu, t.i. – ietekmēt faktorus, kuri ir iesaistīti diabētiskās nefropātijas attīstībā.

Treškārt, ir aprakstīta 1,4-DHP pozitīvā iedarbība uz mitohondriālo disfunkciju. Piemēram, ir ziņots, ka cerebrokrastam išēmijas apstākļos piemīt kardioprotektīvas un neiroprotektīvas īpašības, kurām varētu būt pozitīva ietekme uz diabēta attīstību (Briede *et al.*, 2007; Briede *et al.*, 2008). Tāpat azidotimidīna neuro- un kardiotoksicitātes modeļos cerebrokrasts samazināja NF-kappaB, p65 un kaspāzes-3 ekspresiju, kas norāda uz šī savienojuma pretiekaisuma un antiapoptotisko iedarbību, kā arī mitohondriālās disfunkcijas samazināšanu oksidatīvā stresa apstākļos (Pupure *et al.*, 2008b).

Ceturtkārt, ir dati par 1,4-DHP piemītošām DNS reparāciju veicinošām īpašībām. Šūnu kultūrās tika pētīta dihidropiridīna AV153 efekts uz DNS pārrāvumu reparāciju. Preparāts uzrādīja akūtu efektu, palielinot PARP līmeni, un paralēli pieauga arī DNS ķēžu pārrāvumu savienošanas efektivitāte un ātrums (Ryabokon *et al.*, 2008).

Tādējādi, 1,4-DHP varētu mazināt oksidatīvo stresu un tā izraisīto NO^{*} hiperprodukciju glomerulos pēc vairākiem mehānismiem. Kopumā mūsu un citu zinātnieku dati norāda uz tādām 1,4-DHP īpašībām, kuras varētu būt nozīmīgas diabēta komplikāciju ārstēšanai (sk. 4.5.att.).



4.5. att. 1,4-DHP darbības iespējamie molekulārie mehānismi diabētiskā nefropātijas protekcijā. Sarkans rāmītis – šajā pētījumā novērotie rezultāti; zaļš rāmītis – hipotētisks efekts; melns rāmītis – citu pētnieku dati par 1,4-DHP

Tā kā 1,4-DHP ietekme uz NO[•] biosintēzi pie diabēta nav pētīta, mēs izanalizējām literatūras datus par klīnikā izmantojamo dihidropiridīnu efektiem uz NO[•] koncentrāciju un oksidatīvo stresu. Ir parādīts, ka amlopidīns mazina iNOS gēna ekspresiju, nitrotirozīna līmeni un NADPH oksidāzes aktivitāti, kavē proinflatōro proteīnu ekspresiju un inhibē ROS signālpārneses ceļus endotēlijā (Toma *et al.*, 2011). Ir novērots, ka azelnidipīns uzlabo diabētisko čūlu dzīšanu un samazina kardiālo disfunkciju (Bagheri *et al.*, 2011; Kain *et al.*, 2010). Nifedipīns novērš endotēlija disfunkciju, inhibējot eNOS atjūgšanu un fosforilējot eNOS, un tāpēc tas tiek uzskatīts par perspektīvu preparātu diabētisko kardiovaskulāro komplikāciju ārstēšanā (Yamamoto *et al.*, 2010).

Tādējādi mūsu iegūtie rezultāti par 1,4-DHP grupas savienojumu antioksidatīvajiem efektiem saskan ar literatūras datiem par klīnikā izmantojamo 1,4-DHP iedarbību. Tomēr jāņem vērā, ka mūsu darbā izmantotie 1,4-DHP nav spēcīgi kalcija kanālu antagonisti, un tādējādi to molekulārie darbības mehānismi varētu būt atšķirīgi no klasiskajiem dihidropiridīnu grupas preparātiem postulētajiem.

4.4. NO[•] un tā metabolītu biosintēze 2. tipa cukura diabēta slimniekiem

4.4.1. NO[•], NO₂⁻ un NO₃⁻ koncentrācijas cukura diabēta pacientiem

Veicot pētījumus klīnikā, mēs novērojām, ka pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu NO[•] un tā metabolītu - NO₂⁻ un NO₃⁻ koncentrācija ir augstāka nekā kontroles grupas pacientiem (3.53. att., 3.54.att). Apkopojot literatūru, konstatējām, ka tajos gadījumos, kad diabēta komplikācijas vēl nav tālu progresējušas, gan eksperimentālajos diabēta modeļos, gan arī cilvēkiem ar 1. un 2. tipa cukura diabētu novēro pastiprinātu NO[•] sintēzi. Tas nozīmē, ka mūsu iegūtie rezultāti par NO[•] biosintēzes pastiprināšanos atbilst literatūras datiem, jo mūsu pacientu diabēta stāžs nebija pārāk liels (65% pacientu diabēta stāžs bija <10 gadiem).

Publicētie pētījumu rezultāti par iNOS un eNOS lomu NO[•] biosintēzes procesā diabēta sākotnējās attīstības fāzēs ir pretrunīgi (Veelken *et al.*, 2000, Stadler *et al.*, 2008). Savukārt, pie tālu progresējušām diabēta komplikācijām, novēro samazinātu NO[•] koncentrāciju (Tessari *et al.*, 2010).

Patiešām, pastiprināta intrarenāla NO[•] sintēze varētu izskaidrot glomerulārās hiperfiltrācijas fenomenu, ko novēro cukura diabēta pacientiem pirmajos gados pēc slimības

parādīšanās (Möllsten et al., 2006; Chiarelli et al., 2000; Forbes et al., 2008). Mūsu pētījumā eksperimentālajā grupā 65% pacientu diabēta stāžs bija <10 gadiem, un vidējais GFĀ šajā grupā bija lielāks, nekā kontroles grupā. Pacientu īpatsvars ar diabētisko mikroalbuminūriju bija 35%. Pētījumā nepiedalījās neviens pacients, kuram būtu nepieciešama nieru aizstājējterapija, kā arī ar makroalbuminūriju bija tikai viens pacients. Tādējādi, mūsu iegūtie rezultāti korelē ar agrāk publicētajiem datiem par diabēta stāža ietekmi uz NO[•] sintēzes izmaiņām.

Atšķirībā no literatūrā atspoguļotajiem pētījumiem, mēs pacientiem vienlaicīgi noteicām gan NO[•], gan arī NO₂⁻ un NO₃⁻ koncentrāciju. Tas ir būtiski tāpēc, ka pēdējā laikā ir parādījušies dati par to, ka NO₂⁻ un NO₃⁻ var kalpot kā NO[•] resintēzes avots organismā, un tie nav uzskatāmi tikai par stabilajiem NO[•] metabolītiem.

Literatūrā mēs neatradām datus par EPR metodes pielietošanu NO[•] noteikšanai pacientiem ar cukura diabētu. Kaut arī NO[•] radikāli var noteikt arī ar amperometriskiem sensoriem *in situ*, un ir ziņots par tās pielietošanu NO[•] tiešai noteikšanai kardiovaskulārajā sistēmā (Sun et al., 2003), tomēr datu par šīs metodes pielietojamību NO[•] noteikšanai pacientiem ar cukura diabētu nav.

Pētījumu par NO₂⁻ un NO₃⁻, bet ne NO[•], koncentrācijas izmaiņām pie cukura diabēta ir diezgan daudz. Paaugstināta NO₂⁻ un NO₃⁻ koncentrācija pieaugušajiem un bērniem diabētiskās nefropātijas sākumstadijā ir novērota serumā un urīnā (Chiarelli et al., 2000; Savino et al., 2006; Apakkan Aksun et al., 2003), bet samazināts NO₂⁻ un NO₃⁻ saturs – pacientiem ar diabētisko nefropātiju un nieru aizstājējterapiju (Tessari et al., 2010 un atsaucetajā).

Pētot NO[•] un NO₂⁻/NO₃⁻ asociāciju pacientiem ar cukura diabētu un bez tā, mēs konstatējām, ka pacientiem ar cukura diabētu NO[•] koncentrācija ir apgriezti proporcionāla NO₂⁻/NO₃⁻ koncentrācijai (sk. 3.55. att.). Kontroles pacientiem šādu fenomenu nenovēro. Mēs uzskatām, ka šis atradums norāda uz to, ka diabēta apstākļos notiek pastiprināta NO₂⁻/NO₃⁻ reducēšanās līdz NO[•] ksantīna oksido-reduktāzes vai citu fermentu ietekmē. Šāds skaidrojums mūsu rezultātiem šķiet loģisks, ņemot vērā vēl arī dažu citu pētījumu datus: vaskulāra bojājuma gadījumā NO[•] sintēze no arginīna samazinās, bet pieaug ksantīna oksido-reduktāzes ekspresija endotēlijā un nitrītjona konversija par NO[•]. Tādējādi, ja nitrītjons kļūst par izejvielu NO[•] biosintēzei, NO[•] koncentrācijas palielināšanos pavada NO₂⁻/NO₃⁻ koncentrācijas samazināšanās (Alef et al., 2011).

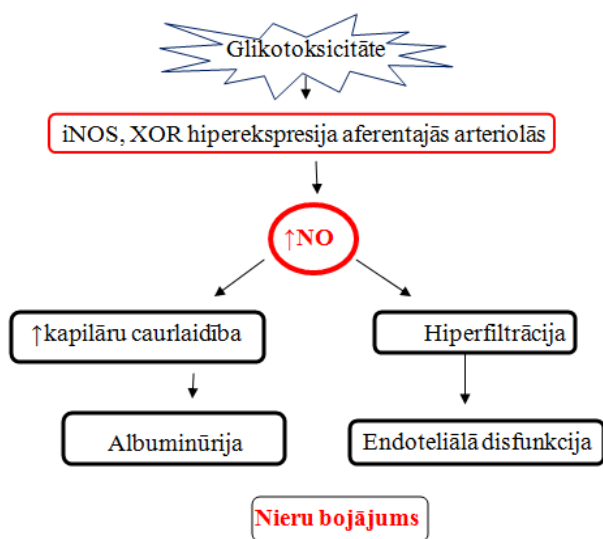
Cits iespējamais variants varētu būtu $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ekskrecijas samazināšanās. Tomēr šis pieņēmums mums šķiet mazāk ticams, jo ir novērots, ka diabēta pacientiem $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ koncentrācija urīnā ir lielāka, nekā veseliem pacientiem, un to pašu novēro arī serumā (Apakkan Aksun et al., 2003). Otrkārt, mūsu pētījumā diabēta pacientu grupā, salīdzinājumā ar kontroles grupu, bija ievērojami paaugstināts GFĀ. Tādējādi ir maz ticams, ka nitrījoni varētu uzkrāties un kalpot kā avots NO^{\cdot} biosintēzes pieaugumam.

4.4.2. NO^{\cdot} , NO_2^- un NO_3^- koncentrācijas korelācija ar glomerulārās filtrācijas ātrumu, HbA1c% un mikroalbuminūriju

Šajā pētījumā mēs konstatējām, ka NO^{\cdot} un $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ korelē ar glomerulārās filtrācijas ātrumu (GFĀ) un HbA1c% pieaugumu, kā arī mikroalbuminūriju (sk. 3.57.att.-3.59.att.). Tādējādi, var secināt, ka NO^{\cdot} metabolisms ir saistīts ar diabētiskās nefropātijas attīstību.

Citi pētnieki arī ir novērojuši HbA1c% asociāciju ar pastiprinātu intrarenālo asinsriti un NO^{\cdot} metabolītu ekskreciju (Schneider *et al.*, 2013). Iespējams, ka pieaugot NO^{\cdot} un tā metabolītu koncentrācijai nierēs, GFĀ palielinās. NO^{\cdot} izraisītais nitrozaatīvais stress izraisa pastiprinātu kapilāru caurlaidību nierēs, un tādējādi veicina mikroalbuminūriju (Chiarelli et al., 2000). Iespējamais skaidrojums tam, kāds varētu būt NO^{\cdot} iesaistīšanās mehānisms diabētiskās nefropātijas hiperfiltrācijas fāzē, ir sniegts 4.6. attēlā.

Ņemot vērā mazo pacientu kopskaitu pētījumā un nelielo tādu pacientu īpatsvaru, kam novēroja izteiktu mikroalbuminūriju, NO^{\cdot} un tā metabolītu koncentrācijas izmaiņu korelāciju analīzi ar albuminūriju, HbA1c% un GFĀ mēs veicām visiem pētījumā iekļautiem pacientiem.



4.6. att. NO^{\cdot} iespējamā iesaistīšanās diabētiskās nefropātijas hiperfiltrācijas fāzē

4.4.3. NO[•], NO₂⁻ un NO₃⁻ koncentrācijas korelācija ar diabēta stāžu un diabētiskām komplikācijām, kā arī diabēta ārstēšanas veidiem pētījumu grupā

Ņemot vērā pierādīto korelāciju starp NO[•], NO₂⁻ /NO₃⁻ un HbA1c%, sagaidījām, ka novērosim arī šo metabolītu saistību ar diabēta stāžu un diabētisko komplikāciju biežumu pētījumu grupā. Tomēr šādu asociāciju konstatēt neizdevās. Tādus datus neatradām arī literatūrā, jo pārsvarā pētījumos par NO₂⁻/NO₃⁻ koncentrācijas asociāciju ar nefropātijas pakāpi diabēta stāžs pacientu grupās ar vai bez mikroalbuminūrijas ir bijis vienāds.

Šajā pētījumā mēs nenovērojām statistiski ticamu NO[•] metabolītu koncentrācijas izmaiņu saistību ar kādu no diabēta ārstēšanas veidiem, kaut gan ir ziņojumi, ka tāda ietekme varētu būt. Piemēram, ir dati par to, ka metformīns veicina NO[•] sintēzi caur AMPK atkarīgo mehānismu (Davis et al., 2006; Zhang et al., 2011). Arī insulīns, vismaz trombocītos, var veicināt NO[•] sintēzi, (Ray, 2012).

Mūsu iegūtos rezultātus varētu interpretēt divējādi: pirmkārt, asociācija netika atrasta tāpēc, ka pētījumā bija par maz pacientu statistiski ticamu noviržu konstatēšanai ; otrkārt, NO[•] metabolītu koncentrācijas izmaiņas, diabētam attīstīstoties, iespējams, ir ļoti individuāla – tā var būt atkarīga no tā, cik ātri pacientam progresē endoteliālā disfunkcija, kā arī svarīga ir NO[•], NO₂⁻ /NO₃⁻ attiecība konkrētajam pacientam.

To, ka diabētiskās nefropātijas asociāciju ar NO[•] metabolismu iedzimtība patiešām ietekmē, ir ziņots vairāku pētnieku publikācijās. (Möllsten et al., 2006; Ezzidi et al., 2008; El-Din Bessa et al., 2011). Katrā gadījumā, lai izdarītu viennozīmīgus secinājumus par NO[•] metabolītu asociāciju ar diabētisko komplikāciju skaitu/pakāpi, ir nepieciešami papildus pētījumi ar daudz lielākām pacientu grupām.

4.4.4. NO[•], NO₂⁻ un NO₃⁻ koncentrācijas korelācija ar arteriālo hipertensiju, koronāro sirds slimību, smēķēšanas ieradumu, nespecifisko radiācijas ietekmi, kardiovaskulārā profila terapiju, asins lipīdu frakcijām un C-peptīda līmeni pacientiem

Lai pārlicinātos, vai mūsu iegūtie rezultāti par NO[•], NO₂⁻ un NO₃⁻ koncentrāciju atšķirību pētījumu un kontroles grupās, kā arī šo rādītāju korelācija ar albuminūriju, HbA1c% un GFĀ atbilst diabēta izraisītajām izmaiņām, mēs analizējām arī NO[•] metabolītu iespējamo asociāciju ar citiem faktoriem, kuriem bija pakļauti pacienti gan kontroles, gan pētījumu

grupā. Tādi faktori kā hipertensija, KSS, smēķēšana un hiperlipidēmija ietekmē endotēliju, bet endoteliālā disfunkcija ir saistīta ar izmaiņām NO[•] metabolismā (Alef et al., 2012).

Ir zināms, ka kardiovaskulārā profila saslimšanu terapija ar dažādiem sirds-asinsvadu līdzekļiem arī var ietekmēt NO[•] līmeni pacientu organismā. Ir ziņojumi par hipotensīvā līdzekļa enalaprila un citu ACEI stimulējošo ietekmi uz NOS ekspresiju (Marzetti et al., 2012). *In vitro* ir novērots, ka aspirīns veicina eNOS ekspresiju endotēlijā (Ou et al., 2012). Interesanti dati ir iegūti par C-peptīda lomu diabētiskās nefropātijas attīstībā. Jaunāko pētījumu dati liecina, ka C-peptīdam piemīt hormonālā aktivitāte, jo tas, saistoties pie specifiskiem receptoriem endotēlijā, ierosina singnālkaskādes, kas var ietekmēt arī eNOS ekspresiju (Hills et al., 2010).

Literatūrā ir dati par TNF-alpha, IL-6, IL-10 un iNOS ekspresijas pieaugumu radiācijas ietekmē dažādos smadzeņu apvidos. Šo neuro-inflamatoro atbildi saista ar nervu sistēmas darbības traucējumiem. Ir dati arī par NO[•] deficītu radiācijai pakļautu dzīvnieku lielajos asinsvados. Tomēr precīzu datu par NO[•] metabolismu radiācijai pakļautajiem cilvēkiem nav (Lestaevel et al., 2008). Tā kā mūsu pētījumā kontroles grupā 47% pacientu bija pakļauti radiācijas ietekmei Černobiļas avārijas seku likvidācijas laikā, mēs izpētījām, bet nekonstatējām nekādu šī faktora ietekmi uz NO[•] un tā metabolītiem. Apkopojot iegūtos rezultātus jāsecina, ka neviens no diabēta riska faktoriem, kuru iespējamo asociāciju ar NO[•] metabolismu mēs pētījām, statistiski ticami to neietekmēja. Iespējams, ka to var izskaidrot ar nepietiekamo pacientu skaitu vai arī ar to, ka šo faktoru iedarbība uz NO[•] koncentrāciju izmaiņām ir mazāka nekā cukura diabēta izraisītās novirzes.

5. SECINĀJUMI

1. Pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu NO[•] un tā metabolītu NO₂⁻/NO₃⁻ koncentrācija asinīs ir paaugstināta, un tā korelē ar GFĀ, mikroalbuminūriju un HbA1c% pieaugumu, kas liecina par to, ka NO[•] biosintēzes hiperaktivācijai diabētiskās nefropātijas patoģenēzē, iespējams, ir negatīva ietekme.
2. Žurkām ar STZ ierosināto eksperimentālo cukura diabētu (1. tipa diabēta modelis) ir raksturīga pastiprināta NOS-atkarīgā un NOS-neatkarīgā NO[•] biosintēze nierēs, aknās, asinīs un skeleta muskuļos, ko normalizē NOS un XOR inhibitori.
3. Žurkām ar STZ diabētu (1. tipa diabēta modelis) 1,4-dihidropiridīnu grupas preparāti cerebrokrasts, etaftorons un fenoflorons (0,5 mg/kg, *p.o.*, no 9. līdz 12. dienai pēc STZ injekcijas) samazina patoloģisko NO[•] produkciju nierēs, aknās, skeleta muskuļos un asinīs. Nierēs etaftorons normalizē iNOS, XOR un eNOS ekspresiju. Tāpēc iespējams, ka 1,4-dihidropiridīnu grupas preparāti varētu aizkavēt diabētisko mikroangiopātisko komplikāciju attīstību.
4. GLUT1 ekspresija ir pastiprināta žurkām ar STZ diabēta modeli (1. tipa diabēta modelis) nierēs, miokardā un aknās, un žurkām ar HS diabēta modeli (2. tipa diabēta modelis) – nierēs un miokardā. GLUT4 ekspresija ir nomākta žurkām ar STZ diabētu (1. tipa diabēta modelis) miokardā un skeleta muskuļos.
5. Mildronāts (100 mg/kg, *p.o.*, 6 nedēļas) samazina eksperimentālā diabēta izraisītu GLUT1 hiperekspresiju nierēs, sirdī un aknās, un atjauno nomākto GLUT4 ekspresiju miokardā un skeleta muskuļos. Kombinējot ar metformīnu vai glibenklamīdu, mildronāta ietekme uz glikozes metabolisma parametriem un GLUT1 ekspresiju nepastiprinās.

6. PUBLIKĀCIJAS UN ZIŅOJUMI PAR PĒTĪJUMA TĒMU

Publikācijas starptautiski recenzētos izdevimos

1. **Sokolovska J**, Isajevs S, Sugoka O, Sharipova J, Lauberte L, Svirina D, Rostoka E, Sjakste T, Kalvinsh I, Sjakste N. Influence of metformin on GLUT1 gene and protein expression in rat streptozotocin diabetes mellitus model. *Arch Physiol Biochem*. 2010;116:137-145.
2. **Sokolovska J**, Isajevs S, Sugoka O, Sharipova J, Lauberte L, Svirina D, Rostoka E, Sjakste T, Kalvinsh I, Sjakste N. Correction of glycaemia and GLUT1 level by mildronate in rat streptozotocin diabetes mellitus model. *Cell Biochem Funct*. 2011;29:55-63.
3. **Sokolovska J**, Rumaks J, Karajeva N, Grīnvalde D, Sharipova J, Kluša V, Kalvinsh I. and Sjakste N. The influence of mildronate on peripheral neuropathy and some characteristics of glucose and lipid metabolism in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus model. *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry* 2012;6(2),177-184.
4. **Sokolovska J**, Isajevs S, Sugoka O, Sharipova J, Lauberte L, Svirina D, Rostoka E, Sjakste T, Kalvinsh I, Sjakste N. Comparison of the effects of glibenclamide on metabolic parameters, GLUT1 expression and liver injury in rats with severe and mild streptozotocin *diabetes mellitus*. *Medicina (Kaunas)*. 2012;48(10):532-43.

Konferenču tēzes par pētījuma tēmu

Referāti starptautiskās konferencēs

1. 3rd International Congress on Prediabetes and metabolic syndrome, Nice, France, April 1-4, 2009. Sokolovska J, Kalvinsh I, Sharipova J, Lauberte L, Sjakste N. Mildronate improves glucose and lipid metabolism in streptozotocin diabetic rats. In: *Journal of Diabetes*, 1/ Supplement 1:A243.
2. 11th European Congress of Endocrinology, April 25-29, 2009, Istanbul, Turkey. Sokolovska J, Kalvinsh I, Sharipova J, Lauberte L, Sjakste N. „Mildronate positively affects compensation of diabetes in streptozotocin rats and alters iNOS gene expression in rat tissues.” In: *Endocrine Abstracts* 2009, 20:350
3. 13th European Congress of Endocrinology, April 30-May 4, 2011, Rotterdam, The Netherlands. Sokolovska J, Isajevs S, Sugoka O, Sharipova J, Lauberte L, Svirina D, Rostoka E, Sjakste T, Kalvinsh I and Sjakste N. Changes in GLUT1 expression under metformin treatment in rat models of severe and mild streptozotocin diabetes mellitus. In: *Endocrine Abstracts* 2011;26:P696
4. International Conference in Pharmacology-Targeting Cellular Regulatory Systems, April 20-21, 2012, Riga, Latvia. J.Sokolovska, S.Isajevs, D.Isajeva, L.Baumane, G.Duburs, E.Bisenieks, O.Sugoka, J.Sharipova, L.Lauberte, I.Kalvinsh and N.Sjakste. Investigation of mechanisms underlying development of diabetic complications in experimental model of diabetes mellitus. In: *Abstract book*:57
5. 14th European Congress of Endocrinology and 15th International Congress of Endocrinology, May 5-9, 2012, Florence, Italy. J.Sokolovska, J.Sharipova, L.Lauberte, L.Baumane, I.Kalvinsh and N.Sjakste. Changes of NO concentration in the course of streptozotocin diabetes mellitus and under action of different NOS inhibitors in streptozotocin rats. In: *Endocrine Abstracts* 2012;P618
6. 46th Annual meeting of European Association of Study of Diabetes (EASD), October 1-5, 2012, Berlin, Germany. J.Sokolovska, S.Isajevs, E. Rostoka, O.Sugoka, L. Baumane, J.

Sharipova, I. Kalvinsh, N. Sjakste. Metabolic deviations and liver injury in two diabetes mellitus models. Metabolic deviations and liver injury in two diabetes mellitus models. In: In: Diabetologia October 2012 (55), Suppl. 1, p.490.

7.15th European Congress of Endocrinology (ECE), April 27-May 1, 2013, Copenhagen, Denmark. J. Sokolovska, S. Isajevs, O. Sugoka, J. Sharipova, L. Baumanė, I. Kalvinsh and N. Sjakste. iNOS, eNOS and XOR involvement in hyperglycaemia-induced kidney injury in rats with streptozotocin diabetes mellitus. In: Endocrine Abstracts (2013) Vol 32, P410.

8. International Symposium Diabetes – a Threat to Mankind, June 7-8, 2013, University of Helsinki, Helsinki, Finland. J. Sokolovska, L. Baumanė, N. Fokina, N. Sjakste. Association of albuminuria, HbA1c% and GFR with nitric oxide metabolism in type 2 diabetes mellitus. In: abstract book, Nr.9.

9. 7th International Conference on Diabetes and Obesity, October 24-25, 2013, International Society of Antioxidants and Nutritional Health, Riga Stradins University, Riga, Latvia. J. Sokolovska, O. Sugoka, S. Isajevs, L. Baumanė, J. Sharipova, I. Kalvins, N. Sjakste. Modifications of Glucose transporter expression and nitric oxide production in the pathogenesis of diabetes mellitus complications. In: abstract book, p.27

Referāti Latvijas konferencēs vai kongresos

1. LU 69. zinātniskā konference, 2011. gada 3. februārī. Ziņojums Sokolovska J, Rostoka E, Baumanė L, Duburs G, Bisenieks E, Kalviņš I, Sjakste N „Dihidropiridīnu klases preparāti samazina slāpekļa oksīda pārprodukciju žurkām ar streptozotocīna cukura diabēta modelī”. In: :Latvijas Universitātes 69. Zinātniskās konferences medicīnas sekcija. Tēžu apkopojums. Rīga, Latvijas Universitāte, 2011:16.

2. Apvienotais pasaules Latvijas zinātnieku 3. Kongress un Letonikas 4. Kongress, 2011. gada 25. novembrī. Ziņojums „Slāpekļa oksīda produkcija farmakoloģiskos eksperimentos.” Sokolovska J, Rostoka E, Baumanė L, Dzintare M, Isajevs S, Šaripova J, Ļauberte L, Kalviņš I, Sjakste N. In: Medicīnas zinātne un Latvijas sabiedrības veselība XXI gadsimtā. Medicīnas sekcijas tēzes. Rīga, 2011:88.

3. LU 70. zinātniskā konference, 2012. gada 2. februārī. Ziņojums „Kardioprotektīvo un anti-diabētisko preparātu ietekme uz GLUT4 ekspresiju diabētisko žurku skeleta muskulatūrā un miokardā” Sokolovska J, Isajevs S, Isajeva D, Šaripova J, Ļauberte L, Sugoka O, Sjakste T, Kalviņš I, Sjakste N.. In: Latvijas Universitātes 70. Zinātniskās konferences medicīnas sekcija. Tēžu apkopojums. Rīga, Latvijas Universitāte, 2012:81.

4. LU 71. zinātniskā konference, 2013. gada 15. februārī. Ziņojums „Vielmaiņas traucējumi un aknu bojājums divos cukura diabēta modeļos. Sokolovska J, Isajevs S, Rostoka E, Šaripova J, Sugoka O, Kalviņš I, Sjakst N.. In: Latvijas Universitātes 71. Zinātniskās konferences medicīnas sekcija. Tēžu apkopojums. Rīga, Latvijas Universitāte, 2013:47.

5. LU 72. zinātniskā konference, 2014. gada 14. februārī. Ziņojums „Nitric oxide hyperproduction and markers of DNA damage in the early phase of diabetic nephropathy in rat streptozotocin diabetes mellitus model. Sokolovska J, Rostoka E, Buraka E, Sugoka O, Isajevs S, Baumanė L, Šaripova J, Kalviņš I, Sjakste N. In: Latvijas Universitātes 72. Zinātniskās konferences medicīnas sekcija. Tēžu apkopojums. Rīga, Latvijas Universitāte, 2014:27.

7. PATEICĪBAS

Pirmkārt, gribu pateikties saviem vecākiem Nikolajam un Tatjanai Sjakstēm, jo viņi ir atbalstījuši manus centienus zinātnē gan ar savu piemēru un pieredzi, gan ar zinātniskām idejām, gan ar praktiskiem padomiem pētniecībā. Īpaši pateicos savam darba vadītājam un Latvijas Organiskās sintēzes institūta direktoram profesoram Ivaram Kalviņam par sniegto iespēju, atbalstu pētījuma tēmas izvēlē un darba gaitā. Pateicos Latvijas Organiskās sintēzes institūta Bioķīmijas grupas kolektīvam: Evitai Rostokai, Lāsmai Ļaubertei un Jeļenai Šaripovai par palīdzību eksperimentos ar dzīvniekiem. Milzīgs ieguldījums manā darbā ir Latvijas Organiskās sintēzes institūta elektronmagnētiskās rezonances speciālistes *Dr. chem.* Larisas Baumanes darbs, strādājot pie slāpekļa oksīda radikāļa noteikšanas. Liels paldies Latvijas Universitātes aģentūras Latvijas Universitātes Bioloģijas institūta Genomikas un bioinformātikas grupas darbiniecei Olgai Sugokai par palīdzību reālā laika RT-PCR veikšanā. Tāpat pateicos Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātes docētājam *Dr.med.* Sergejam Isajevam par imūnhistoķīmijas eksperimentu veikšanu. Pateicos asoc. prof. Maijai Dzintarei par promocijas darba rediģēšanu.

Neizsakāma ir mana pateicība savai ģimenei: vīram Jurim, vecākiem, vecvecākiem, vīra vecākiem un saviem bērniem Pāvelam un Ksenijai par atbalstu ikdienā, pārciešot manu projām būšanu un manā vietā paveicot daudzus sadzīves pienākumus. Vecākiem, vecvecākiem un mātai Jeļenai īpašs paldies par ieguldījumu manu uzskatu veidošanā, kas ir palīdzējis tiekties pēc mērķa neskatoties uz grūtībām.

Pētījums tika finansēts no ESF projekta 1DP/1.1.1.2./13/APIA/VIAA/002 „Jaunas starpnozaru grupas izveide efektīvu diabētiskās nefropātijas ārstēšanas līdzekļu meklējumiem”, Valsts pētījumu programmas 2010.10.-4/VPP4 “Jaunu profilakses, ārstniecības, diagnostikas līdzekļu un metožu, biomedicīnas tehnoloģiju izstrāde sabiedrības veselības uzlabošanai” apakšprojekta „Diabēta komplikāciju izpēte un kardiovaskulāro preparātu bioloģiskā aktivitāte”, LZP granta 278/2014 „Jaunu cukura diabēta komplikāciju ārstēšanas līdzekļu meklējumi starp vielām ar antioksidantu un DNS reparācijas veicinātāju īpašībām”, tirgus orientētā pētījuma projekta TOP 08_05 ar AS „Grindeks” līdzfinansējumu „Mildronāta ietekme uz ogļhidrātu metabolismu un to regulējošiem mehānismiem žurku cukura diabēta eksperimentālajos modeļos”. Pateicos L'Oreal stipendijai "Sievietēm zinātnē", UNESCO Latvijas Nacionālās komisijai un Latvijas Zinātņu akadēmijai par finansiālu atbalstu pētījuma veikšanai. Promocijas darbs veikts ar Eiropas Sociālā fonda projekta “Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē” finansiālu atbalstu.

8. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Alef MJ, Tzeng E, Zuckerbraun BS. Nitric oxide and nitrite-based therapeutic opportunities in intimal hyperplasia. *Nitric Oxide*. 2012;26(4):285-94.
2. Alef MJ, Vallabhaneni R, Carchman E, Morris SM Jr, Shiva S, Wang Y, Kelley EE, Tarpey MM, Gladwin MT, Tzeng E, Zuckerbraun BS. Nitrite-generated NO circumvents dysregulated arginine/NOS signaling to protect against intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1646-56.
3. Alhaider AA, Korashy HM, Sayed-Ahmed MM, Mobark M, Kfoury H, Mansour MA. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chem Biol Interact*. 2011;192(3):233-42.
4. Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U. Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med*. 2003;142(3):172-7.
5. American Diabetes Association position statement: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2010;33, Supplement 1.
6. Andersson C, Olesen JB, Hansen PR, Weeke P, Norgaard ML, Jørgensen CH, Lange T, Abildstrøm SZ, Schramm TK, Vaag A, Køber L, Torp-Pedersen C, Gislason GH. Metformin treatment is associated with a low risk of mortality in diabetic patients with heart failure: a retrospective nationwide cohort study. *Diabetologia*. 2010;53(12):2546-53.
7. Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. *Endocrinology*. 2012;153(8):3878-85.
8. Apakkan Aksun S, Ozmen B, Ozmen D, Parildar Z, Senol B, Habif S, Mutaf I, Turgan N, Bayindir O. Serum and urinary nitric oxide in Type 2 diabetes with or without microalbuminuria, relation to glomerular hyperfiltration. *J Diabetes Complications*. 2003;17(6):343-8.
9. Aydemir M, Ozturk N, Dogan S, Aslan M, Olgar Y, Ozdemir S. Sodium tungstate administration ameliorated diabetes-induced electrical and contractile remodeling of rat heart without normalization of hyperglycemia. *Biol Trace Elem Res*. 2012;148(2):216-23.
10. Bagheri M, Jahromi BM, Mirkhani H, Solhjou Z, Noorafshan A, Zamani A, Amirghofran Z. Azelnidipine, a new calcium channel blocker, promotes skin wound healing in diabetic rats. *J Surg Res*. 2011;169(1):e101-7.
11. Bähr M, Holtey M, Müller G, Eckel J. Direct stimulation of myocardial glucose transport and glucose transporter-1 (GLUT1) and GLUT4 protein expression by the sulfonyleurea glimepiride. *Endocrinology*. 1995;136:2547-53.
12. Botabekova T, Imantayeva M, Zhazini B, Dzumantayeva Z. Effektivnost mildronata v lečenii diabētiskoi retinopatii [Mildronāta efektivitāte diabētiskās retinopātijas ārstēšanā]. *Medicina*. 2004;2:69-71.
13. Beck-Nielsen H, Groop LC. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1994;94(5):1714-21.
14. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(11-12):1553-67.
15. Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, Rieusset J. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(3):E581-91.

16. Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K; AMDCC. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(1):27-45.
17. Briede J, Duburs G. Protective effect of cerebrocrast on rat brain ischaemia induced by occlusion of both common carotid arteries. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(2):203-10.
18. Briede J, Stivriņa M, Stoldere D, Bisenieks E, Uldriķis J, Poikāns J, Makarova N, Duburs G. Effect of new and known 1,4-dihydropyridine derivatives on blood glucose levels in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 2004;22(4):219-24.
19. Briede J, Stivrina M, Stoldere Dz, Vigante B, Duburs G. Effect of cerebrocrast, a new long-acting compound on blood glucose and insulin levels in rats when administered before and after STZ-induced diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(6):673-80.
20. Briede J, Stivrina M, Vigante B, Stoldere D, Duburs G. Acute effect of antidiabetic 1,4-dihydropyridine compound cerebrocrast on cardiac function and glucose metabolism in the isolated, perfused normal rat heart. *Cell Biochem Funct.* 2008;26(2):238-45.
21. Broadway NM, Saggerson ED. Inhibition of liver microsomal carnitine acyltransferases by sulphonylurea drugs. *FEBS Lett* 1995;371:137-39.
22. Brosius FC 3rd, Alpers CE. New targets for treatment of diabetic nephropathy: what we have learned from animal models. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22(1):17-25.
23. Bugger H, Abel ED. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia.* 2014;57(4):660-71.
24. Canadian Diabetes Association 2013. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada *Can J Diabetes* 37 (2013), Appendix 1, S197.
25. Cantu-Medellin N, Kelley EE. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol.* 2013;10;1(1):353-358.
26. Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willett WC, Rosner BA, Speizer FE, Manson JE. Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study. *Am J Epidemiol.* 1997;145(7):614-9.
27. Carruthers A, DeZutter J, Ganguly A, Devaskar SU. Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(4):E836-48.
28. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In Vivo.* 2009;23(2):245-58.
29. Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2005;7(4):307-17.
30. Cheng JT, Huang CC, Liu IM, Tzeng TF, Chang CJ. Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 2006;55(3):819-25.
31. Chiarelli F, Cipollone F, Romano F, Tumini S, Costantini F, di Ricco L, Pomilio M, Pierdomenico SD, Marini M, Cuccurullo F, Mezzetti A. Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria, relation to glomerular hyperfiltration. *Diabetes.* 2000;49(7):1258-63.
32. Choi KC, Lee SC, Kim SW, Kim NH, Lee JU, Kang YJ. Role of nitric oxide in the pathogenesis of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Intern Med.* 1999;14(1):32-41.
33. Ciaraldi TP, Mudaliar S, Barzin A, Macievic JA, Edelman SV, Park KS, Henry RR. Skeletal muscle GLUT1 transporter protein expression and basal leg glucose uptake are reduced in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:352–358.
34. Cirillo P, Gersch MS, Mu W, Scherer PM, Kim KM, Gesualdo L, Henderson GN, Johnson RJ, Sautin YY. Ketohexokinase-dependent metabolism of fructose induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3):545-53.
35. Cortes P, Riser BL, Asano K, Rodríguez-Barbero A, Narins RG, Yee J. Effects of oral antihyperglycemic agents on extracellular matrix synthesis by mesangial cells. *Kidney Int* 1998;54:1985-98.

36. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):117-23.
37. Cui W, Du B, Zhou W, Jia Y, Sun G, Sun J, Zhang D, Yuan H, Xu F, Lu X, Luo P Miao L. Relationship between five GLUT1 gene single nucleotide polymorphisms and diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39(8):8551-8.
38. da Silva AS, Dias LD, Borges JF, Markoski MM, de Souza MS, Irigoyen MC, Machado UF, Schaan BD. Renal GLUT1 reduction depends on angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic hypertensive rats. *Life Sci.* 2013;10;92(24-26):1174-9.
39. D'Agord Schaan B, Lacchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H. Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF- β -1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm Metab Res.* 2001;33(11):664-9.
40. Dambrova M, Liepinsh E, Kalvinsh I. Mildronate: cardioprotective action through carnitine-lowering effect. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(6):275-9.
41. Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes.* 2006;55(2):496-505.
42. Degrace P, Demizieux L, Du ZY, et al. Regulation of lipid flux between liver and adipose tissue during transient hepatic steatosis in carnitine-depleted rats. *J Biol Chem* 2007;282: 20816–20826.
43. Depre C, Young ME, Ying J, et al. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32:985–996.
44. DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med.* 2006;23(8):857-66.
45. Dimitrakoudis D, Ramlal T, Rastogi S, Vranic M, Klip A. Glycaemia regulates the glucose transporter number in the plasma membrane of rat skeletal muscle. *Biochem J.* 1992; 284(Pt 2):341–348.
46. Di Stefano A, Caramori G, Oates T, Capelli A, Lusuardi M, Gnemmi I, Ioli F, Chung KF, Donner CF, Barnes PJ, Adcock IM. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. *Eur Respir J.* 2000;20:556-63.
47. Dominguez JH, Camp K, Maianu L, Feister H, and Garvey WT. Molecular adaptations of GLUT1 and GLUT2 in renal proximal tubules of diabetic rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1994;266: F283–F290.
48. Dufrane D, Gianello P. Macro- or microencapsulation of pig islets to cure type 1 diabetes. *World J Gastroenterol.* 2012;18(47):6885-93.
49. Eckel J. Direct effects of glibenpiride on protein expression of cardiac glucose transporters. *Horm Metab Res.* 1996;28(9):508-11.
50. Egro FM. Why is type 1 diabetes increasing? *J Mol Endocrinol.* 2013;51(1):R1-13.
51. El-Din Bessa SS, Hamdy SM. Impact of nitric oxide synthase Glu298Asp polymorphism on the development of end-stage renal disease in type 2 diabetic Egyptian patients. *Ren Fail.* 2011;33:878-84.
52. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. *Eur Heart J.* 2013
53. Ezzidi I, Mtiraoui N, Mohamed MB, Mahjoub T, Kacem M, Almawi WY. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp, 4b/a, and -786T>C gene variants with diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2008;22:331-8.
54. Fernandes MA, Santos MS, Moreno, AJ, Duburs G, Oliveira CR, Vicente JA. Glibenclamide interferes with mitochondrial bioenergetics by inducing changes on membrane

- ion permeability. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004;18;162-9.
55. Fischer Y, Thomas J, Rösen P, Kammermeier H. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology.* 1995;136:412–20.
56. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93(1):137-88.
57. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 2008;57(6),1446-54.
58. Forcheron F, Basset A, Abdallah P, Del Carmine P, Gadot N, Beylot M. Diabetic cardiomyopathy: effects of fenofibrate and metformin in an experimental model-the Zucker diabetic rat. *Cardiovasc Diabetol.* 2009; 24(8):16.
59. Freerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, Macintyre AN, Goraksha-Hicks P, Rathmell JC, Makowski L. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a pro-inflammatory phenotype. *J Biol Chem.* 2014;289(11):7884-96.
60. Fry A. Insulin delivery device technology 2012: where are we after 90 years? *J Diabetes Sci Technol.* 2012;6(4):947-53.
61. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107(9):1058-70.
62. Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab.* 2003;29(4 Pt 2):6S28-35
63. Gnudi L, Thomas SM, Viberti G. Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8):2226-32
64. Greenspan FS, Gardner DG. *Basic and Clinical Endocrinology*, seventh edition, McGraw-Hill; 2004: 679
65. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol.* 2006;574(Pt 1):7-15.
66. Hayashi Y, Muranaka Y, Kirimoto T, Asaka N, Miyake H, Matsuura N. Effects of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on tissue carnitine and lipid levels in rats. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 770–773.
67. Heilig CW, Concepcion LA, Riser BL, Freytag SO, Zhu M, Cortes P. Overexpression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. *J Clin Invest.* 1995;96(4):1802-14.
68. Heilig CW, Deb DK, Abdul A, Riaz H, James LR, Salameh J, Nahman NS Jr. GLUT1 regulation of the pro-sclerotic mediators of diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2013;38(1):39-49.
69. Heishi M, Hayashi K, Ichihara J, Ishikawa H, Kawamura T, Kanaoka M, Taiji M, Kimura T. Comparison of gene expression changes induced by biguanides in db/db mice liver. *J Toxicol Sci.* 2008;33:339–47.
70. Hills CE, Brunskill NJ, Squires PE. C-peptide as a therapeutic tool in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2010;31(5):389-97.
71. Hirode M, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Ohno Y, Urushidani T. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;229:290–99.
72. Huang JP, Huang SS, Deng JY, Hung LM. Impairment of insulin-stimulated Akt/GLUT4 signaling is associated with cardiac contractile dysfunction and aggravates I/R injury in STZ-diabetic Rats. *Journal of Biomedical Science.* 2009;16:77.
73. Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev.* 2008;29(6):697-725.

74. Hundal HS, Ramlal T, Reyes R, Leiter LA, Klip A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology* 1992;131:1165–1173.
75. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*. 2003;52(4):1052-5.
76. Im SS, Kim SY, Kim HI, Ahn YH. Transcriptional regulation of glucose sensors in pancreatic β -cells and liver. *Curr Diabetes Rev*. 2006;2(1):11-8.
77. International Diabetes Federation, Atlas of Diabetes, 6th edition, 2013.
78. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R, Matthews DR. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Positionstatement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*. 2012;55(6):1577-96.
79. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat J et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.
80. Islas-Andrade S, Monsalve MCR, de la Peña JE, Polanco AC, Palomino MA, Velasco AF. Streptozotocin and Alloxan in Experimental Diabetes: Comparison of the Two Models in Rats. *Acta Histochem cytochem*; 2000;33(3):201-208
81. Jesmin S, Zaedi S, Maeda S, Yamaguchi I, Goto K, Miyauchi T. Effects of a selective endothelin a receptor antagonist on the expressions of iNOS and eNOS in the heart of early streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(6):925-31.
82. Jin DQ, Li G, Kim JS, Yong CS, Kim JA, Huh K. Preventive effects of Laminaria japonica aqueous extract on the oxidative stress and xanthine oxidase activity in streptozotocin-induced diabetic rat liver. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(7):1037-40.
83. Jurysta C, Nicaise C, Giroix MH, Cetik S, Malaisse WJ, Sener A. Comparison of GLUT1, GLUT2, GLUT4 and SGLT1 mRNA expression in the salivary glands and six other organs of control, streptozotocin-induced and Goto-Kakizaki diabetic rats. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(1):37-43.
84. Kadiiska MB, Bonini MG, Ruggiero C, Cleland E, Wicks S, Stadler K. Thiazolidinedione treatment decreases oxidative stress in spontaneously hypertensive heart failure rats through attenuation of inducible nitric oxide synthase-mediated lipid radical formation. *Diabetes*. 2012;61(3):586-96.
85. Kahn BB, Rossetti L, Lodish HF, Charron MJ. Decreased *in vivo* glucose uptake but normal expression of GLUT1 and GLUT4 in skeletal muscle of diabetic rats. *J Clin Invest* 1991;87:2197–2206.
86. Kain V, Kumar S, Puranik AS, Sitasawad SL. Azelnidipine protects myocardium in hyperglycemia-induced cardiac damage. *Cardiovasc Diabetol*. 2010;9:82.
87. Kainulainen H, Breiner M, SchuÖrmann A, Marttinen A, Virjo A, Joost HG. In vivo glucose uptake and glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT4 in heart and various types of skeletal muscle from streptozotocin-diabetic rats. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1225:275–282.
88. Katoh S, Hata S, Matsushima M, Ikemoto S, Inoue Y, Yokoyama J et al. Troglitazone prevents the rise in visceral adiposity and improves fatty liver associated with sulfonylurea therapy--a randomized controlled trial. *Metabolism*. 2001;50:414-17.
89. Katz A. Modulation of glucose transport in skeletal muscle by reactive oxygen species. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;102(4):1671-6.
90. Kern M, Loomis TA, Tapscott EB, Dohm GL. Increased muscle glucose uptake in response to chronic glyburide treatment is not related to changes in glucose transporter (GLUT4) protein. *Int J Biochem*. 1993;25(9):1257-61.
91. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 2012;166:877–894.

92. King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes Care*. 1993;16(1):157-77.
93. Kiss E, Kränzlin B, Wagenbla K, Bonrouhi M, Thiery J, Gröne E, Nordström V, Teupser D, Gretz N, Malle E, Gröne HJ. Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia-induced renal damage: prevention by liver X receptors. *Am J Pathol*. 2013;182(3):727-41.
94. Klip A, Tsakiridis T, Marette A, Ortiz PA. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J* 1994;8:43-53.
95. Klusa V, Beitnere U, Pupure J, Isajevs S, Rumaks J, Svirskis S, Dzirkale Z, Kalvinsh I. Mildronate and its neuroregulatory mechanisms: targeting the mitochondria, neuroinflammation, and protein expression. *Medicina (Kaunas)*. 2013;49(7):301-9.
96. Klusa VZ, Isajevs S, Svirina D, Pupure J, Beitnere U, Rumaks J, Svirskis S, Jansone B, Dzirkale Z, Muceniece R, Kalvinsh I, Vinters HV. Neuroprotective properties of mildronate, a small molecule, in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2010;11(11):4465-87.
97. Knip M. Descriptive epidemiology of type 1 diabetes--is it still in? *Diabetologia*. 2012;55(5):1227-30.
98. Kosegawa I, Chen S, Awata T, Negishi K, Katayama S. Troglitazone and metformin, but not glibenclamide, decrease blood pressure in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats. *Clin Exp Hypertens*. 1999;21(3):199-211.
99. Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ, Chisholm DJ, James DE. Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochem J*. 1993;295(Pt 1):287-93.
100. Kuwajima M., Harashima H., Hayashi M., Ise S., Sei M., Lu K., Kiwada H., Sugiyama Y., Shima K. Pharmacokinetic analysis of the cardioprotective effect of 3-(2,2, 2-trimethylhydrazinium) propionate in mice: inhibition of carnitine transport in kidney. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 289(1):93-102.
101. Kuznecova A, Teplyakov A. Ocenka vliyanija kardionata na effektivnost antianginalnoi terapii i funkcionalnoje sostojanije miokarda u bolnih IBS v sočetanii s arterialnoi gipertenzijej, asociirovannoi s saharim diabetom 2 tipa. [Kardionāta ietekmes novērtējums uz antianginozās terapijas efektivitāti un miokarda funkcionālo stāvokli pacientiem ar sirds išēmisko slimību un arteriālo hipertensiju, kuras kombinējas ar 2. Tipa cukura diabētu]. *Farmateka*. 2007;3:81-84.
102. Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN; DCCT/EDIC Research Group. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited. *Diabetes*. 2008 Apr;57(4):995-1001.
103. Langdown ML, Holness MJ, Sugden MC. Early growth retardation induced by excessive exposure to glucocorticoids in utero selectively increases cardiac GLUT1 protein expression and Akt/protein kinase B activity in adulthood. *J Endocrinol*. 2001;169(1):11-22.
104. Latvijas veselības aprūpes statistikas gadagrāmata 2012.
105. Lee JO, Lee SK, Jung JH, Kim JH, You GY, Kim SJ, Park SH, Uhm KO, Kim HS. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*. 2011;226(4):974-81.
106. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
107. Lestaevl P, Grandcolas L, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P. Neuro-inflammatory response in rats chronically exposed to (137) Cesium. *Neurotoxicology*. 2008; 29(2):343-8.

108. Levine DZ. Can rodent models of diabetic kidney disease clarify the significance of early hyperfiltration?: recognizing clinical and experimental uncertainties. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(2):109-18.
109. Liepinsh E, Skapare E, Svalbe B, Makrecka M, Cirule H, Dambrova M. Anti-diabetic effects of mildronate alone or in combination with metformin in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;658(2-3):277-83
110. Liepinsh E, Vilskersts R, Skapare E, Svalbe B, Kuka J, Cirule H, Pugovics O, Kalvinsh I, Dambrova M. Mildronate decreases carnitine availability and up-regulates glucose uptake and related gene expression in the mouse heart. *Life Sci*. 2008; 83(17-18):613-9
111. Liepinsh E, Vilskersts R, Zveiniece L, Svalbe B, Skapare E, Kuka J, Cirule H, Grinberga S, Kalvinsh I, Dambrova M Protective effects of mildronate in an experimental model of type 2 diabetes in Goto-Kakizaki rats. *Br J Pharmacol*. 2009; 157(8):1549-56.
112. Linden KC, DeHaan CL, Zhang Y, Glowacka S, Cox AJ, Kelly DJ, Rogers S. Renal expression and localization of the facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT12 in animal models of hypertension and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(1):F205-13.
113. Lu L, Seidel CP, Iwase T, Stevens RK, Gong YY, Wang X, Hackett SF, Campochiaro PA. Suppression of GLUT1; a new strategy to prevent diabetic complications. *J Cell Physiol*. 2013;228(2):251-7.
114. Lv S, Cheng J, Sun A, Li J, Wang W, Guan G, Liu G, Su M. Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting oxidative stress. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014: S0168-8227(14)00026-6.
115. Marzetti E, Calvani R, Dupree J, Lees HA, Giovannini S, Seo DO, Buford TW, Sweet K, Morgan D, Strehler KY, Diz D, Borst SE, Moninga N, Krotova K, Carter CS. Late-life enalapril administration induces nitric oxide-dependent and independent metabolic adaptations in the rat skeletal muscle. *Age (Dordr)*. 2012; E-publikācija.
116. Masiello P. Animal models of type 2 diabetes with reduced pancreatic β -cell mass. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006;38:873–893.
117. Mauer M, Zinman B, Gardiner R, Suissa S, Sinaiko A, Strand T, Drummond K, Donnelly S, Goodyer P, Gubler MC, Klein R. Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2009; 361(1),40-51.
118. Möllsten A, Wessman M, Svensson M, Forsblom C, Parkkonen M, Brismar K, Groop PH, Dahlquist G. Glu298Asp and NOS4ab polymorphisms in diabetic nephropathy. *Ann Med*.2010; 38:522-8.
119. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):121-38.
120. Müller G, Geisen K. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at adipocytes. *Horm Metab Res*. 1996;28(9):469-87.
121. Müller G, Satoh Y, Geisen K. Extraprostatic effects of sulfonylureas-a comparison between glimepiride and conventional sulfonylureas. *Diabetes Res Clin Pract*. 1995;28 Suppl:S115-37.
122. Napoli R, Davalli AM, Hirshman MF, Weitgasser R, Weir GC, Horton ES. Islet transplantation under the kidney capsule fully corrects the impaired skeletal muscle glucose transport system of streptozocin diabetic rats. *J Clin Invest* 1996; 97: 1389–1397.
123. Napoli R, Hirshman MF, Horton ES. Mechanisms and time course of impaired skeletal muscle glucose transport activity in streptozocin diabetic rats. *J Clin Invest* 1995; 96: 427–437.
124. Nasri H. Ameliorative effects of metformin on renal histologic and biochemical alterations of gentamicin-induced renal toxicity in Wistar rats. *J Res Med Sci*. 2013 Jul;18(7):628.
125. Nguyen C, Pan J, Charles MA. Preclinical studies of glimepiride. *Drugs Today (Barc)* 1998;34:391-400.

126. Ou HC, Lee WJ, Wu CM, Chen JF, Sheu WH. Aspirin prevents resistin-induced endothelial dysfunction by modulating AMPK, ROS, and Akt/eNOS signaling. *J Vasc Surg.*2012; 55(4),1104-15.
127. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):315-424.
128. Pascual JM, Wang D, Lecumberri B, Yang H, Mao X, Yang R, De Vivo DC. GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur J Endocrinol.* 2004;150(5):627-33.
129. Pereira RO, Wende AR, Olsen C, Soto J, Rawlings T, Zhu Y, Anderson SM, Abel ED. Inducible overexpression of GLUT1 prevents mitochondrial dysfunction and attenuates structural remodeling in pressure overload but does not prevent left ventricular dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 2013;2(5):e000301.
130. Perry IJ, Villegas R, Salim A, Flynn A. Clustering of protective factors for glucose intolerance and insulin resistance: a cross-sectional study. *Diabet Med* 2005;22:1091–7.
131. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2010;7(1):15-25.
132. (a)Pupure J, Fernandes MA, Santos MS, Moreno AJ, Kalvinsh I, Klusa V, Oliveira CR. Mitochondria as the target for mildronate's protective effects in azidothymidine (AZT)-induced toxicity of isolated rat liver mitochondria. *Cell Biochem Funct.* 2008;26(5):620-31.
133. (b)Pupure J, Isajevs S, Gordjushina V, Taivans I, Rumaks J, Svirskis S, Kratovska A, Dzirkale Z, Pilipenko J, Duburs G, Klusa V. Distinct influence of atypical 1,4-dihydropyridine compounds in azidothymidine-induced neuro- and cardiotoxicity in mice ex vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(5):401-6.
134. Qi Q, Hu FB. Genetics of type 2 diabetes in European populations. *J Diabetes.* 2012;4(3):203-12.
135. Rakitien N, Rakietien M, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* 1963;29:91-98.
136. Ray U, Khan GA, Chakraborty K, Basuroy S, Patra SC, Girish G, Bhattacharya G, Sinha AK. Isolation and study of insulin activated nitric oxide synthase inhibitory protein in acute myocardial infarction subjects. *J Thromb Thrombolysis.*2012; 33(3):218-29.
137. Rees DA and Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine.* 2004; 22:359–370
138. Regnell SE, Lernmark Å. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2011;8(4):454-67.
139. Roh M, Jeong J, Kim Y, Kim M, Hong S. Diagnostic utility of GLUT1 in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1315–1358.
140. Rozen S and Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, 2000,365-86.
141. Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliiev IP, Brusegan V, Rubis N, Gherardi G, Arnoldi F, Ganeva M, Ene-Iordache B, Gaspari F, Perna A, Bossi A, Trevisan R, Dodesini AR, Remuzzi G; Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med.*2004; 351(19):1941-51.
142. Ryabokon NI, Goncharova RI, Duburs G, Hancock R, Rzeszowska-Wolny J. Changes in poly(ADP-ribose) level modulate the kinetics of DNA strand break rejoining. *Mutat Res.* 2008;637(1-2):173-81.
143. Sabino-Silva R, Mori RC, David-Silva A, Okamoto MM, Freitas HS, Machado UF. The Na(+)/glucose cotransporters: from genes to therapy. *Braz J Med Biol Res.* 2010;43(11):1019-26.
144. Savino A, Pelliccia P, Schiavone C, Primavera A, Tumini S, Mohn A, Chiarelli F. Serum and urinary nitrites and nitrates and Doppler sonography in children with diabetes. *Diabetes Care.*2006; 29(12):2676-81.

145. Schneider MP, Ott C, Schmidt S, Kistner I, Friedrich S, Schmieder RE. Poor glycemic control is related to increased nitric oxide activity within the renal circulation of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2013;36(12):4071-5.
146. Simkhovich BZ, Shutenko ZV, Meirena DV, Khagi KB, Mezapuke RJ, Molodchina TN, Kalvins IJ, Lukevics E 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)--a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem Pharmacol*, 1988; 37:195-202.
147. Singh DK, Winocour P, Farrington K. Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2008;4(4):216-26.
148. Sjakste N., Kalvins I. Mildronate: an antiischemic drug with multiple indications. *Pharmacologyonline* 2006;1:1-18.
149. Sjakste N., Kleschyov A.L., Boucher J.L., Bauman L., Dzintare M., Meirena D., Sjakste J., Sydow K., Munzel T., Kalvins I. Endothelium- and nitric oxide-dependent vasorelaxing activities of gamma-butyro-beta-ine esters: possible link to the antiischemic activities of mildronate. *Eur J Pharmacol*. 2004;495:67-73.
150. Sokolovska J, Rumaks J, Karajeva N, Grīnvalde D, Sharipova J, Kluša V, Kalvins I. and Sjakste N. [The influence of mildronate on peripheral neuropathy and some characteristics of glucose and lipid metabolism in rat streptozotocin-induced diabetes mellitus model]. *Biomed Khim*. 2011;57(5):490-500. In Russian.
151. Soltésová D, Veselá A, Mravec B, Herichová I. Daily profile of glut1 and glut4 expression in tissues inside and outside the blood-brain barrier in control and streptozotocin-treated rats. *Physiol Res*. 2013;62 Suppl 1:S115-24.
152. Spaniol M, Kaufmann P, Beier K, et al. Mechanisms of liver steatosis in rats with systemic carnitine deficiency due to treatment with trimethylhydraziniumpropionate. *JLR* 2002; 44: 144–153.
153. Stadler K, Bonini MG, Dallas S, Jiang J, Radi R, Mason RP, Kadiiska MB. Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(6):866-74.
154. Stadler K, Jenei V, Somogyi A, Jakus J. Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005;21(2):189-96.
155. Stadler K, Jenei V, von Bölschházy G, Somogyi A, Jakus J. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(10):1240-51.
156. Statsenko M, Belenkova S, Sporova O, Shilina N. Primenenije mildronata v kombinirovannoi terapii hroničeskoj serdečnoj nedostatočnosti v postinfarktnom periode u boļnih saharnim diabetom 2 tipa. [Mildronāta pielietojums hroniskās sirds mazspējas kombinētā terapijā pēcinfarkta periodā pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu.] *Klin. med*. 2007;7:9.
157. Statsenko M, Turkina S, Belenkova S. Novij sposob lečenija avtonomnoi kardialņoi nevropatii u boļnih saharnim diabetom vtorogo tipa [Jauns autonomās sirds neiropātijas ārstēšanas veids pacientiem ar 2. tipa cukura diabētu.] *Bulluten Volgogradskogo naučnogo centra PAMH* 2010;1:36-39.
158. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. *Sensors*;2003; 3(8):276-284.
159. Sundaram R, Shanthi P, Sachdanandam P. Effect of iridoid glucoside on plasma lipid profile, tissue fatty acid changes, inflammatory cytokines, and GLUT4 expression in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2013;380(1-2):43-55.
160. Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol*. 2009;156(5):713-27.
161. Szkudelski T, Zywert A, Szkudelska K. Metabolic Disturbances and Defects in Insulin Secretion in Rats With Streptozotocin-Nicotinamide-Induced Diabetes. *Physiol. Res*. 2013;62:663-670.

162. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol. Res.* 2001;50:536-546.
163. Tal M, Kahn BB, Lodish HF. Expression of the low Km GLUT-1 glucose transporter is turned on in perivenous hepatocytes of insulindeficient diabetic rats. *Endocrinology* 1991;129:1933–1941.
164. Tessari P, Cecchet D, Cosma A, Vettore M, Coracina A, Million R, Iori E, Puricelli L, Avogaro A, Vedovato M. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes*.2010; 59(9):2152-9.
165. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(2):E141-5.
166. Toma L, Stancu CS, Sanda GM, Sima AV. Anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms of amlodipine action to improve endothelial cell dysfunction induced by irreversibly glycated LDL. *Biochem Biophys Res Commun.* 201;411(1):202-7.
167. Tsiani E, Ramlal T, Leiter LA, Klip A, Fantus IG. Stimulation of glucose uptake and increased plasma membrane content of glucose transporters in L6 skeletal muscle cells by the sulfonylureas gliclazide and glyburide. *Endocrinology.* 1995;136(6):2505-12.
168. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest.* 2012;122(1):4-12.
169. van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *Neth J Med.* 2013;71(4):174-87.
170. Vanin AF. Dinitrosyl iron complexes and S-nitrosothiols are two possible forms for stabilization and transport of nitric oxide in biological systems. *Biochemistry (Mosc).*1998;63(7):782-93.
171. Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Böhmer KP, Sterzel RB. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.*2000; 11(1):71-9.
172. Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Böhmer KP, Sterzel RB. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(1):71-9.
173. Vilskersts R, Zharkova-Malkova O, Mezhapuke R, Grinberga S, Cirule H, Dambrova M. Elevated vascular γ -butyryl-coenzyme A levels attenuate the development of high glucose-induced endothelial dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2013;40(8):518-24.
174. Vitale C., Collin P. Optimization of cardiac metabolism in diabetes mellitus. *Curr. Pharm. Des.*, 2008;14:2537-50.
175. Wasada T, Yano T, Ohta M, Yui N, Iwamoto Y. ATP-Sensitive potassium channels modulate glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. *Endocr J* 2001;48:369-75.
176. Wendt MC, Daiber A, Kleschyov AL, Mülsch A, Sydow K, Schulz E, Chen K, Keaney JF Jr, Lassègue B, Walter U, Griendling KK, Münzel T. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(3):381-91.
177. Wenzel P, Daiber A, Oelze M, Brandt M, Closs E, Xu J, Thum T, Bauersachs J, Ertl G, Zou MH, Förstermann U, Münzel T. Mechanisms underlying recoupling of eNOS by HMG-CoA reductase inhibition in a rat model of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 2008;198(1):65-76.
178. Wiggins D, Gibbons GF. The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. *Biochem J* 1992;284:457-62.
179. Yamagishi S, Matsui T. Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy-Friend or foe? *Pharmacol Res.* 2011;64(3):187-94.

180. Yan J, Young M, Cui Lopaschuk GD, Liao R, Tian R. Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity. *Circulation*. 2009;119:2818–2828.
181. Yang J, Holman GD. Long-term metformin treatment stimulates cardiomyocyte glucose transport through an AMP-activated protein kinase-dependent reduction in GLUT4 endocytosis. *Endocrinology*. 2006;147:2728–36.
182. Ybarra J, Behrooz A, Gabriel A, Koseoglu MH, Ismail-Beigi F. Glycemia-lowering effect of cobalt chloride in the diabetic rat: increased GLUT1 mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol*. 1997; 133:151–160.
183. Zhang CX, Pan SN, Meng RS, Peng CQ, Xiong ZJ, Chen BL, Chen GQ, Yao FJ, Chen YL, Ma YD, Dong YG. Metformin attenuates ventricular hypertrophy by activating the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric oxide synthase pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011; 38(1),55-62.
184. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res* 2008;2008:704045.
185. Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):468-78.

9. PIELIKUMI



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

PĀRTIKAS UN VETERINĀRĀ DIENESTA
ATĻAUJA Nr. 51
DZĪVNIEKU IZMANTOŠANAI IZMĒĢINĀJUMĀ

Atļaujas saņēmējs

Latvijas Organiskās Sintēzes institūts Bioloģijas fakultāte

PVD Reģ.nr. 051902

(Izmēģinājumu dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra nr.)

Leonfīne Antonoviča PVD atļaujas nr.2

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

Izmēģinājuma nosaukums

„Slāpekļa oksīda koncentrācijas izmaiņas diabētisko dzīvnieku audos dažādu farmakoloģisko preparātu ietekmē”

Izmēģinājumā izmantojamie dzīvnieki

300 žurkas
(suga un skaits)

Izmēģinājumu norises vieta

Kronvalda Bulvāris 4, 8 telpa, Rīga
(faktiskā adrese)

Atļaujas darbības laiks no

03.04.2012.g.
(dd. mm. gggg.)

līdz

01.04.2013.g.
(dd. mm. gggg.)

Ģenerāldirektors




M.Balodis

Z.v.

ED-2 (1 no 1) 02.versija

9.1.pielikums. Pārīkas un veterinārā dienesta atļauja dzīvnieku izmantošanai izmēģinājumos

Centrālā medicīnas ētikas komiteja

Brīvības iela 72, Rīga, LV-1011 • Tālr. 67876182 • Fakss 67876071 • E-pasts: vm@vm.gov.lv

Rīgā

10.07.2013. Nr.01-29.1/3

Valsts sabiedrības ar ierobežotu atbildību
„Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca”
Internās medicīnas klīnikas
vadītājam V.Pīrāgam

*Atzinums Nr.01-29.1/3 par pieteikuma
projektu „LatDiane: Latvijas diabētiskās
nefropātijas pētījums”*

Centrālā medicīnas ētikas komiteja 2013.gada 10.jūlija izskatīja valsts sabiedrības ar ierobežotu atbildību „Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca” Internās medicīnas klīnikas iesniegto pieteikuma projektu „LatDiane: Latvijas diabētiskās nefropātijas pētījums”.

Pamatojoties uz Centrālās medicīnas ētikas komitejas 2013.gada 10.jūlija sēdes protokola Nr.3 punktu 3, tiek izsniegts atzinums, ka valsts sabiedrības ar ierobežotu atbildību „Paula Stradiņa klīniskā universitātes slimnīca” Internās medicīnas klīnikas pieteikuma projekts „LatDiane: Latvijas diabētiskās nefropātijas pētījums” nav pretrunā ar bioētikas normām.

Centrālās medicīnas ētikas
komitejas priekšsēdētājs



R.Mucīņš

G.Jennacīne, 67876167
guna.jennacine@vm.gov.lv

9.2. pielikums. Centrālās medicīnas ētikas atļauja klīniska pētījuma veikšanai