

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE



Kārlis Vilks

GARĶĒŽU ACILKARNITĪNU PATOFIZIOLOĢISKĀS
FUNKCIJAS ŠŪNAS UN ORGANISMA LĪMENĪ

PROMOCIJAS DARBS

Doktora grāda iegūšanai bioloģijas nozarē

Apakšnozare: molekulārā bioloģija

Rīga, 2021

Promocijas darba izstrādāts Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē, Molekulārās bioloģijas katedrā un Latvijas Organiskās sintēzes institūtā, Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā laika posmā no 2016. līdz 2021. gadam.



Šis pētījums saņēmis atbalstu no Latvijas Organiskās sintēzes institūta studentu granta, IG-2017-03 un Latvijas Zinātnes padomes projekta TRILYSOX, granta Nr. LZP-2018/1-0082.

Darbs sastāv no ievada, 4 nodaļām, secinājumiem, literatūras saraksta, 3 pielikumiem.

Darba forma: publikāciju kopa Bioloģijas nozarē, Molekulārās bioloģijas apakšnozarē.

Darba zinātniskie vadītāji:

Prof. Dr. pharm. Maija Dambrova

Dr. pharm. Edgars Liepiņš

Darba recenzenti:

1) Prof. Terje Larsen, (The Arctic University of Norway, Tromsø);

2) Prof., Dr. biol. Jānis Kloviņš, (LU, LBMC);

3) Prof., Dr. med. Ilze Konrāde (RSU).

Promocijas darba aizstāvēšana notiks Latvijas Universitātes Bioloģijas zinātņu nozares promocijas padomes atklātā sēdē 15. decembrī

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Kalpaka bulvārī 4.

LU Bioloģijas zinātņu nozares promocijas

padomes priekšsēdētājs Dr. biol. _____ / *Kaspars Tārs* /

promocijas padomes sekretāre _____ / *Daina Eze* /

© Latvijas Universitāte, 2021

© Kārlis Vilks, 2021

Anotācija

Acilkarnitīni ir nozīmīgi taukskābju metabolīti, kas nodrošina taukskābju transportu mitohondrijos tālākai oksidācijai. Iepriekšējos pētījumos ir aprakstīts, ka paaugstināta garķēžu acilkarnitīnu koncentrācija izraisa mitohondriju bojājumus un insulīna rezistenci. Iepriekš arī parādīts, ka garķēžu acilkarnitīni akumulējas sirds mitohondrijos išēmijas laikā, izraisa mitohondriju funkcionālos traucējumus un palielina išēmijas-reperfūzijas izraisīto sirds audu bojājumu. Farmakoloģiski novēršot acilkarnitīnu uzkrāšanos, samazinās arī infarkta izmērs. Lai gan paaugstināts garķēžu acilkarnitīnu līmenis tiek saistīts ar insulīna rezistenci, tomēr trūkst eksperimentālu datu, kas ilustrētu audu un orgānu ieguldījumu plazmas acilkarnitīnu profila veidošanā. Darba mērķis ir identificēt garķēžu acilkarnitīnu izraisītās insulīna rezistences molekulāros mehānismus, un novērtēt diagnostikas potenciālu garķēžu acilkarnitīnu mērījumiem plazmā. Šajā darbā ir aprakstīta garķēžu acilkarnitīnu iesaiste enerģijas metabolisma regulācijā un insulīna rezistences patoģenēzē šūnu līmenī, izmantojot šūnu kultūras. Papildus tam sniegts ieskats par acilkarnitīnu līmeņa veidošanās mehānismiem fizioloģiskos apstākļos, identificējot audus, kas nosaka cirkulējošo acilkarnitīnu līmeni dzīvnieku modeļos. Insulīna rezistences un 2. tipa diabēta dzīvnieku modeļos tika izvērtēta acilkarnitīnu mērījumu izmantošana audu specifiskas insulīna rezistences diagnostikā. Rezultāti liecina, ka palmitoilkarnitīns, viens no izplatītākajiem garķēžu acilkarnitīniem, samazinot insulīna receptora un proteīnkināzes B fosforilāciju, kavē insulīna signāla pārnesi, tādējādi, jau šūnu līmenī izraisot traucējumus insulīna jutībā. Pētījuma rezultāti parāda, ka vidējo un garķēžu acilkarnitīnu plazmas profilu organismā galvenokārt nosaka sirds, reaģējot uz cirkulējošo enerģijas substrātu pieejamību. Tādējādi pēc plazmas garķēžu acilkarnitīnu profila var spriest par sirds metabolisma spēju pielāgoties enerģijas substrātu pieejamībai. Iegūtie dati norāda, ka nespēja samazināt garķēžu acilkarnitīnu koncentrāciju plazmā pēc glikozes ievadīšanas ir saistīta ar muskuļu un sirds insulīna rezistenci. Līdzīgi, nespēja apturēt brīvo taukskābju veidošanos pēc glikozes ievadīšanas liecina par traucējumiem taukaudu insulīna jutībā. Pētījumā ir ilustrēta garķēžu acilkarnitīnu loma insulīna rezistences molekulāro mehānismu norisēs šūnas līmenī, kā arī parādītas acilkarnitīnu un taukskābju mērījumu izmantošanas iespējas audu specifiskas insulīna rezistences diagnostikā.

Abstract

Acylcarnitines (AC) are metabolites essential for beta oxidation of fatty acids. Previously, it has been described that increased levels of long-chain acylcarnitines (LCAC) lead to mitochondrial damage and insulin resistance. LCAC accumulation in the cardiac tissues during ischemia has been shown to result in damage to the mitochondria and aggravate cardiac ischemia-reperfusion injury. Furthermore, pharmacological inhibition of acylcarnitine accumulation reduces the size of the infarction. Although elevated levels of LCAC have been associated with the insulin resistance, there is a lack of experimental data on tissue/organ-specific contribution to the plasma pool of LCAC. This study aimed to investigate the molecular mechanisms of the LCAC-induced insulin resistance and to assess the diagnostic potential of LCAC levels measurements in plasma. In this study, we used cell culture experiments to describe the regulatory and pathophysiological functions of LCAC at the cellular level. In addition, the mechanisms that determine physiological AC levels were studied and the tissues responsible for the circulating AC profile in animal models were identified. The potential of the measuring of LCAC concentrations in plasma as a diagnostic marker of tissue insulin insensitivity was demonstrated using mice models of the insulin resistance and type 2 diabetes. The results show that palmitoylcarnitine, one of the most abundant members of LCAC, affects the insulin signaling pathway by inducing the dephosphorylation of the insulin receptor and protein kinase B, thereby impairing insulin sensitivity at the cellular level. Experimental results also indicate that the heart determines the medium- and long-chain AC profiles in plasma as a result of a rapid response to the availability of circulating energy substrates. Therefore, plasma LCAC profile can be used as an indicator of metabolic flexibility in cardiac tissues. The obtained data indicate that the inability to lower LCAC levels after glucose administration is associated with muscle and heart insulin resistance. Meanwhile, the inability to decrease free fatty acid production (FFA) after glucose administration suggests insulin insensitivity of adipose tissue. In general, we have illustrated the cellular origins of LCAC-induced insulin resistance and showed that measurements of plasma LCAC and FFA concentrations can be used as indicators of tissue-specific insulin resistance.

Satura rādītājs

Satura rādītājs.....	5
1. Ievads	7
2. Darbā lietotie saīsinājumi	8
3. Teorētiskais pamatojums	9
3.1. Acilkarnitīni.....	9
3.2. Garķēžu acilkarnitīnu veidošanās.....	9
3.3. Garķēžu acilkarnitīnu funkcijas.....	11
3.4. Acilkarnitīnu profila izmaiņas diennakts laikā.....	11
3.5. Insulīna signālceļš un tā aktivācija	12
3.6. Insulīna signālceļa regulācijas mehānismi	13
3.7. Acilkarnitīnu profilu ietekmējošie faktori	15
3.8. Insulīna rezistences diagnostikā izmantoto metožu trūkumi.....	15
3.9. Izmaiņas enerģijas substrātu pieejamības regulācija.....	16
3.10. Garķēžu acilkarnitīnu iesaiste insulīna rezistences patoģenēzē	17
3.11. Glikozes tolerances testa neizmantotās iespējas diagnostikā	18
4. Materiāli un metodes.....	19
4.1. Izmantotie materiāli.....	19
4.2. <i>In vitro</i> pētījumi	19
4.2.1. Eksperimenti šūnu līnijās	20
4.2.2. Proteīnu koncentrācijas noteikšana	21
4.2.3. Imunoblotu analīze	21
4.2.4. PTP1B aktivitātes noteikšana	23
4.3. <i>In vivo</i> pētījumi.....	23
4.3.1. Dzīvnieku modeļi	23
4.3.2. Acilkarnitīnu profilu audos.....	24
4.3.3. Fiziskās slodzes ietekme uz orgānu acilkarnitīnu profilu.....	25
4.3.4. Taukskābju oksidācijas un acilkarnitīnu efluksa noteikšana sirdī.....	25
4.3.5. Enerģijas metabolisma noteikšana muskuļos	26
4.3.6. Insulīna rezistences un diabēta eksperimentālie modeļi.....	27
4.3.6. Glikozes tolerances tests un glikozes uzņemšana audos	27
4.3.7. Bioķīmisko parametru noteikšana plazmā un audos	28
4.4. Statistiskā analīze	28

5. Rezultāti	30
5.1 Garķēžu acilkarnitīnu ietekme uz insulīna signālceļu	30
5.1.1 Palmitoilkarnitīna ietekme uz InsR un Akt fosforilāciju.....	30
5.1.2. PTP1B inhibīcija novērš palmitoilkarnitīna izraisītos efektus	31
5.1.3. PKC un PP2A nepiedalās palmitoilkarnitīna efektu nodrošināšanā.....	33
5.1.4. Palmitoilkarnitīns palielina insulīna sekrēciju.....	35
5.2. Acilkarnitīnu plazmas profila veidošanās	36
5.2.1 Acilkarnitīnu koncentrācijas izmaiņas tukšā dūšā.....	36
5.2.2. Acilkarnitīnu koncentrācijas izmaiņas glikozes tolerances testa laikā.....	38
5.2.3 Acilkarnitīnu koncentrācija plazmā un muskuļos pēc fiziskas slodzes.....	42
5.3. Taukskābju metabolisma regulācijas traucējumi 2. tipa diabēta attīstības laikā .42	
5.3.1. Acilkarnitīnu koncentrācijas izmaiņas plazmā insulīna rezistences modeļos	42
5.3.2. Brīvo taukskābju koncentrācijas izmaiņas plazmā insulīna rezistences modeļos	45
5.3.3. Glikozes uzņemšana audos insulīna rezistences modeļos	45
5.3.4. Glikozes regulācija insulīna rezistences modeļos	47
6. Diskusija	49
6.1. Garķēžu acilkarnitīnu izraisītās insulīna rezistences mehānismi	49
6.2. Plazmas acilkarnitīnu profils kā marķieris enerģijas metabolismam sirdī	53
6.3. Garķēžu acilkarnitīni un brīvās taukskābes kā insulīna rezistences marķieri	56
7. Secinājumi.....	60
8. Rezultātu aprobācija.....	61
8.1. Zinātniskie raksti	61
8.2. Zinātniskās konferences	61
9. Pateicības	63
10. Literatūras avoti	64

1. Ievads

Darba mērķis ir identificēt garķēžu acilkarnitīnu izraisītās insulīna rezistences molekulāros mehānismus un izvērtēt garķēžu acilkarnitīnu mērījumu diagnostisko potenciālu. Lai šo mērķi sasniegtu, izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Noskaidrot garķēžu acilkarnitīnu ietekmi uz galvenajiem insulīna signālceļa komponentiem insulīna receptoru un proteīnkināzi B;
2. Identificēt audus, kas nosaka plazmas garķēžu acilkarnitīnu līmeni fizioloģiskos apstākļos (tukšā dūšā, postprandiālā stāvoklī);
3. Novērtēt plazmas acilkarnitīnu mērījumu pielietojumu audu specifiskas insulīna rezistences diagnostikā eksperimentālajos dzīvnieku modeļos.

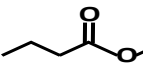
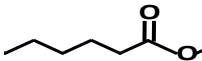
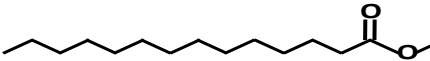
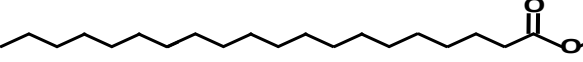
2. Darbā lietotie saīsinājumi

[³ H]-DOG – 2-[^{1,2-3} H]-dezoksi-D-glikoze	KoA - koenzīms A
ACC – acetil-KoA karboksilāze	LAR – leukocītu antigēnu saistītā proteīnu tirozīna fosfatāze
AEBSF – 2-aminoetil-benzēnsulfonil fluorīds	LG – zems glikozes saturs
AK – acilkarnitīni	PI3K – fosfoinozīda 3-kināze
Akt – proteīnkināze B	PIP ₂ – fosfatidil-4, 5-difosfāts
AMPK – AMP-aktivētā proteīnkināze	PIP ₃ – fosfatidil-3, 4, 5-trifosfāts
ATF – adenozīna trifosfāts	PK – palmitoilkarnitīns
BMOV – bis-(maltolato)-oksvanadijs (IV)	PKC – proteīnkināze C
CACT – karnitīna-acilkarnitīna translokāze	PP2A – proteīnu fosfatāze 2A
CPT – karnitīna palmitoiltransferāze	PTEN – proteīnu tensīna homologs
DAG – diacilglicerīdi	PTP1B – proteīnu tirozīna fosfatāze 1B
DMEM– Dulbeko modificētā Īgla (Eagle) barotne	PVDF – poli-vinilidēna difluorīds
ELISA – enzīmu saistītais imūnsorbenta tests	RER – elpošanas koeficients
GLUT – glikozes transportproteīns	SDS PAGE – nātrija dodecilsulfāta poliakrilamīda gela elektroforēze
GTT – glikozes tolerances tests	SEM – vidējās aritmētiskās vērtības standartkļūda
HbA1c – glikētais hemoglobīns	SHP-2 – SH2 domēnu saturoša tirozīna fosfatāze 2
HFD – augsta tauku satura diēta	TC-PTP – T-šūnu proteīnu tirozīna fosfatāze
InsR – insulīna receptors	
IRS – insulīna receptora substrāts	
KH – Krebsa-Henseleita buferšķīdums	

3. Teorētiskais pamatojums

3.1. Acilkarnitīni

Acilkarnitīni (AK) ir taukskābju metabolisma starpprodukti, kas organismā rodas taukskābju un karnitīna esterifikācijas rezultātā. AK veidojas mitohondrijos, lai nodrošinātu garķēžu taukskābju transportu cauri mitohondriju iekšējai membrānai tālākai β -oksidācijai (Sharma and Black, 2009; Reuter and Evans, 2012). Šī iemesla dēļ AK galvenokārt tiek uzskatīti par transporta formu taukskābēm (oglekļa ķēdes garums C2-C26), kas tiek oksidētas mitohondrijos adenozīna trifosfāta (ATF) ražošanai, vai izmantotas endogēno molekulu sintēzei. Atkarībā no taukskābju oglekļa ķēdes garuma AK nosacīti iedala īsķēžu (C2-C5), vidējo ķēžu (C6-C12), garķēžu (C14-C18) kā arī ļoti garo ķēžu (C20-C26) AK (Attēls 1). Atkarībā no taukskābes īpašībām AK var iedalīt arī piesātinātos, nepiesātinātos hidroksil- un dikarbonskābju AK. Pretstatā īsķēžu AK, kas var veidoties glikozes, aminoskābju un taukskābju degradācijas procesā, vidēja garuma, garķēžu un ļoti garo ķēžu AK veidojas tikai taukskābju metabolisma rezultātā. AK var veidoties arī sazaroto ķēžu aminoskābju metabolisma, taukskābju peroksidācijas un ketonvielu biogēnēzes procesos (Li et al., 2019).

Īsķēžu	C2-C4		Karnitīns
Vidēja garuma ķēžu	C6-C12		Karnitīns
Garķēžu	C14-C18:2		Karnitīns
Ļoti garo ķēžu	C20-C26		Karnitīns

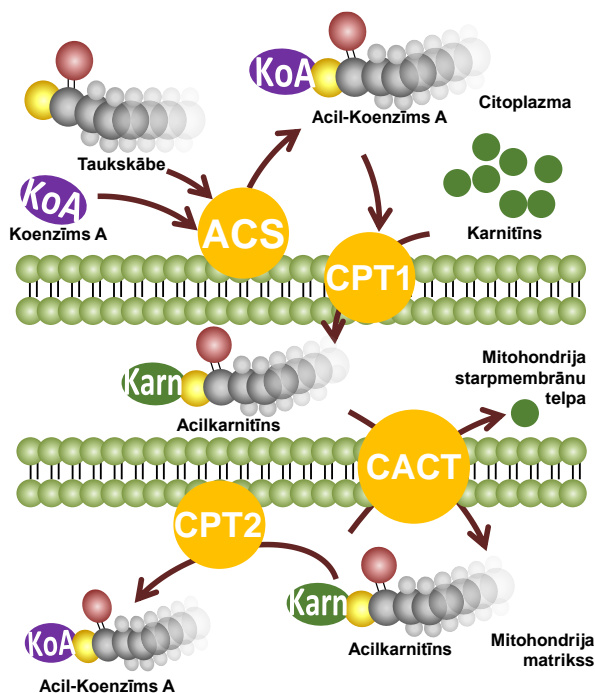
Attēls 1. Acilkarnitīnu nosacītais iedalījums pēc taukskābes oglekļa ķēdes garuma

3.2. Garķēžu acilkarnitīnu veidošanās

Garķēžu AK sintēze notiek mitohondrijos un peroksisomās, piedaloties karnitīna aciltransferāzēm (Kerner and Hoppel, 2000; Violante et al., 2013). Garķēžu AK veidošanās shematiski attēlota 2. attēlā. Acil-koenzīma A sintāze (ACS) taukskābēm pievieno koenzīmu A (KoA). Pēc tam karnitīna palmitoiltransferāze 1 (CPT1), kas atrodas uz mitohondriju ārējās membrānas, nomaina KoA grupu pret karnitīnu, veidojot AK. Tālāk garķēžu AK šķērso

mitohondriju ārējo membrānu, nokļūstot starpmembrānu telpā, no kuras to transportu caur mitohondriju iekšējo membrānu nodrošina karnitīna-acilkarnitīna translokāze (CACT). CACT garķēžu AK transportē, veicot AK apmaiņu pret brīva karnitīna molekulu (Attēls 2). Noslēdzošais posms AK transporta ķēdē ir karnitīna palmitoiltransferāzes 2 (CPT2) reakcija, kas no AK atbrīvo karnitīna molekulu un tā vietā atkal piesaista KoA, veidojot attiecīgās taukskābes KoA, kas mitohondriju matriksā iesaistās β -oksidācijas norisē.

No CPT1 atkarīgā garķēžu AK sintēze tieši ietekmē taukskābju enerģijas metabolisma ātrumu (Shriver and Manchester, 2011), savukārt, CPT1 aktivitāti regulē malonil-koenzīma A (malonil-KoA) līmenis šūnās. Malonil-KoA tieši kavē CPT1 aktivitāti, kā rezultātā taukskābes vairāk tiek pārveidotas par triglicerīdiem un diacilglicerīdiem (DAG), nevis izmantotas β -oksidācijā (Ruderman et al., 2003; Foster, 2004). Malonil-KoA līmeni tieši paaugstina acetil-KoA karboksilāze (ACC), savukārt, malonil-KoA dekarboksilāze (MCD) samazina malonil-KoA līmeni (Foster, 2004). Tukšā dūšā un nepietiekama ATF daudzuma apstākļos tiek aktivēta AMP-aktivētā proteīnkināze (AMPK), kas kavē ACC aktivitāti, kā rezultātā samazinās malonil-KoA līmenis un CPT1 aktivitāte pieaug (Schooneman et al., 2013; Valentine et al., 2014). Turpretim, postprandiālā stāvoklī insulīns aktivē no proteīnu kināze B (Akt) atkarīgo signālceļu, kas kavē AMPK un tādējādi aktivē malonil-KoA sintēzi, bet palielinātā malonil-KoA koncentrācija kavē CPT1 aktivitāti.



Attēls 2. Acilkarnitīnu veidošanās mitohondrijos. Acilkarnitīnu sintēze ir vairāku pakāpju process, kā rezultātā taukskābes tiek transportētas caur mitohondriju ārējo un iekšējo membrānu. Apzīmējumi: KoA – koenzīms A, ACS – acilkoenzīma A sintāze, Karn – karnitīns, CPT1 – karnitīna palmitoil-transferāze 1, CACT – karnitīna-acilkarnitīna translokāze, CPT2 – karnitīna palmitoil-transferāze 2.

3.3. Garķēžu acilkarnitīnu funkcijas

Papildus atzītajai AK iesaistei taukskābju (C3-C26) β -oksidācijas nodrošināšanā tiek iegūti arvien vairāk pierādījumi par garķēžu AK lomu un tiešu līdzdalību enerģijas metabolisma procesu regulācijā. Eksperimentāli pierādīts, ka garķēžu AK spēj efektīvi kavēt piruvāta un laktāta oksidāciju, tādējādi palēninot glikozes oksidāciju gan izolētos mitohondrijos (Makrecka et al., 2014), gan šūnu kultūrās (Aguer et al., 2014) un izolētos orgānos (Liepinsh et al. 2016; Makrecka et al. 2014). Tieši garķēžu AK metabolisms tiek uzskatīts par noteicošo faktoru, kas regulē iekššūnas enerģijas metabolisma līdzsvaru starp ogļhidrātiem un lipīdiem (Liepinsh et al., 2017; Li et al., 2019), tomēr precīzi šīs regulācijas molekulārie mehānismi vēl nav līdz galam izpētīti.

3.4. Acilkarnitīnu profila izmaiņas diennakts laikā

Lai uzturētu enerģijas homeostāzi, fizioloģiskos apstākļos organisms spēj līdzsvaroti izmantot gan glikozes, gan taukskābju metabolismu atkarībā no enerģijas substrātu pieejamības. Enerģijas substrātu un tos ietekmējošo hormonu koncentrācija asinsritē nosaka enerģijas metabolisma procesus audos (Randle, 1998; Liepinsh et al., 2014; Muoio, 2014; Goodpaster and Sparks, 2017). Eksperimentālajos modeļos ar ierobežota kaloriju daudzuma diētu dzīvniekiem paaugstinās β -oksidācijas cikla enzīmu ekspresijas līmenis un aktivitāte, kā rezultātā palielinās AK daudzums aknās, muskuļos un sirdī (Mezhnina et al., 2020). Fizioloģiski veseliem indivīdiem AK koncentrācija plazmā diennakts laikā dinamiski mainās, paaugstinoties tukšā dūšā un samazinoties pēc ēšanas (Thompson et al., 2012). AK daudzums strauji pieaug tukšā dūšā, jo šajā stāvoklī par enerģijas avotu galvenokārt tiek izmantotas taukskābes (Hoppel and Genuth, 1980). Cirkulējošo AK daudzums plazmā var palielināties arī tad, ja samazinās ar uzturu uzņemtais ogļhidrātu daudzums, un organisms sāk izmantot tauku rezerves (Kang et al., 2018). Savukārt, augsts ogļhidrātu patēriņš samazina AK, īpaši garķēžu, līmeni plazmā, organismam pārslēdzoties no taukskābju uz glikozes oksidāciju (Gonzalez-Granda et al., 2018). AK koncentrāciju plazmā ietekmē arī gremošanas sistēmas orgānu darbība, kas ir tieši atkarīga no diennakts ritma (Skene et al., 2018). Tā kā AK koncentrācija dinamiski mainās atkarībā no organisma fizioloģiskajām norisēm, ir jāpievērš

īpaša uzmanība organisma fizioloģiskajam stāvoklim asins un audu paraugu ņemšanas laikā, kā arī izmantojot un interpretējot AK mērījumu rezultātus.

AK var veidoties taukskābju, glikozes un aminoskābju metabolisma rezultātā (Li et al., 2019). AK profilu plazmā nosaka ne tikai organisma metabolais stāvoklis, bet arī atsevišķu audu un orgānu metabolisma procesu ieguldījums. Tādēļ, lai spētu saistīt kādu saslimšanu ar plazmas AK profilu, ir svarīgi izprast plazmas AK izcelsmi un noskaidrot, kuri orgāni ir iesaistīti plazmas AK profila veidošanā. Garķēžu taukskābes pārsvarā tiek izmantotas aknās, sirds un skeleta muskuļos (Lopaschuk et al., 2010; Liepinsh et al., 2014; Turner et al., 2014), tāpēc garķēžu AK koncentrācijas izmaiņām plazmā būtu jāatspoguļo aknu, sirds un skeleta muskuļu mitohondriju taukskābju oksidācijas procesus.

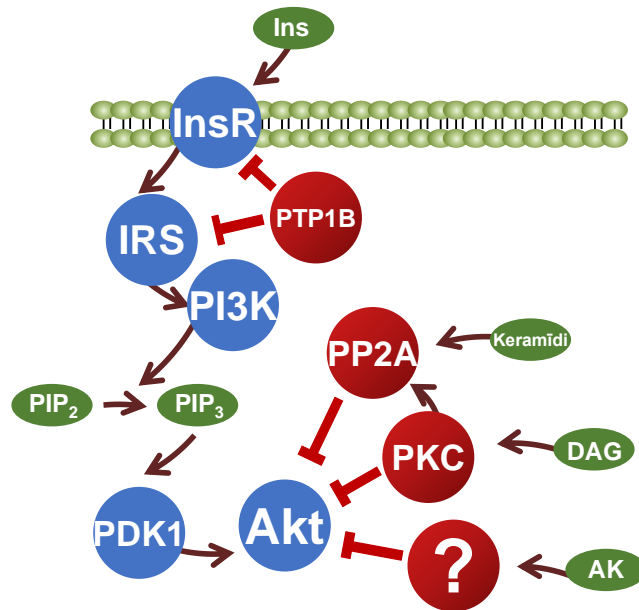
3.5. Insulīna signālceļš un tā aktivācija

Insulīna signālceļš būtiski regulē glikozes un lipīdu metabolismu. Tā aktivācija sākas, insulīnam piesaistoties insulīna receptora (InsR) subvienībām šūnas ārpusē (Attēls 3). Kad insulīns piesaistījies pie InsR, notiek receptora iekšējās subvienību konformācijas izmaiņas, lai būtu iespējama subvienību autofosforilācija (Luo et al., 1999). Kā viena no cilvēku InsR autofosforilācijas vietām jāmin tirozīnu 1151 pozīcijā (Tyr1151), kas aktīvi autofosforilējas, kad insulīns saistījies ar InsR. Pēc InsR fosforilācijas insulīna signāls tiek nodots tālāk, aktivējot insulīna receptora substrātu (IRS) (White et al., 1985). Pēc IRS fosforilācijas tas saistās ar fosfoinozīda 3-kināzi (PI3K) (Myers et al., 1992), tādējādi aktivējot nākošo posmu insulīna signālceļā. Aktivētā PI3K fosforilē fosfatidilinozītola 4,5-bifosfātu (PIP₂), veidojot fosfatidilinozītola 3,4,5-trifosfātu (PIP₃) (Whitman et al., 1988). Pieaugot PIP₃ koncentrācijai, Akt no šūnas kodola translocējas uz šūnas membrānu (Whitman et al., 1988; Scheid et al., 2002). Translokācijas rezultātā tiek atsegtas divas no Akt galvenajām fosforilācijas vietām, tirozīna 308 pozīcijā (Tyr308) un serīna 473 pozīcijā (Ser473), kuru fosforilācijas rezultātā šūnā tiek uzsākta insulīna signāla atbildes reakcija. Akt Ser473 fosforilācija nodrošina fizioloģiskos procesus, kas galvenokārt veicina glikozes uzņemšanu šūnā, izmantojot no insulīna atkarīgo glikozes transportproteīnu 4 (GLUT4) (Cong et al. 1997), aktivē piruvāta metabolismu (Karwi et al., 2020), kā arī kavē no CPT1 atkarīgo garķēžu taukskābju metabolismu, tā paaugstinot malonil-KoA koncentrāciju (Ruderman et al., 1999; Foster, 2012).

3.6. Insulīna signālceļa regulācijas mehānismi

Viens no lipīdu metabolisma starpproduktu aktivētajiem enzīmiem, kas ir iesaistīts Akt regulācijā, ir proteīnu fosfatāze 2A (PP2A), kuru aktivē keramīdi, sfingolipīdu metabolisma produkti (Dobrowsky et al., 1993) (Attēls 3). PP2A ir plaši ekspresēta proteīnu serīna/tirozīna fosfatāze, kas sevī ietver vairāku oligomēru enzīmu kopu, kam kopīga katalītiskā subvienība. Viena no PP2A regulatorajām subvienībām PP2A B55 α , atbild par Akt regulāciju, jo tās pārekspresijas rezultātā šūnās būtiski tiek samazināta gan Akt Tyr308, gan Ser473 pozīciju fosforilācija (Kuo et al., 2008). Ir parādīts, ka kavējot PP2A ar Zn²⁺ joniem tiek novērots Akt aktivitātes pieaugums (Lee et al., 2009), tādējādi apstiprinot šī enzīma lomu insulīna signālceļa regulācijā.

Proteīnu kināze C (PKC), ir izoenzīmu grupa, ko iedala, atkarībā no to aktivācijai nepieciešamajiem stimuliem. PKC regulatorā subvienība satur inhibējošu pseidosubstrāta aminoskābju sekvenci, kā atrašanās enzīma aktīvajā centrā tiek regulēta, piesaistoties kādai no signālmolekulām, atkarībā no attiecīgā PKC izoformas veida (Newton, 2018). DAG ir nozīmīga loma PKC aktivācijā, tie palielina PKC un šūnu membrānas piesaistīšanās afinitāti un samazina PKC pseidosubstrāta saistīšanos kināzes aktīvajā centrā (Mackay and Twelves, 2007). Eksistē vairākas no DAG atkarīgas PKC izoformas, kuras spēj regulēt Akt fosforilāciju (Eichmann and Lass, 2015). PKC piedalās insulīna signālceļa negatīvajā regulācijā, gan kavējot PI3K, gan aktivējot PP2A, kā rezultātā tiek samazināta Akt fosforilācija (Newton, 2018) (Attēls 3).



Attēls 3. Shematisks insulīna signālceļa atainojums. Insulīna signālceļu veido vairāku kināžu un procesu kaskāde, ko regulē dažādas fosfatāzes. Apzīmējumi: Ins - insulīns, InsR - insulīna receptors, PTP1B - proteīnu tirozīna fosfatāze 1B, IRS - insulīna receptora substrāts, PI3K - fosfoinozīda 3-kināze, PIP₂ - fosfatidilinozītola 4,5 bifosfāts, PIP₃ - fosfatidilinozītola 3,4,5-trifosfāts, PDK1 - no fosfoinozīda atkarīgā kināze, Akt – proteīnkināze B, PP2A - proteīnu fosfatāze 2A, PKC – proteīnkināze C, DAG - diacilglicerīdi, AK - acilkarnitīni.

Par nozīmīgu insulīna signālceļa regulatoru tiek uzskatīta proteīna tirozīnfosfatāze 1B (PTP1B, saukta arī par PTPN1) (Feldhammer et al., 2013). Aktivēta PTP1B katalītiski defosforilē InsR Tyr1151, tādējādi negatīvi regulējot insulīna signāla pārneši (Sun et al., 2016a). Sākotnējie pierādījumi par PTP1B nozīmi metabolisma regulācijā tika iegūti eksperimentos ar PTP1B delēcijas pelēm, kurām salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem bija ievērojami zemāka glikozes koncentrācija asinīs, kā arī daudz zemāks insulīna līmenis. Savukārt, saņemot augsta tauku satura diētu (HFD), šīs peles nepieņēmas svarā un neizmainījās to jutība pret insulīnu, atšķirībā no HFD kontroles dzīvniekiem, kam novēroja izteiktu svara pieaugumu un insulīna rezistenci (Elchebly et al., 1999). PTP1B nozīmi un darbības mehānismu noskaidroja šūnu eksperimentos, kur šī enzīma pārekspresija izraisīja samazinātu insulīna stimulēto InsR un IRS fosforilāciju, bet PTP1B ekspresijas samazinājuma rezultātā insulīna jutība pieauga (Zhang and Zhang, 2007). Neskatoties uz pierādījumiem par PTP1B iesaisti insulīna signālceļa regulācijā, vēl aizvien līdz galam nav

identificēti mehānismi, kas izskaidrotu šīs fosfatāzes lomu insulīna rezistences attīstības gaitā.

3.7. Acilkarnīnu profilu ietekmējošie faktori

Vairāku pētījumu rezultāti ļauj secināt, ka vidējo ķēžu un garķēžu AK koncentrācijas plazmā var izmantot kā biomarķieri mitohondriju metabolisma traucējumu diagnostikai (Koves et al., 2008; Adams et al., 2009; Mihalik et al., 2010; Ramos-Roman et al., 2012; Ueland et al., 2013; Mai et al., 2013; Zhang et al., 2014; Ahmad et al., 2016; Guasch-Ferré et al., 2016; Hunter et al., 2016; Ribel-Madsen et al., 2016; Strand et al., 2017). Tomēr jāatzīmē, ka pētījumos, kuru rezultāti rosina paaugstinātas AK koncentrācijas izmantot kā marķieri insulīna rezistences, 2. tipa diabēta un sirds un asinsvadu slimību diagnostikai, AK mērījumi tika veikti plazmā vai serumā, nesniedzot ieskatu par AK profilu audos. Līdz šim tikai dažos pētījumos zinātnieki pievērsuši uzmanību saistībai starp plazmas un audu AK profilu (Koves et al., 2008; Soeters et al., 2009; Makrecka et al., 2014; Schooneman et al., 2014; Hoene et al., 2016; Liepinsh et al., 2016a). No AK mērījumiem tukšā dūšā un postprandiālā stāvoklī var secināt, ka plazmas garķēžu AK koncentrācija korelē ar AK saturu sirds audos, bet dati par plazmas AK profila saistību ar AK saturu muskuļos ir pretrunīgi (Soeters et al., 2009; Makrecka et al., 2014; Schooneman et al., 2014; Liepinsh et al., 2016a). Turklāt līdz šim nav pētītas no laika atkarīgās AK profila izmaiņas audos, pārejot no tukšas dūšas uz postprandiālo stāvokli pēc glikozes ievadīšanas. Kopumā līdz šim nav noskaidrots, kā plazmas AK profils atspoguļo AK saturu audos un kuri audi nosaka īslaicīgas izmaiņas plazmas AK profilā.

3.8. Insulīna rezistences diagnostikā izmantoto metožu trūkumi

Garķēžu AK tiek sintezēti un metabolizēti galvenokārt mitohondrijos, līdz ar to garķēžu AK koncentrācija tiek izmantota kā mitohondriālās taukskābju oksidācijas marķieris (Adams et al., 2009). Līdz ar masspektrometrijas metožu attīstību, paaugstinātas AK koncentrācijas mērījumi tiek izmantoti kā marķieris nepilnīgai taukskābju oksidācijai, lai diagnosticētu iedzimtos taukskābju oksidācijas defektus. Diagnostikas nolūkos nosaka gan kopējo taukskābju profilu, gan atsevišķu acilkarnīnu koncentrācijas plazmā (Piero Rinaldo, Tina M. Cowan, 2008).

Neraugoties uz diabēta plašo izplatību Latvijā un pasaulē, klīniskajā diagnostikā izmanto tikai marķieru mērījumus, kas raksturo pacientu glikozes homeostāzi un insulīna rezistenci (Tabula 1). Pašlaik galvenie klīnikā lietotie 2. tipa diabēta diagnostikas marķieri ir

saistīti ar traucējumiem glikozes metabolismā (Inzucchi et al., 2015; American Diabetes Association, 2017), bet ar esošajām metodēm nav iespējams noteikt insulīna jutības traucējumus dažādos audos. Pēdējā laikā lipīdu profila mērījumus izmanto gan diabēta diagnostikā, gan ārstēšanā izmantoto pretidiabēta medikamentu terapeitiskās efektivitātes izvērtēšanā (American Diabetes Association, 2017). Neskatoties uz plašiem pētījumiem, cirkulējošo lipīdu mērījumi pagaidām nav validēti lietošanai par biomarķieriem klīniskajā praksē (Muoio and Newgard, 2008a, 2008b; Martins et al., 2012; Schooneman et al., 2013; McCain et al., 2015; Mika and Sledzinski, 2017; Newgard, 2017)

Tabula 1 Otrā tipa diabēta diagnostiskie marķieri pacientu plazmā.

Mērījums	Veseli, tukša dūša	Veseli, postprandiāli	Diabēts, tukša dūša	Diabēts, postprandiāli	Metabolītu avoti analīzes laikā
Glikoze	•	•••	••	•••• (tolerance)	Vairāku orgānu atbilde *
Insulīns (C-Peptīds)	•	••	••	••••	β-šūnas
Glikētais hemoglobīns (HbA1)	•	•	••	••	Ilgstoša hiperglikēmija asinīs

Klīniski pieejamie mērījumi iezīmēti ar zilu; •zems līmenis, ••vidējs līmenis •••paaugstināts līmenis.* Glikozes tolerances testa (GTT) laikā glikozes koncentrācija ir atkarīga no insulīna jutības dažādos orgānos, tajā skaitā muskuļos, taukos, aknās. Kāda orgāna insulīna rezistence var tikt maskēta ar citu orgānu pastiprinātu darbību.

3.9. Izmaiņas enerģijas substrātu pieejamības regulācija

Brīvo taukskābju un AK koncentrācija plazmā tukšā dūšā proporcionāli palielinās paaugstinātas lipolīzes un aktivēta taukskābju metabolisma rezultātā, savukārt, AK sintēze samazinās, kad notiek insulīna signālceļa aktivācija pēc ēšanas (Mihalik et al., 2010). Veselos indivīdos tukšā dūšā taukskābju un AK koncentrācijas ir paaugstinātas, bet insulīna līmenis ir zems, līdz ar to nav iespējams izdarīt secinājumus par insulīna jutību (Liepinsh and Dambrova, 2018). Turpretim postprandiālā stāvoklī augstas brīvo garķēžu taukskābju un AK koncentrācijas varētu uzskatīt par insulīna rezistences marķieriem, tā raksturojot insulīna

nespēju kavēt triglicerīdu metabolismu adipocītos, kā arī nespēju apturēt taukskābju metabolismu muskuļos un sirdī, kavējot CPT1 (Ramos-Roman et al., 2012; Newgard, 2017).

3.10. Garķēžu acilkarniīnu iesaiste insulīna rezistences patoģenēzē

Metabolā elastība ir šūnu spēja pielāgoties konkrētam metabolajam stāvoklim un enerģijas substrātu pieejamībai (Goodpaster and Sparks, 2017). Insulīna rezistencei raksturīgs metabolās elastības trūkums, kā rezultātā notiek tādu lipīdu metabolisma starpproduktu uzkrāšanās, kā DAG, keramīdi, garķēžu taukskābes un to AK (Makrecka-Kuka et al., 2020). Pierādīts, ka postprandiālā stāvoklī paaugstināta garķēžu AK koncentrācija plazmā izraisa izteiktu hiperinsulinēmiju, insulīna rezistenci un hiperglikēmiju pelēs (Liepinsh et al., 2017). Taču garķēžu AK loma iekššūnas signālceļu regulācijā līdz šim pētīta salīdzinoši maz. Garķēžu AK nozīmi insulīna signālceļa regulācijā apliecina pētījumi, kas parāda, ka garķēžu AK izraisa Akt fosforilācijas samazināšanos *ex vivo* (Aguer et al., 2014; Blackburn et al., 2020) un *in vivo* (Liepinsh et al., 2017) modeļos, tomēr precīzi molekulārie mehānismi līdz šim nav zināmi.

Apmēram 90% diabēta pacientu ir 2. tipa diabēts, kas ir metabola saslimšana, ko raksturo insulīna rezistence, kā arī hiperglikēmijas un hiperlipidēmijas izraisītas komplikācijas. Diabēta pacientiem, kuriem novērojama insulīna rezistence, insulīna ievadīšana nespēj samazināt kopējo cirkulējošo AK daudzumu plazmā tik pat efektīvi kā veseliem indivīdiem (Mihalik et al., 2010). Tieši tādēļ augsts garķēžu AK līmenis tiek saistīts ar paaugstinātu 2. tipa diabēta attīstības risku (Sun et al., 2016b). Atsevišķās publikācijās aprakstīti rezultāti, kas liecina, ka gan 2. tipa diabēta, gan metabolā sindroma pacientiem galvenokārt paaugstināts ir īšķēžu AK līmenis plazmā (Bene et al., 2013; Libert et al., 2018; Cao et al., 2020). Tomēr šie mērījumi nav saistāmi ar insulīna rezistenci, jo plazmas paraugi, kas analizēti šajos pētījumos, no pacientiem ņemti tukšā dūšā, - stāvoklī, kad AK līmenis fizioloģiski ir paaugstināts (Hoppel and Genuth, 1980), tādējādi precīzi neatspoguļojot reālo situāciju (Liepinsh and Dambrova, 2018). Par spīti pētījumiem, kas saista garķēžu AK akumulāciju audos un tās izraisītos metabolisma traucējumus, ko novēro pacientiem ar aptaukošanos, hiperglikēmiju un 2. tipa diabētu, šobrīd literatūrā trūkst datu par konkrētiem audiem specifisku insulīna rezistenci un saistību starp garķēžu AK līmeni un glikozes metabolisma procesiem.

Garķēžu AK akumulāciju un tai sekojošos traucējumus enerģijas metabolisma regulācijā novēro aptaukošanās un 2. tipa diabēta attīstības gaitā (Mihalik et al., 2010).

Novērots, ka garķēžu AK līmenis ievērojami paaugstinās prediabēta gadījumā, izraisot traucējumus glikozes līmeņa regulācijā (Zhang et al., 2014). Uz garķēžu AK paaugstinājumu kā svarīgu metabolo traucējumu cēloni norāda tas, ka pacientiem ar insulīna rezistenci insulīna jutību var uzlabot, ja farmakoloģiski vai ģenētiski samazina garķēžu AK līmeni (Ramos-Roman et al., 2012; Wicks et al., 2015; Dambrova et al., 2016). Turklāt pierādīts, ka garķēžu AK akumulācija prediabēta un 2. tipa diabēta gadījumā nav saistīta ar pārējo lipīdu profila izmaiņām (Mai et al., 2013).

Garķēžu AK akumulācija var pasliktināt kardiovaskulārās sistēmas darbību. Daudzi pētījumi norāda uz to, ka pacientiem ar augstāku plazmas garķēžu AK līmeni, kardiovaskulāro slimību komplikācijas izpaužas ievērojami smagākā formā (Ueland et al., 2013; Ahmad et al., 2016; Strand et al., 2017). Papildus smagākām kardiovaskulārajām komplikācijām, garķēžu AK akumulācija tiek saistīta arī ar pasliktinātiem sirds funkcionālajiem parametriem, piemēram, samazinātu sirds izsviedes frakciju (Hunter et al., 2016). Šo iemeslu dēļ ir jāturpina AK molekulāro mehānismu pētījumi, skaidrojot AK lomu kardiometabolo saslimšanu patoģenēzē.

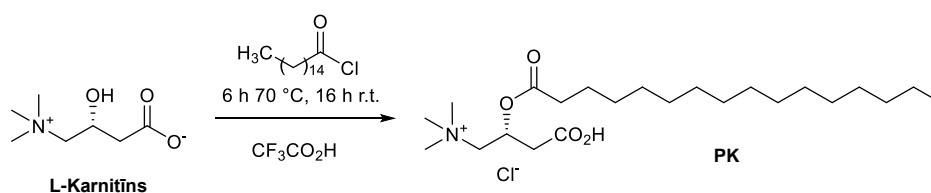
3.11. Glikozes tolerances testa neizmantošanās iespējas diagnostikā

Klīniskajā situācijā postprandiālais metabolisma stāvoklis ir grūti raksturojams; tādēļ, lai labāk raksturotu pacientu glikozes toleranci, diagnostikas nolūkos tiek ieteikts glikozes tolerances tests (GTT), glikozes koncentrācijas mērījumus veicot 2 h laikā pēc glikozes uzņemšanas. GTT regulāri tiek izmantots kā diagnostikas metode, taču būtu nepieciešama arī papildus mērījumu veikšana, lai noteiktu taukskābju un to metabolisma starpproduktu koncentrācijas tukšā dūšā un 2 h pēc glikozes ievadīšanas. Papildus priekšrocība, taukskābju metabolītu noteikšanai GTT laikā, ir metabolisma pārejas no tukšās dūšas uz postprandiālo stāvokli raksturošana, kas liecinātu par metabolisma spēju pārslēgties starp dažādiem enerģijas substrātiem.

4. Materiāli un metodes

4.1. Izmantotie materiāli

NovoRapid® asparta insulīnu (100 vienības/mL Novo Nordisk, Bagsvērda Dānija), sotrastaurīnu (Cat. No. 16726, Cayman Chemical, Ann Arbor, Mičigana, ASV) un (R)-(+)-etomoksira nātrija sāli (Cat. No. 4539 Tocris Bioscience, Abingdon, Apvienotā Karaliste) pirms lietošanas atšķaidīja sterili filtrētā PBS buferšķīdumā (137 mM NaCl (Merck KGaA, Darmštate, Vācija), 2,7 mM KCl (Merck KGaA), 10 mM Na₂HPO₄ (ACROS Organics™, Valthama, Masačuseta, ASV), 1,8 mM KH₂PO₄ (ACROS Organics™), pH 7,4). BVT948 (Cat No. 16615, Cayman Chemical) un vortmanīnu (Cat. No. 1232, Tocris Bioscience) šķīdināja dimetilsulfoksīfā (DMSO) (Cat. D8418, Merck KGaA). Palmitoilkarnitīna hlorīdu sintezēja no karnitīna un palmitoilhlorīda, vadoties pēc sintēzes metodes (Attēls 4), ko aprakstījis Nivet ar kolēģiem (Nivet et al., 1991). BMOV sintezēja pēc iepriekš aprakstītas metodes (Caravan et al., 1995).



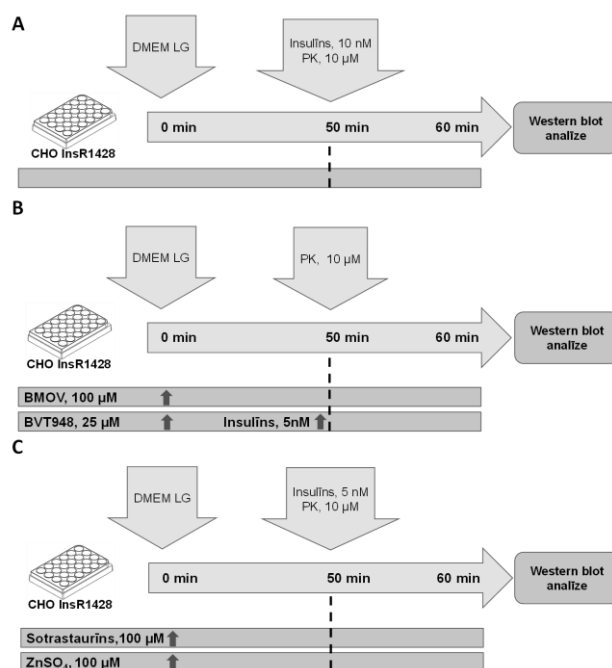
Attēls 4. Palmitoilkarnitīna sintēzes shēma.

4.2. *In vitro* pētījumi

Eksperimentiem izmantoja CHO INSR 1284 šūnu līniju, kas pārekspresē cilvēka insulīna receptoru (InsR) (Sommerfeld et al., 2010). Lai noskaidrotu, kuras no insulīna signālceļu kontrolējošajām fosfatāzēm ir iesaistītas novēroto PK efektu nodrošināšanā, izmantoja fosfatāžu inhibitorus: bis(maltolato)oksvanādiiju (IV) (BMOV) un BVT948, kas inhibē PTP1B (Peters et al., 2003; Liljebris et al., 2004; Thompson and Orvig, 2006) un cinka sulfātu, kas kavē PP2A aktivitāti (Vardatsikos et al., 2013; Xiong et al., 2015). Sotrastaurīns bloķē no DAG atkarīgo PKC izoformu aktivitāti (Kawakami et al., 2004), ļaujot noteikt, vai garķēžu AK ietekme uz Akt Ser473 fosforilāciju norisinās ar PKC izoformu iesaisti. Lai sīkāk izpētītu garķēžu AK ietekmi uz insulīna sekrēciju, izmantoja insulīnu sekretējošo šūnu līniju RIN5F (Gazdar et al., 1980).

4.2.1. Eksperimenti šūnu līnijās

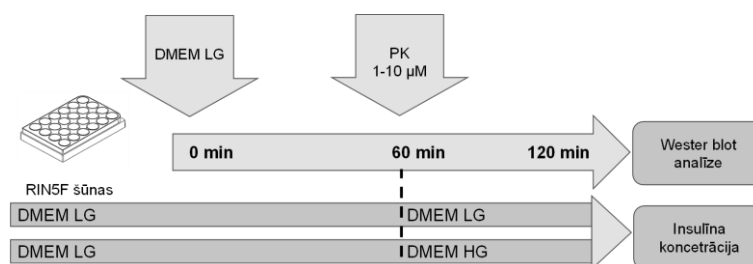
CHO INSR 1284 (ATCC® CRL-3307™) šūnu kultūra tika iegūta no ATCC® (Lielpin, Lomianki, Polija). Šūnas audzēja Ham's F-12 ar Glutamax (ThermoFisher Scientific, Valthama, Masačuseta, ASV) šūnu vidē, kas papildināta ar 10% fetālo liellopa serumu (Merck KGaA) un 0,34 mg/mL higromicīna B (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Vācija). Šūnas tika inkubētas HERAccl VIOS 160i CO₂ inkubatorā (ThermoFisher Scientific) 37°C temperatūrā ar 5% CO₂. Dienu pirms eksperimenta šūnas izsēja audu kultūru platēs (Sarstedt, Nümbrecht, Vācija) ar šūnu blīvumu 10⁴/mL. Lai veicinātu šūnu adhēziju, šūnu plati inkubatorā ievietoja vismaz 12 h pirms eksperimenta sākuma. Pirms eksperimentiem šūnu vidi nomainīja pret 1 mL DMEM Low Glucose (Merck KGaA) bez seruma. Lai nodrošinātu to, ka šūnas visos lauciņos pakļautas vienādiem apstākļiem, kontroles lauciņos pievienoja šķīdinātājus attiecīgajās koncentrācijās (Attēls 5). Pēc inkubācijas šūnu vidi noņēma un šūnām pievienoja urīnvielu saturošu lizējošo buferšķīdumu. Paraugu iesaldēja -80°C līdz tālākiem mērījumiem.



Attēls 5. CHO InsR1284 šūnās veikto eksperimentu grafiskais attēlojums.

Palmitoilkarnitīna (PK) izraisītie efekti uz insulīna signālceļu ar insulīnu stimulētās šūnās (A). PK izraisītie efekti uz insulīna signālceļu ar BMOV un BVT948 stimulētās šūnās (B). Sotrastaurīna un cinka sulfāta ietekme uz PK izraisītajiem efektiem ar insulīnu stimulētās šūnās (C).

RIN-5F (ATCC® CRL-2058™) šūnu līniju ieguva no ATCC® (Lielpin). Šūnas audzēja RPMI 1640 vidē (ThermoFisher Scientific), kas papildināta ar 10% fetālo liellopa serumu (Merck KGaA). Aptuveni 24 h pirms eksperimenta uzsākšanas šūnu vidi nomainīja pret bezseruma DMEM Low Glucose (Merck KGaA), kam sekoja vēl viena vides maiņa pret DMEM Low Glucose (Merck KGaA) vai DMEM High Glucose (Cat. D1152, Merck KGaA) ar dažādām PK koncentrācijām (1-10 μM). Pēc 1 h šūnu vidi savāca un centrifugēja pie 380 × g, lai atbrīvotos no šūnām, kas atdalījušās no platītes (Attēls 6). Supernatantu iesaldēja -80°C līdz tālākiem insulīna mērījumiem.



Attēls 6. RIN-5F šūnās veiktā eksperimenta grafiskais attēlojums

Izmantotajās šūnu līnijās regulāri tika veikta mikoplazmu kontaminācijas kontrole, izmantojot MycoProbe mikoplazmu detekcijas komplektu (R&D Systems, Inc., Mineapole, Minesota, ASV). Iespējamā baktēriju un raugu kontaminācijas kontrole tika veikta, vizuāli pārbaudot katru šūnu plati pirms eksperimenta uzsākšanas.

4.2.2. Proteīnu koncentrācijas noteikšana

Proteīnu koncentrāciju šūnu un audu lizātos noteica, izmantojot vienkāršoto Laurija (*Lowry*) proteīnu noteikšanas metodi (Peterson, 1977), standartlīknei izmantojot liellopa seruma albumīnu (Cat. EQBAH66, Europa Bioproducts Ltd, Čelsvorta, Apvienotā Karaliste).

4.2.3. Imunoblotu analīze

Šūnas pēc eksperimenta lizēja urīnvielū saturošā buferšķīdumā (4 mM urīnviela (Cat. U5378, Merck KGaA), 140 mM Tris bāze (Cat. 648310, Merck KGaA), 1% SDS Cat. L3771, Merck KGaA), 1 mM glicerolfosfāts (Cat. G9891, Merck KGaA), 1 mM NaF (Cat. 60-013-87, ThermoFisher Scientific), 10 μM leupeptīns (Cat. 1167, Tocris Bioscience), 1 μM pepstatīns A (Cat. 1190, Tocris Bioscience), 1 μM aprotinīns (Cat. A1153 Merck KGaA) un 100 μM (2-aminoetil) benzēnsulfonil fluorīds (AEBSF) (Cat. A8456, Merck KGaA), šūnu lizātu apstrādājot ar ultraskaņu 10 sekundes ar 20% amplitūdu, izmantojot

ultraskaņas ģeneratoru (Cole-Parmer processor, Vernon Hills, Ilinoisa, ASV). Paraugus pēc apstrādes līdz mērījumu veikšanai uzglabāja -80°C . Šūnu lizātus pirms elektroforēzes sajauc ar seškārtīgu Laemli buferšķīdumu (12% SDS, 60 mM Tris pH 6.8, 47% glicerīnu (Cat. G7886, Merck KGaA), 0.93% DTT (Cat. 3154 Tocris Bioscience), un 0.06% bromfenola zilo (Cat. 15613840, ThermoFisher Scientific), katrā SDS PAGE gēla bedrītē iepildīja 20 μg kopējā proteīna. SDS PAGE gēls sastāvēja no 2% koncentrējošā, un 8% sadalošā gēla. Elektroforēzi veica, izmantojot ThermoScientific elektroforēzes iekārtu. Pēc elektroforēzes proteīnus no gēla pārnesa uz membrānu (Invitrogen™ iBlot™ 2 Transfer Stack PVDF, ThermoFisher Scientific), izmantojot sausās blotēšanas sistēmu (iBlot 2, ThermoFisher Scientific). Pēc proteīnu pārneses PVDF membrānu 1 h bloķēja ar 5% liellopa seruma albumīna šķīdumu un 14 h inkubēja ar primārajām antivielām (Tabula 2) $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūrā. Pēc inkubācijas membrānas skaloja Tris buferšķīdumā (150 mM NaCl) un 50 mM Tris, pH 7.6) un 1 h inkubēja ar antivielām, kas konjugētas ar mārutku peroksidāzi (Tabula 2). Imunoblotu attēlus ieguva, membrānām pievienojot hemiluminiscences substrātu (Cat. WBKLS0500, Merck KGaA) un eksponējot tās Azure c400 attēlveidošanas iekārtā (Azure Biosystems, Dublina, Kalifornija, ASV). Proteīnu joslām noteica relatīvo daudzumu, izmantojot AzureSpot programmatūru (Azure Biosystems). Lai novērstu dažāda ekspozīcijas ilguma rezultātā veidojušās variācijas starp joslām, katras grupas ietvaros aprēķināja grupas vidējo joslu intensitātes vērtību, ar kuru izdalīta katra individuālā joslas vērtība grupā.

Tabula 2. Darbā izmantotās antivielas

Nosaukums	Atšķaidījums	Kat.Nr., Lote	Ražotājs
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® rabbit mAb	1:2000	cat. #4060, Lot: 23	Cell Signaling Technology, Denvera, Masačūseta, ASV
Insulin receptor β (Tyr1150/1151) (19H7) rabbit mAb	1:1000	cat. #3024, Lot: 15	Cell Signaling Technology
Akt (pan) (C67E7) rabbit mAb	1:2000	cat. #3024, Lot: 15	Cell Signaling Technology
Anti-actin Ab-5 C4 antibody	1:4000	cat. 612656, Lot: 7033721	BD Bioscience, San Hosē, Kalifornija, ASV
HRP-linked anti-rabbit IgG antibodies	1:50000	cat. #7074, Lot: 26	Cell Signaling Technology
HRP-linked anti-mouse IgG antibodies	1:50000	cat. #7076, Lot: 33	Cell Signaling Technology

4.2.4. PTP1B aktivitātes noteikšana

Attīrītu PTP1B enzīmu un tirozīna fosfopeptīdu (RRLIEDAEpYAARG) (Cat. 12-217, Merck KGaA) inkubēja BMOV un PK klātbūtnē. Reakciju apturēja, pievienojot fosfatāžu inhibitoru kokteili (PIC II). Fosfatāzes aktivitāti noteica reakcijas maisījumā (100 mM Hepes pH 7.5 (Cat A0302497, ACROS Organics™), 20 mM EDTA (Cat. 254045-500 g, Merck KGaA), 0.1% liellopa seruma albumīns, 0.015% Brij-35 (Cat. 8019621000, Merck KGaA)), mērot defosforilētā un fosforilētā peptīda attiecību, par standartu izmantojot gan tirozīna peptīda fosforilēto (RRLIEDAEpYAARG), gan defosforilēto (RR-src) (RRLIEDAEYAARG) (Cat. BML-P308-0001, Enzo Life Sciences, Inc., Lausanne, Austrija) formu. Peptīdu koncentrācijas noteikšanai izmantoja Waters Acquity šķīdumu hromatogrāfijas sistēmu (Waters UK, Elstre, Apvienotā Karaliste) un Waters Quattro Micro or Waters Xevo TQ-S masas spektrometru (Waters UK).

4.3. In vivo pētījumi

4.3.1. Dzīvnieku modeļi

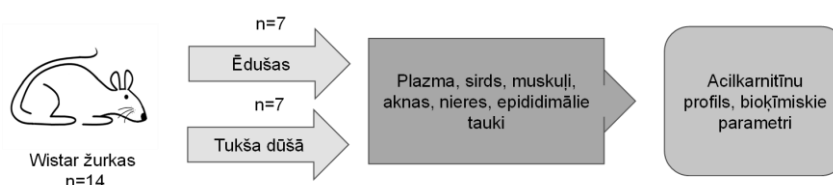
Visas eksperimentālās procedūras ar laboratorijas dzīvniekiem veica saskaņā ar Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU, kā arī tās saskaņoja ar Latvijas Republikas Pārtikas un veterināro dienestu un Dzīvnieku aizsardzības ētikas padomi. *In vivo* eksperimentus

aprakstīja saskaņā ar ARRIVE vadlīnijām (Kilkenny et al., 2010; McGrath et al., 2010). Dzīvniekus (peles un žurkas) turēja individuāli ventilējamos standarta sprostos ar skaidu pakaišiem un migas materiālu, pa pieciem dzīvniekiem katrā sprostā. Eksperimentāliem dzīvniekiem nodrošināja uzturēšanas standarta apstākļus (gaisa temperatūra 21–23 °C, relatīvais gaisa mitrums $65 \pm 10\%$, 12 h gaismas-tumsas cikls). Barībai izmantoja standartizēto diētu R70 (Lactamin AB, Mjölby, Zviedrija), ja vien atsevišķi nav norādīta speciāla barība. Barība un dzeramais ūdens bija pieejami bez ierobežojuma.

Kopumā eksperimentiem izmantoja 56 Wistar žurku tēviņus (320–350 g) un 21 CD1 peļu tēviņus (35–38 g), kurus iegādājās no Harlan Laboratories BV (Nīderlande), kā arī 20 C57bl/6N peļu tēviņus (7 nedēļas) (Envigo, Horsta, Nīderlande), 10 diabētisko db/db (BKS.Cg-+Lepr/+Lepr/OlaHsd) peļu tēviņus un līdzvērtīga vecuma 10 kontroles db/L peļu tēviņus (7 nedēļas) (Envigo). Eitanāzijai izmantoja dekapitāciju, lai izvairītos no anestēzijas izraisītiem blakusefektiem, kas varētu ietekmēt AK profilu, bet vienlaicīgi nodrošinātu audu paņemšanu, novēršot dzīvnieku ciešanas.

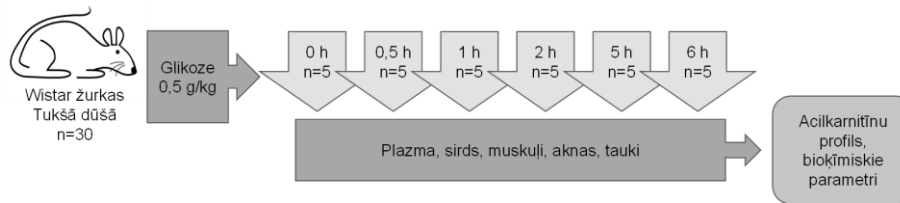
4.3.2. Acilkarniīnu profilu audos

Wistar līnijas žurkas pēc nejaušības principa sadalīja 2 eksperimentālajās grupās: postprandiālā ($n = 7$) un tukšas dūšas grupā ($n = 7$). Žurkām postprandiālā grupā pieeja ēdienam netika ierobežota, savukārt, tukšas dūšas grupā pieeju ēdienam liedza 18 h pirms eksperimenta. Pieeju ēdienam ierobežoja gaismas cikla beigās. No dzīvniekiem paņēma plazmu, sirdi, augšstilba muskuli, aknas, nieres, un epididimālos taukus (Attēls 7).



Attēls 7. Eksperimenta shēma acilkarniīnu profila noteikšanai audos tukšā dūšā un pēc ēšanas stāvoklī.

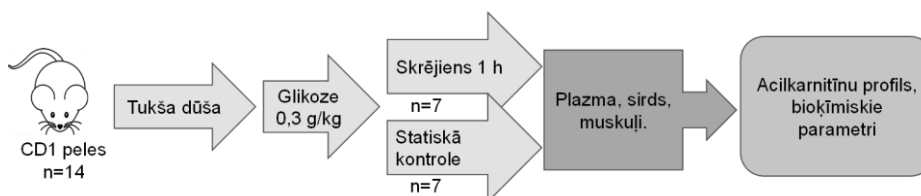
Lai veiktu GTT, izmantoja papildus 30 Wistar žurkas (5 dzīvnieki katrā laika punktā). Dzīvniekiem pirms GTT uz 18 h liedza pieeju barībai. Plazmu un audu paraugus (sirds, augšstilba muskulis, aknas, nieres un epididimālos taukus) paņēma 0; 0,5; 1; 2; 4 un 6 h pēc glikozes ievadīšanas un līdz mērījumu veikšanai uzglabāja -80°C (Attēls 8).



Attēls 8. Eksperimenta shēma acilkarnitīnu profila izmaiņu noteikšanai glikozes tolerances testa laikā.

4.3.3. Fiziskās slodzes ietekme uz orgānu acilkarnitīnu profilu

Fiziskās slodzes eksperimentam izmantoja piespiedu skriešanas/iešanas iekārtu (PsymCon Model 35500, Lafayette Instrument, Lafayette, ASV). Nedēļu pirms eksperimenta peles ($n = 14$) pakāpeniski pieradināja pie aparāta. Pirmajā un otrajā dienā pelēm lika iet 30 min ar ātrumu 3 m/min, trešajā – 40 min ar ātrumu 3,5 m/min, ceturtajā – 50 min ar ātrumu 4 m/min, un piektajā dienā peles skrēja 60 min ar ātrumu 5 m/min. Pelēm 18 h pirms eksperimenta liedza pieeju barībai. Lai nodrošinātu zemu sākotnējo AK līmeni plazmā, pelēm 30 min pirms skriešanas intraperitoneāli ievadīja glikozi (0,3 g/kg). Pēc 30 min 7 peles ievietoja skriešanas kamerā un lika skriet 60 min ar ātrumu 10 m/min, bet 7 atlikušās peles izmantoja kā mazkustīgo kontroles grupu. Pēc eksperimenta paņēma plazmu, sirdi un augšstilba muskuļus (Attēls 9). Paraugus iesaldēja šķidrā slāpekļā un līdz mērījumu veikšanai uzglabāja -80°C .

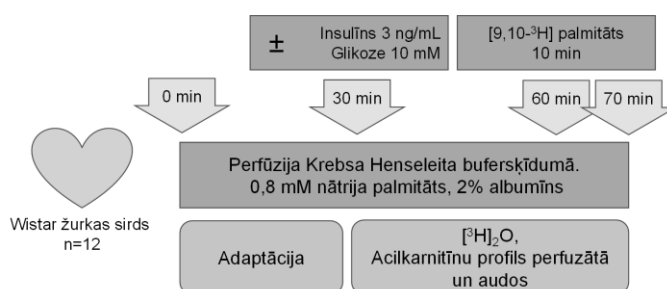


Attēls 9. Eksperimenta shēma, lai noskaidrotu fiziskās aktivitātes ietekmi uz acilkarnitīnu līmeni plazmā, sirdī un muskuļos.

4.3.4. Taukskābju oksidācijas un acilkarnitīnu efluksa noteikšana sirdī

Izolēto orgānu eksperimentam izmantoja 12 dzīvniekus. Radioiezīmētā palmitāta ($[9,10\text{-}^3\text{H}]\text{-palmitāts}$ (BioTrend, Ķelne, Vācija) (specifiskā aktivitāte, 60 Ci/mmol)) oksidēšanas ātrumu mērīja tukšā dūšā esošu Wistar žurku sirdīs. Žurkas anestezēja, ievadot nātrija pentobarbitāla (60 mg/kg i.p.) (Alfasan, Verdena, Nīderlande) un heparīna (Panpharma, Luitre-Dompīra, Francija) (1000 IU/kg) šķīdumu. Sirdis izgriezta un caur aortu perfuzēja ar oksigenētu (95% O_2 - 5% CO_2) perfūzijas šķīdumu ar konstantu spiedienu 70

mmHg. Sirdis 30 min perfuzēja ar Krebsa-Henseleita (KH) buferšķīdumu (118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,52 mM CaCl₂ (Cat. 207780010, ACROS Organics™), 1,64 mM MgCl₂ (Cat. 246964, Merck KGaA), 24,88 mM NaHCO₃ (Cat. 447100010, ACROS Organics™), 1,18 mM KH₂PO₄ un 0,05 mM EDTA, pH 7,4 37°C temperatūrā). Lai imitētu tukšās dūšas stāvokli, izmantoja buferšķīdumu, kas saturēja 0,8 mM nātrija palmitātu (Cat. P0007, TCI Chemicals, Antverpene, Beļģija), 2% liellopa seruma albumīnu, 5 mM glikozi (Cat. B05CX01, Fresenius, Runkorna, Apvienotā Karaliste) un 0,3 ng/mL insulīnu. Lai atdarinātu pāreju no tukšās dūšas uz postprandiālo stāvokli, perfūzijas buferšķīdumu papildināja ar glikozi (10 mM gala koncentrācija) un insulīna aspartu (3 ng/mL). Pēc 1 h ilgas perfūzijas buferšķīdumu uz 10 min nomainīja uz KH buferšķīdumu ar ([9,10-³H] palmitātu. Palmitāta oksidāciju noteica, mērot [³H]₂O izdalīšanos no metabolizētā palmitāta. Papildus tam paņēma perfuzātu, kurā pēc tam mērīja AK profilu, lai noteiktu AK efluksu no sirds (Attēls 10).



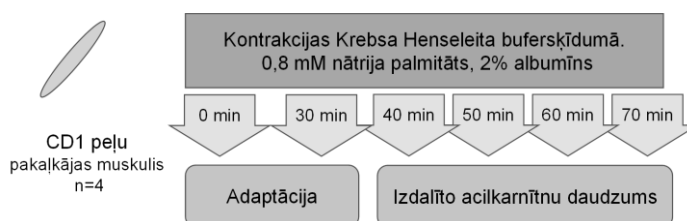
Attēls 10. Eksperimenta shēma acilkarnitīnu profila izmaiņu noteikšanai izolētās sirds modelī.

4.3.5. Enerģijas metabolisma noteikšana muskuļos

Muskuļu enerģijas metabolisma īpašības novērtēja ar netiešo gāzu kalorimetriju, izmantojot PhenoMaster sistēmu pelēm (TSE Systems, Berlīne, Vācija). Ar PhenoMaster sistēmu noteica arī uzņemto barības un ūdens daudzumu. Peles (n = 5) sākotnēji 72 h adaptēja PhenoMaster sistēmā. Adaptētajām pelēm 16 h pirms glikozes ievadīšanas (0,5 mg/kg i.p.) liedza pieeju barībai. Mērot skābekļa patēriņu (VO₂) un oglekļa dioksīda veidošanos (VCO₂), aprēķināja elpošanas koeficientu (RER), kas parāda enerģijas metabolisma profilu skeleta muskuļos.

Izolēto muskuļu eksperimentam augšstilba muskuli izolēja un pārnesa uz ledusaukstu KH buferšķīdumu. Tālāk muskuli pievienoja pie spēka sensora, pozicionējot starp diviem platīna gredzeniem, lai muskuli būtu iespējams elektriski stimulēt un reģistrēt muskuļa kontrakcijas. Muskuli sākotnēji optimāli iestiepa, kam sekoja stimulācija ar supra-maksimālu

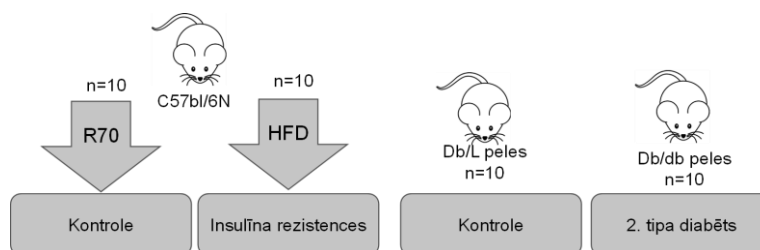
spriegumu. Muskuļu kontrakciju eksperimentu veica KH buferšķīdumā, kas saturēja 0,8 mM nātrija palmitātu, kas konjugēts ar 2% liellopa seruma albumīnu, 5 mM glikozi, un 0,3 ng/mL insulīnu. Izolēto muskuļu adaptācija ilga 30 min, pēc kuras ik pa 10 min paņēma buferšķīdumu, lai noteiktu AK efluksu no muskuļa (Attēls 11).



Attēls 11. Eksperimenta shēma acilkarnītiņu izplūšanas noteikšanai no izolēta, kontrahējoša muskuļa.

4.3.6. Insulīna rezistences un diabēta eksperimentālie modeļi

Eksperimentiem izmantoja 20 C57bl/6N peļu tēviņus (Envigo), kurus pēc nejaušības principa iedalīja 2 grupās. Kontroles C57bl/6N grupa (n = 10) 8 nedēļas saņēma standarta R70 barību (Lantmännen, Stoholma, Zviedrija). Otrai grupai (n = 10) izraisīja insulīna rezistenci, 8 nedēļas dodot HFD (21% tauki un 0,15% holesterīns) (Special Diets Services, Horlija, Apvienotā Karaliste) (Attēls 12). Papildus eksperimentam izmantoja 10 db/db (BKS.Cg-+Lepr^{db}/+Lepr^{db}/OlaHsd) peļu tēviņus ar izteiktu 2. tipa diabētu un līdzvērtīga vecuma 10 kontroles normoglikēmiskus peļu db/L tēviņus (Envigo).

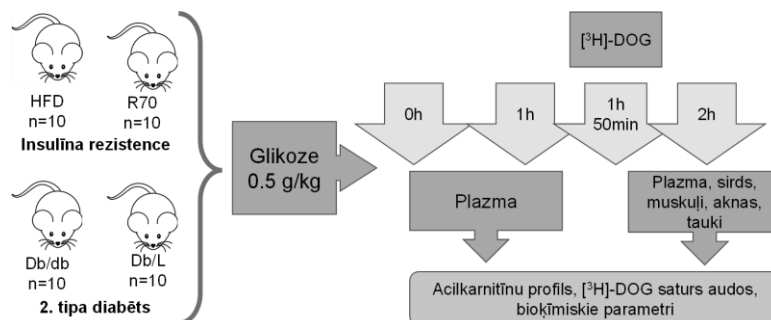


Attēls 12. Eksperimentālo 2. tipa diabēta un insulīna rezistences modeļu izveide.

4.3.6. Glikozes tolerances tests un glikozes uzņemšana audos

Lai veiktu glikozes tolerances testu, pelēm 16 h pirms eksperimenta sākuma liedza pieeju barībai. Eksperimenta sākumā tukšā dūšā paņēma asins paraugu, tad intraperitoneāli ievadīja glikozes šķīdumu (0,5 g/kg ķermeņa svara) un paņēma asins paraugus 1 un 2 h pēc glikozes ievadīšanas. Lai noteiktu no insulīna atkarīgo glikozes transportu audos, pelēm 1 h 50 min pēc glikozes ievadīšanas zemādā ievadīja fizioloģisko šķīdumu, kas saturēja 1 μ Ci 2-[1,2-³H]-dezoksi-D-glikozes (BioTrend) (³H]-DOG), specifiskā aktivitāte, 60 Ci/mmol).

Pēc 10 minūtēm peles dekapitēja un paņēma sirds, skeleta muskuļu un taukus. Visus paraugus līdz mērījumu veikšanai uzglabāja -80°C (Attēls 13).



Attēls 13. Eksperimenta shēma insulīna rezidences un 2. tipa diabētam raksturīgās audu specifiskās insulīna rezidences noteikšanai.

4.3.7. Bioķīmisko parametru noteikšana plazmā un audos

AK profilu plazmas un audu paraugos noteica, izmantojot Waters Acquity šķīdumu hromatogrāfijas sistēmu un Waters Quattro Micro vai Waters Xevo TQ-S masas spektrometru (Liepinsh et al., 2017). AK koncentrācijas plazmā izteiktas μM vienībās, savukārt, audos kā nmol/mg audu. AK daudzumu orgānos aprēķināja, ņemot vērā kopējo orgāna svaru vai plazmas tilpumu. Plazmas brīvo taukskābju koncentrāciju noteica, izmantojot komerciāli pieejamo enzimatiskās reakcijas testēšanas komplektu (Wako, Hamburga, Vācija) saskaņā ar ražotāja instrukcijām. Glikozes daudzumu asinīs noteica, izmantojot MediSense Optium (Abbott Diabetes Care, Londona, Lielbritānija) glikozes mērītāju un testu strēmeles. Plazmas insulīna koncentrāciju noteica, izmantojot žurku/peļu insulīna ELISA komplektu (Merck KGaA). HbA1c koncentrāciju noteica ar automatizēto hemoglobīna testēšanas sistēmu (DCA Vantage Analyzer, Londona, Apvienotā Karaliste).

4.4. Statistiskā analīze

Datu apkopošanai un analīzei lietoja vispārpieņemtās statistikas metodes, izmantojot programmu GraphPad Prism (GraphPad, Inc., San Djego, Kalifornija, ASV).

In vitro šūnu eksperimentos rezultāti izteikti kā vidējās vērtības \pm standartnovirze. Lai noteiktu datu atbilstību normālsadalījumam, izmantoja Šapīro-Vilka (*Shapiro-Wilk*) normālsadalījuma testu. Ja datu izkliede atbilda normālsadalījumam, statistisko ticamību noteica izmantojot vienvirziena dispersijas analīzi ar Duneta (*Dunnett's*) vairākkārtējo salīdzinājumu testu, bet ja datu izkliede neatbilda normālsadalījumam, izmantoja Kruskala-Valisa (*Kruskal-Wallis*) testu ar Dunna (*Dunn's*) vairākkārtējo salīdzinājumu testu.

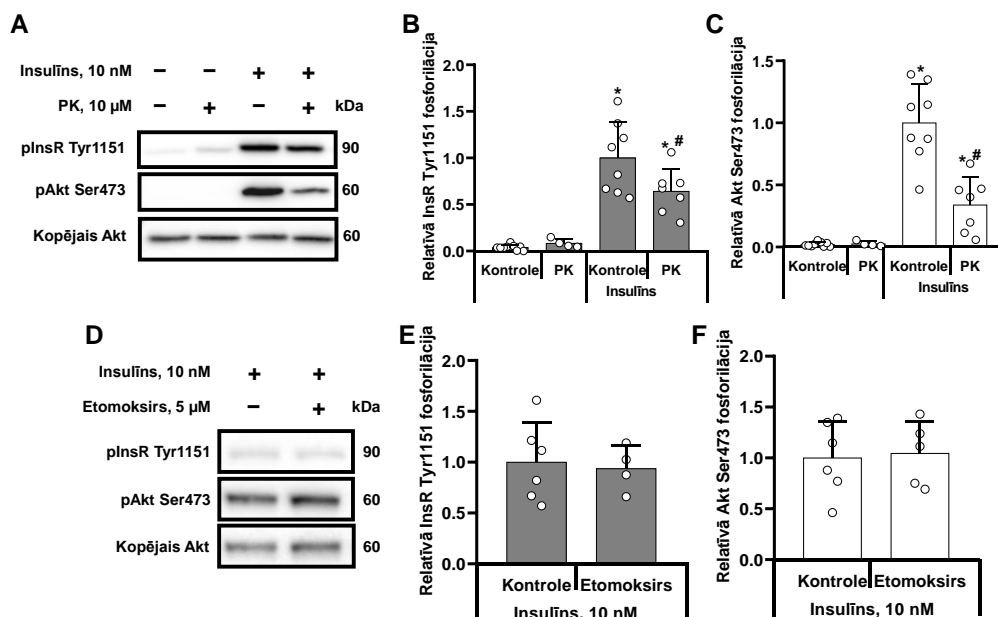
Rezultātus, kurus ieguva no *in vivo* un *ex vivo* eksperimentiem, izteica kā vidējās vērtības \pm vidējo standartkļūdu (*standard error of the mean*) (SEM). Statistikas testiem izmantoja Stjūdenta t-testu vai vienvirziena dispersijas analīzi ar Tukija (*Tukey's*) pēctestu. Rezultātus uzskatīja par ticamiem, ja $p < 0,05$.

5. Rezultāti

5.1 Garķēžu acilkarnitīnu ietekme uz insulīna signālceļu

5.1.1 *Palmitoilkarnitīna ietekme uz InsR un Akt fosforilāciju*

CHO šūnu stimulācija ar 10 nM insulīnu palielināja InsR Tyr1151 fosforilāciju 25 reizes (Attēls 14A, B) un Akt Ser473 fosforilāciju 47 reizes (Attēls 14A, C). Kad šūnas tika stimulētas ar insulīnu 10 μ M PK klātbūtnē, InsR Tyr1151 fosforilācijas līmenis samazinājās par $35 \pm 24\%$ ($p < 0,05$) salīdzinājumā ar insulīna stimulētām šūnām (Attēls 14B). PK pievienošana šūnu videi samazināja arī insulīna izraisīto Akt Ser473 fosforilāciju par $66 \pm 12\%$ ($p < 0,05$) (Attēls 14C). Insulīna stimulētās šūnās CPT1 inhibitors, etomoksirs, nesamazināja InsR Tyr1151 un Akt Ser473 fosforilāciju, norādot uz to, ka iekššūnas AK līmenis neietekmē insulīna signālceļu (Attēls 14D, E, F). Iegūtie rezultāti ļauj secināt, ka PK klātbūtne ievērojami samazina insulīna izraisīto InsR un Akt Ser473 fosforilāciju.

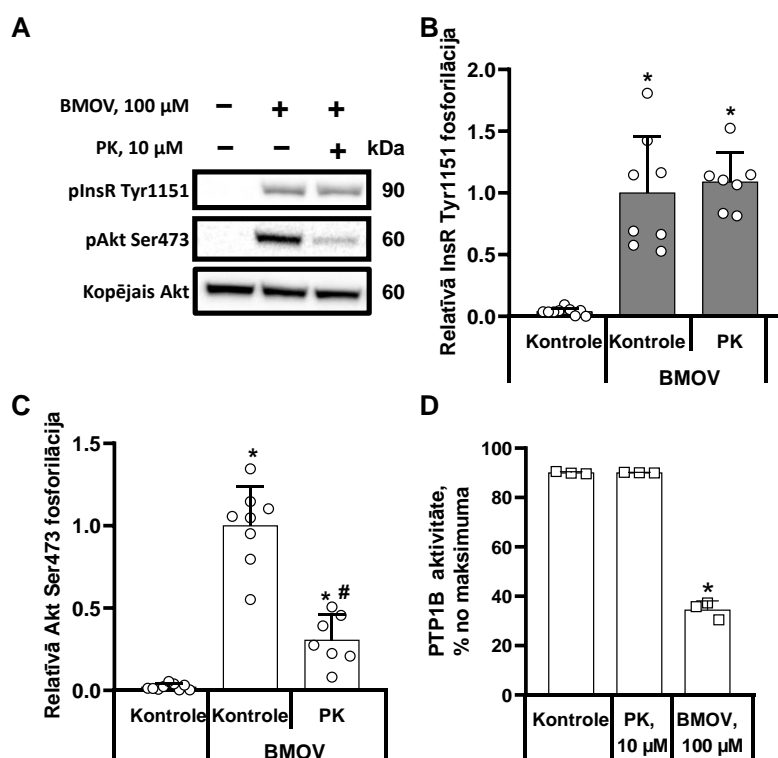


Attēls 14. Palmitoilkarnitīna (PK) un etomoksira ietekme uz InsR un Akt fosforilāciju insulīna stimulētās CHO InsR 1248 šūnās. CHO InsR 1284 šūnas 10 min inkubētas DMEM LG vidē ar 10 nM insulīnu un 10 μM PK. InsR Tyr1151 (B, E) un Akt Ser473 (C, F) fosforilācijas līmenis nestimulētās šūnās ir ļoti zems, un 10 μM PK pievienošana neizraisīja detektējamas izmaiņas Akt fosforilācijā. Galvenā uzmanība tika veltīta insulīna izraisītajai InsR Tyr1151 un Akt Ser473 fosforilācijai, kura ievērojami samazinājās 10 μM PK klātbūtnē. Reprēzentatīvās Western blota joslas no insulīna stimulētajām šūnām (B, C, D, E). Relatīvā InsR Tyr1151 un Akt Ser473 fosforilācija aprēķināta pret kopējo Akt joslas intensitāti katrā paraugā. Insulīna stimulētās grupas vidējā vērtība tika pieņemta par 1. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības ± standartnovirze. Paraugu skaits B un C paneļos: kontrole n = 9, PK n = 4, insulīna kontrole n = 8, insulīns + PK n = 7. Paraugu skaits E panelī: insulīna grupa n = 6, insulīns + etomoksirs n = 4, Paraugu skaits F panelī: insulīna grupa n = 6, insulīns + etomoksirs n = 5. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar kontroles grupu, # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar insulīna stimulēto grupu, (vienfaktora dispersijas analīze, Tukija tests).

5.1.2. PTP1B inhibīcija novērš palmitoilkarnitīna izraisītos efektus

Lai pārlicinātos, vai PK izraisītajam InsR fosforilācijas samazinājumam nepieciešama PTP1B iesaiste, tika izmantots vanādiju saturošs insulīna mimētiķis BMOV, kas paaugstina InsR fosforilācijas līmeni, inhibējot PTP1B. PK (10 μM) pievienošana BMOV (100 μM) stimulētām šūnām neizraisīja izmaiņas InsR Tyr1151 fosforilācijas intensitātē (Attēls 15B), liecinot par PTP1B iesaisti PK izraisītajā InsR Tyr1151 defosforilācijā. Neskatoties uz saglabāto InsR Tyr1151 fosforilācijas līmeni, PK klātbūtnē tika novērota par $69 \pm 15\%$ ($p < 0,005$) samazināta Akt Ser473 fosforilācija salīdzinājumā ar BMOV stimulēto kontroli

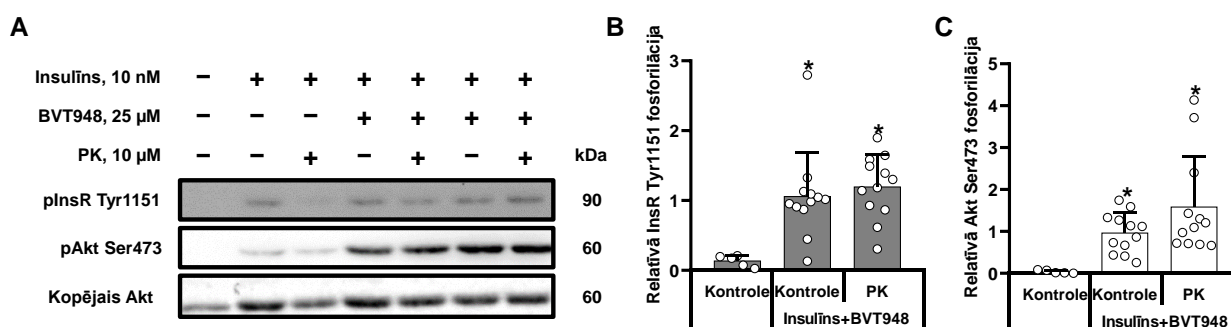
(Attēls 15C). Iegūtie rezultāti ļauj secināt, ka PK samazina BMOV izraisīto Akt Ser473 fosforilāciju neatkarīgi no InsR Tyr1151 fosforilācijas pakāpes.



Attēls 15. Palmitoilkarnitīna (PK) ietekme uz InsR un Akt fosforilāciju BMOV stimulētās CHO InsR 1248 šūnās un PTP1B aktivitāti *in vitro*. CHO šūnas tika inkubētas 1 h ar 100 μM BMOV, un 10 min pirms šūnu paņemšanas tika pievienots 10 μM PK. Ar BMOV stimulētās CHO InsR 1248 šūnās InsR Tyr1151 un Akt Ser473 fosforilācijas intensitāte ir līdzvērtīga tai, kāda tika novērota ar insulīnu stimulētās šūnās. BMOV stimulācijas rezultātā PK samazināja Akt Ser473 fosforilāciju, bet InsR Tyr1151 fosforilācija netika ietekmēta. Reprēzentatīvās Western blota joslas BMOV stimulētās šūnās (A). Relatīvā InsR Tyr1151 un Akt Ser473 fosforilācija aprēķināta pret kopējo Akt joslas intensitāti katrā paraugā. Attīrīta PTP1B enzīma aktivitāte PK un BMOV klātbūtnē (D). BMOV stimulētās grupas vidējā vērtība tika pieņemta par 1. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības ± standartnovirze. Paraugu skaits grupā BC panelī: kontrole n = 9, BMOV n = 8, BMOV+PK n = 7. Paraugu skaits D panelī, kontrole n = 4, BMOV n = 4, PK n = 4. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar kontroles grupu, # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar BMOV stimulēto grupu, (vienfaktora dispersijas analīze, Tukija tests) (p<0,05).

Tā kā BMOV izraisītās PTP1B inhibīcijas rezultātā PK nesamazināja InsR Tyr1151 fosforilāciju, tika pārbaudīta PK ietekme uz attīrīta PTP1B enzīma aktivitāti. BMOV 100 μM koncentrācijā samazināja PTP1B aktivitāti par 62 ± 4% (Attēls 15D), bet 10 μM PK klātbūtnē PTP1B aktivitātes izmaiņas netika novērotas. Šie rezultāti norāda uz to, ka PK, visticamāk, netieši aktivē PTP1B, izraisot InsR Tyr1151 defosforilāciju. PTP1B iesaiste PK

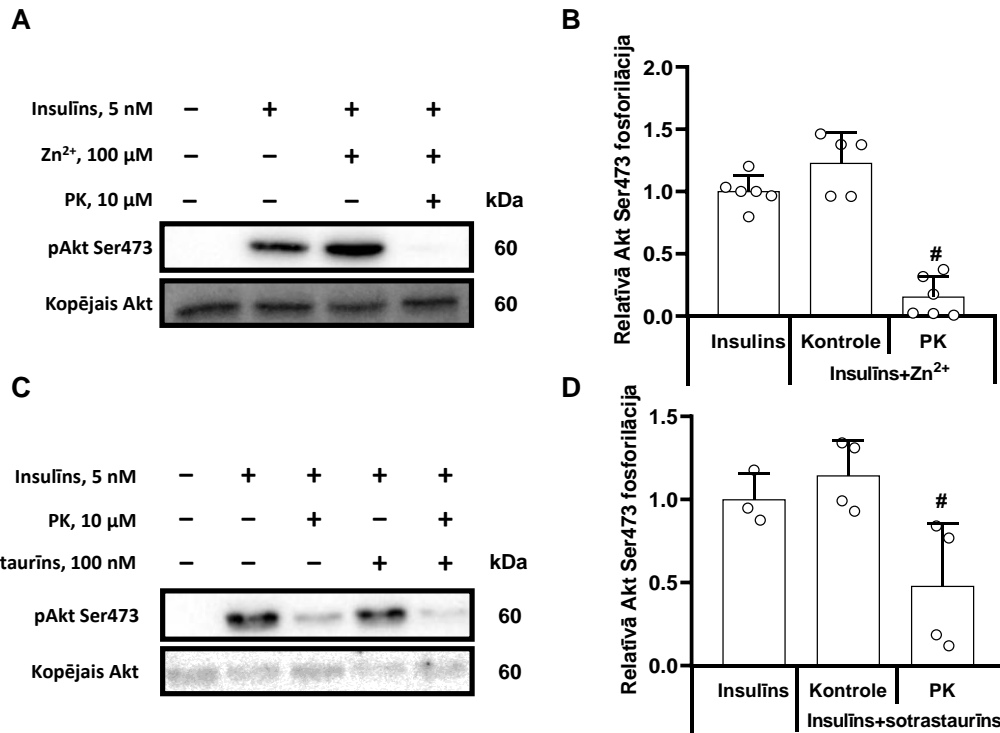
izraisīto efektu nodrošināšanā tika pārbaudīta izmantojot nekonkurējošo PTP1B inhibitoru BVT948. Insulīna stimulētās šūnās BVT948 pilnībā novērsa PK izraisīto InsR Tyr1151 un Akt Ser473 defosforilāciju (Attēls 16), tādējādi apstiprinot PTP1B iesaisti garķēžu AK izraisīto efektu nodrošināšanā.



Attēls 16. BVT948 ietekme uz palmitoilkarnitīna (PK) izraisītajām izmaiņām insulīna stimulētās CHO InsR 1248 šūnās. CHO šūnas 50 min tika inkubētas ar 25 μM BVT948, kam sekoja 10 min ilga insulīna (10 nM) stimulācija 10 μM PK klātbūtnē. BVT948 klātbūtnē PK vairs nesamazināja InsR Tyr1151 (B) un Akt Ser473 (C) fosforilāciju. Relatīvā InsR Tyr1151 un Akt Ser473 fosforilācija aprēķināta pret kopējo Akt joslas intensitāti katrā paraugā. Insulīna+BVT948 grupas vidējā vērtība tika pieņemta par 1. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības ± standartnovirze. Paraugu skaits grupā: kontrolē n = 5, insulīna+BVT948 kontrolē n = 12, insulīns+BVT948+PK n = 12. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar kontrolē grupu (Kruskala-Valisa tests, Dunna daudzkārtējās salīdzināšanas tests (p<0,05)).

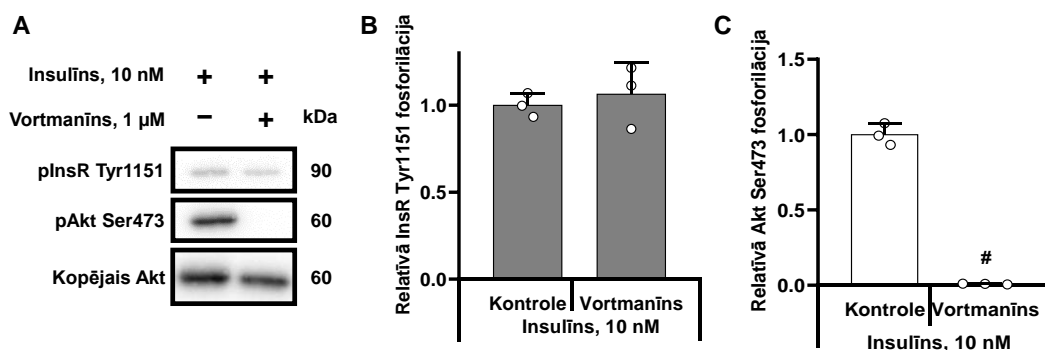
5.1.3. PKC un PP2A nepiedalās palmitoilkarnitīna efektu nodrošināšanā

Lai pārlicinātos, vai PK izraisītos efektus nodrošina ar Akt fosforilāciju saistītie enzīmi PKC un PP2A, tika izmantoti šo fosfatāžu inhibitori. Šūnu inkubācija ar PP2A inhibitoru cinka sulfātu (Attēls 17A, B) un no DAG atkarīgās PKC izoformas inhibitoru sotrastaurīnu (Attēls 17CD) būtiski neietekmēja insulīna (5 nM) izraisīto Akt Ser473 fosforilāciju. PK (10 μM) pievienošana insulīnam Zn²⁺ klātbūtnē izraisīja Akt Ser473 fosforilācijas samazinājumu (Attēls 17A, B). Šie rezultāti norāda, ka PP2A nepiedalās PK izraisītajā Akt Ser473 defosforilācijā (Attēls 17B). Šūnas inkubējot ar insulīna un sotrastaurīna kombināciju, tika novēroti līdzīgi rezultāti, jo arī 100 nM sotrastaurīna pievienošanai nebija ietekmes uz PK izraisīto Akt Ser473 fosforilācijas samazinājumu (Attēls 17D). Šie rezultāti ļauj secināt, ka PK izraisītais efekts nav saistīts ar no DAG atkarīgajām PKC izoformām.



Attēls 17. Sotrastaurīna un Zn²⁺ ietekme uz palmitoilkarnitīna (PK) izraisītajiem efektiem ar insulīnu stimulētās CHO InsR 1248 šūnās. CHO šūnas tika 1 h inkubētas DMEM LG barotnē, kas saturēja 100 μM cinka sulfātu (A) vai 100 nM sotrastaurīnu (C), kam sekoja 10 min inkubācija ar 10 μM PK, 5 nM insulīnu un attiecīgo inhibitoru. Tā kā gan PP2A, gan PKC regulē Akt nevis InsR fosforilāciju, šajos eksperimentos tika mērītas PK izraisītās izmaiņas tikai Akt Ser473 fosforilācijā. Gan cinka sulfāta, gan sotrastaurīna kombinācija ar insulīnu nenovērsa PK izraisīto Akt Ser473 fosforilācijas samazinājumu. Reprēzentatīvās Western blota joslas insulīna stimulētām CHO šūnām 100 μM cinka sulfāta (A, B) vai 100 nM sotrastaurīna (C, D) klātbūtnē. Relatīvā Akt Ser473 fosforilācija aprēķināta pret kopējo Akt joslas intensitāti katrā paraugā. Insulīna stimulētās grupas vidējā vērtība tika pieņemta par 1. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības ± standartnovirze. Paraugu skaits panelī B: insulīns $n = 6$, Zn²⁺ + insulīns $n = 5$, PK + Zn²⁺ + insulīns $n = 6$. Paraugu skaits panelī D: insulīns $n = 3$, sotrastaurīns + insulīns $n = 4$ un PK + sotrastaurīns + insulīns $n = 4$. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar kontroles grupu, # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar insulīna stimulēto grupu, (vienfaktora dispersijas analīze, Tukiya tests) ($p < 0,05$).

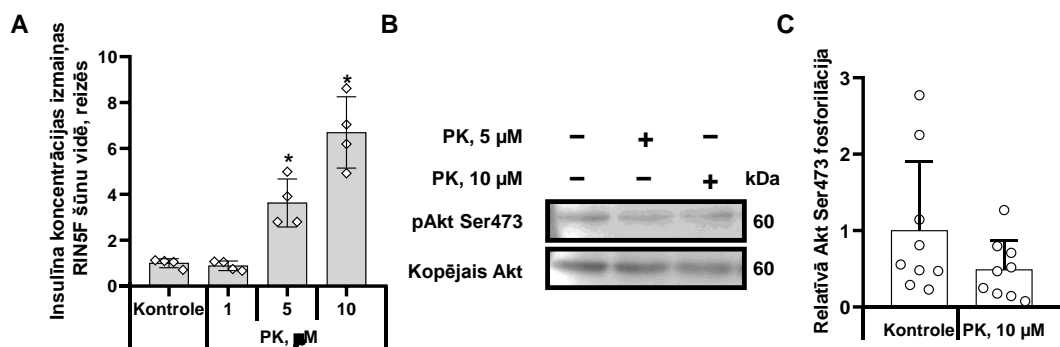
Vortmanīna klātbūtnē InsR aktivitāte nav ietekmēta (Attēls 18A, B), bet insulīna signāls nerasniedz Akt (Attēls 18 A, C), jo vortmanīns bloķē fosfoinozīda atkarīgās kināzes, tajā skaitā arī PI3K, kas piedalās signāla pārnēsē starp InsR un Akt.



Attēls 18 Vortmanīna izraisītie efekti ar insulīnu stimulētās CHO InsR 1248 šūnās. CHO šūnas tika 1 h inkubētas DMEM LG barotnē, kas saturēja 1 μM vortmanīnu, kam sekoja 10 min stimulācija ar 10 nM insulīnu. PI3K inhibitors vortmanīns neietekmēja InsR Tyr1151 fosforilāciju (A, B), bet pilnībā novērsa insulīna stimulēto Akt Ser473 fosforilāciju (A, C). Relatīvā InsR Tyr1151 (B) un Akt Ser473 (C) fosforilācija aprēķināta pret kopējo Akt joslas intensitāti katrā paraugā. Insulīna stimulētās grupas vidējā vērtība tika pieņemta par 1. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības ± standartnovirze. Paraugu skaits: insulīns n = 6, Zn²⁺ + insulīns n = 5, PK + Zn²⁺ + insulīns n = 6. Paraugu skaits panelī D: insulīns n = 3, insulīns + vortmanīns n = 3. # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar insulīna stimulēto grupu, (Stjūdenta tests) (p<0,05).

5.1.4. Palmitoilkarnitīns palielina insulīna sekrēciju

Lai precizētu garķēžu AK izraisītās hiperinsulinēmijas mehānismus, tika izmantota insulīnu producējošā RIN5F šūnu līnija. Inkubējot RIN5F šūnas vidē ar PK, tika novērots no koncentrācijas atkarīgs insulīna sekrēcijas pieaugums (Attēls 19A). Zemākā PK koncentrācija (1 μM) neizraisīja papildu insulīna izdalīšanos, savukārt, 5 μM un 10 μM PK veicināja insulīna sekrēciju, palielinot tā daudzumu šūnu vidē 3,6–6,7 reizes salīdzinājumā ar kontroles grupu (Attēls 19A). Neskatoties uz to, ka insulīna koncentrācija šūnu vidē bija paaugstināta aptuveni 7 reizes, netika novērotas statistiski būtiskas izmaiņas Akt Ser473 fosforilācijas intensitātē (Attēls 19B, C). Ņemot vērā augsto insulīna koncentrāciju un nemainīgo Akt Ser473 fosforilācijas intensitāti, rezultāti liecina par to, ka PK klātbūtnē šūnu spēja detektēt insulīnu ir apgrūtināta, kā rezultātā ir nepieciešama daudz augstāka insulīna koncentrācija, lai sasniegtu insulīna sekrēcijas apturēšanai nepieciešamo Akt Ser473 fosforilācijas līmeni (Attēls 19C).



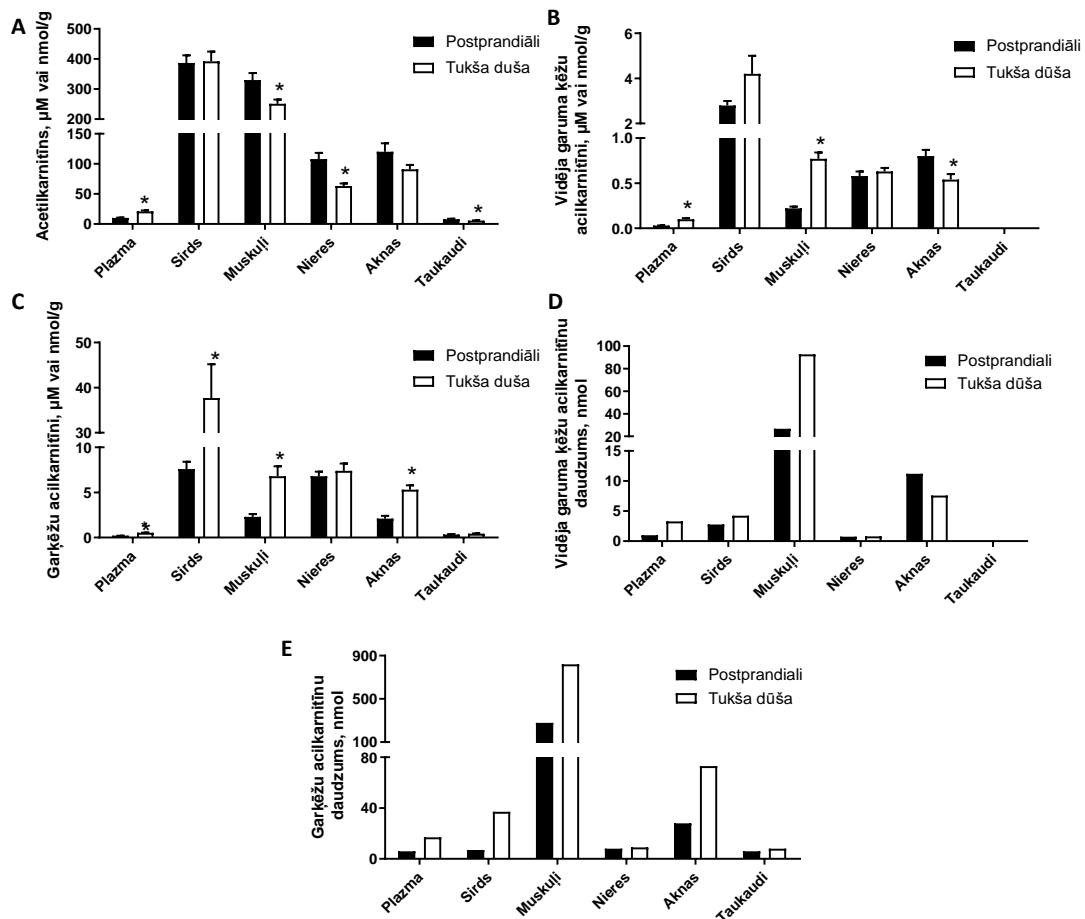
Attēls 19. Palmitoilekarnitīna (PK) izraisītie efekti RIN5F šūnu līnijā. RIN5F šūnas tika 1 h inkubētas vidē ar dažādām PK koncentrācijām. Insulīna sekrēcija PK klātbūtnē (A). Reprēzentatīvās Western blota joslas RIN5F šūnās (B). Neskatoties uz to, ka statistiski būtiskas izmaiņas Akt Ser473 fosforilācijā starp grupām nebija novērojamas, RIN5F šūnu sekretētā insulīna koncentrācija proporcionāli pieauga, palielinoties PK koncentrācijai. Relatīvā Akt Ser473 fosforilācija aprēķināta pret kopējo Akt joslas intensitāti katrā paraugā. Insulīna sekrēcijas intensitāte PK klātbūtnē ir ievērojami palielināta, salīdzinot ar kontroles grupu (C). Kontroles grupas vidējā vērtība tika pieņemta par 1. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības ± standartnovirze. Paraugu skaits A panelī: kontrole $n = 4$, PK 1 μM $n = 4$, PK 5 μM $n = 4$, PK 10 μM $n = 4$. Paraugu skaits C panelī: kontrole $n = 9$, PK 10 μM $n = 9$. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar kontroles grupu (vienfaktora dispersijas analīze, Tukija tests) ($p < 0,05$).

5.2. Acilkarnitīnu plazmas profila veidošanās

5.2.1 Acilkarnitīnu koncentrācijas izmaiņas tukšā dūšā

Salīdzinot AK koncentrāciju starp dažādiem orgāniem, augstākā AK koncentrācija bija novērojama žurku sirdī (390–430 nmol/g) un muskuļos (250–350 nmol/g), savukārt, viszemākā AK koncentrācija bija novērojama plazmā (10–25 μM) un taukaudos (6–8 nmol/g) (Attēls 20). Kopumā organismā vislielākais AK daudzums ir skeleta muskuļos, aknās un sirdī (Attēls 20D, E). Neskatoties uz sirds nelielo izmēru, AK daudzums sirdī bija līdzvērtīgs AK daudzumam asinsritē. Īšķēžu, vidēja garuma un garķēžu AK koncentrācijas plazmā bija 2,1, 3,4 un 2,6 reizes augstākas tukšā dūšā salīdzinājumā ar ēdušiem dzīvniekiem (Attēls 20C, D, E). Sirdī tukšā dūšā vidējo ķēžu AK daudzums bija par 53% ($p = 0,09$) (Attēls 20B) augstāks, kamēr garķēžu AK daudzums gandrīz 5 reizes palielināts (Attēls 20C), salīdzinājumā ar ēdušiem dzīvniekiem. Skeleta muskuļos īšķēžu AK daudzums tukšā dūšā bija par 24% zemāks nekā ēdušiem dzīvniekiem (Attēls 20A), savukārt, vidējo ķēžu un garķēžu AK koncentrācijas muskuļos bija attiecīgi 3,5 un 2,9 reizes augstākas nekā pēc ēšanas (Attēls 20B, C). Aknās tukšā dūšā bija novērojams acetil- un vidējo ķēžu AK koncentrācijas kritums

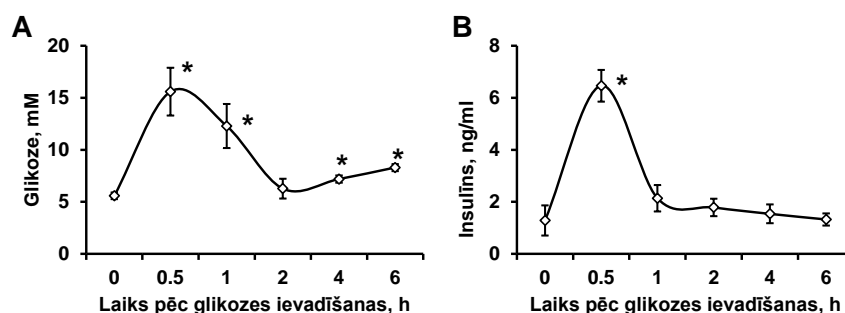
par 21-32% (Attēls 20A, B), kamēr garķēžu AK daudzums bija 2,5 reizes lielāks (Attēls 20C). Acetilkarņitīna daudzums epididimālajos taukaudos tukšā dūšā bija par 30% zemāks nekā ēdušā stāvoklī (Attēls 20A), kamēr izmaiņas garķēžu AK daudzumā nebija statistiski būtiskas. Salīdzinot ar dzīvniekiem postprandiālā stāvoklī, acetilkarņitīna daudzums nierēs tukšā dūšā bija par 40% zemāks (Attēls 20A), savukārt, vidēja garuma un garķēžu AK daudzums nebija izmainīts (Attēls 20B, C). Izmaiņas vidēja garuma un garķēžu AK koncentrācijā plazmā, bija līdzīgas AK daudzuma izmaiņām sirdī (Attēls 20D, E), norādot, ka AK profila izmaiņas sirdī varētu ietekmēt plazmas AK profilu. Kopumā šie rezultāti parāda, ka visizteiktākās AK koncentrāciju atšķirības starp tukšas dūšas un ēdušu stāvokli bija audos ar visizteiktāko metabolās pielāgošanās spēju: sirdī, skeleta muskuļos un aknās. Tā kā plazmas AK koncentrācijas izmaiņas, īpaši vidējo ķēžu un garķēžu AK, atspoguļoja AK profila izmaiņas šajos audos, plazmas AK koncentrācija varētu būt nozīmīgs marķieris, lai spriestu par AK saturu audos.



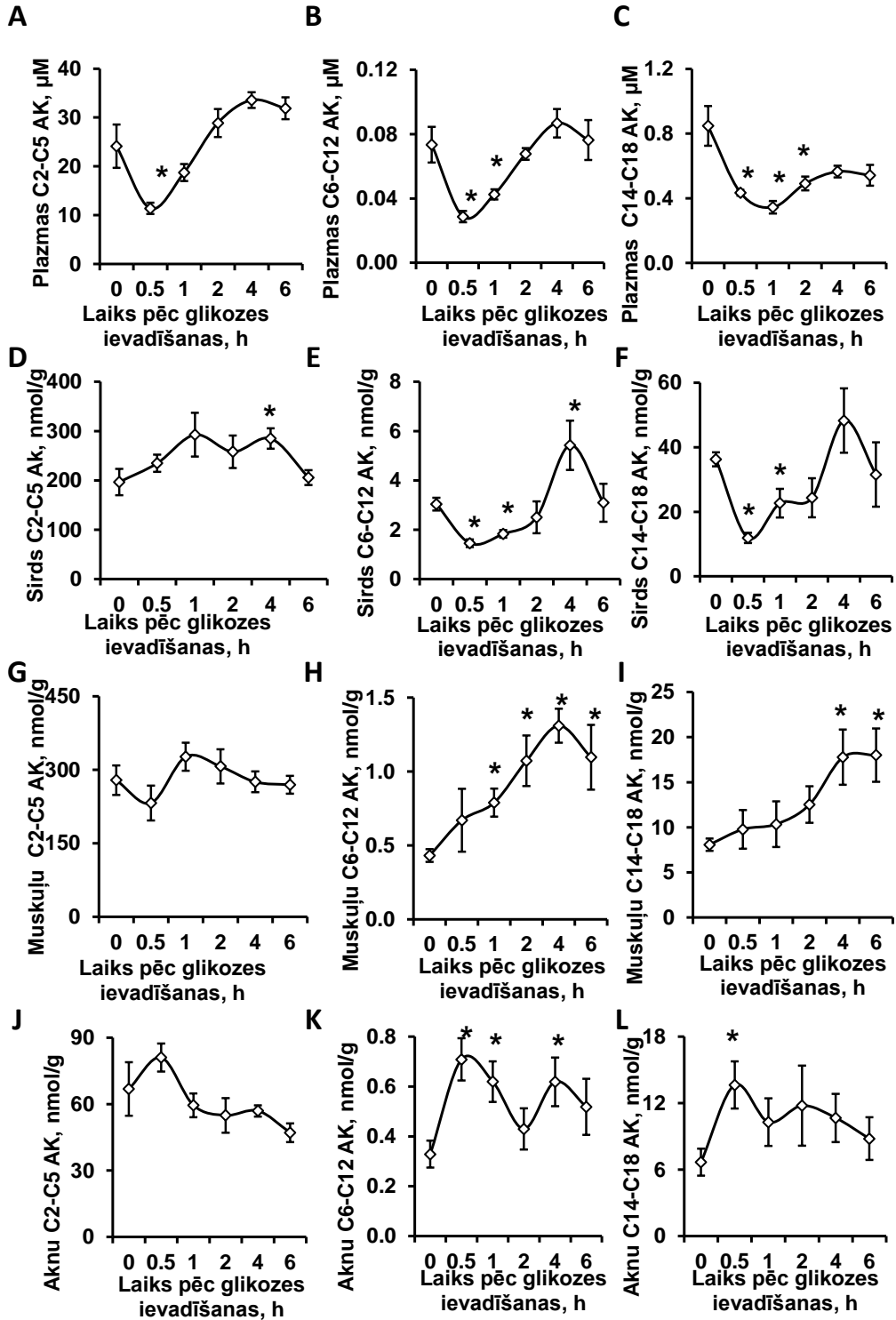
Attēls 20. Acilkarnitīnu (AK) koncentrācijas un kopējie daudzumi plazmā un orgānos tukšā dūšā un postprandiālā stāvoklī. Tukšā dūšā acetilkarnitīna koncentrācija bija ievērojami augstāka plazmā, bet samazināta skeleta muskuļos, nierēs un taukaudos (A). Vidējo ķēžu AK koncentrācija dzīvniekiem tukšā dūšā bija paaugstināta plazmā, sirdī un skeleta muskuļos, bet samazināta aknās (B). Garķēžu AK koncentrācija bija paaugstināta plazmā, sirds un skeleta muskuļos kā arī aknās tukšā dūšā (C). Visaugstākās vidējo ķēžu (D) un garķēžu (E) AK koncentrācijas tika novērotas sirdī, skeleta muskuļos un aknās, turklāt AK daudzums plazmā bija līdzvērtīgs AK daudzumam sirdī. Rezultāti izteikti kā vidējās vērtības \pm SEM no 7 dzīvniekiem. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar tukšu dūšu (Stjūdentu t-tests, $p < 0,05$).

5.2.2. Acilkarnitīnu koncentrācijas izmaiņas glikozes tolerances testa laikā

Lai novērtētu, vai plazmas AK profila mērījumus var izmantot, lai spriestu par AK profilu audos, glikozes tolerances testa laikā tika mērīts AK saturs sirdī, muskuļos un aknās, meklējot iespējamo saistību starp šo audu un plazmas AK profiliem. GTT laikā ievērojams glikozes un insulīna koncentrācijas pieaugums tika novērots 30 min pēc glikozes ievadīšanas, kam sekoja strauja glikozes un insulīna koncentrācijas samazināšanās, gandrīz sasniedzot sākotnējo līmeni (Attēls 21A, B). Atšķirībā no glikozes un insulīna koncentrācijas visa garuma ķēžu AK koncentrācija plazmā samazinājās 30 min pēc glikozes ievadīšanas, un pēc tam pakāpeniski to koncentrācijas pieauga (Attēls 22A, B, C). Tā kā īsķēžu AK var veidoties gan glikozes, gan aminoskābju un taukskābju metabolisma rezultātā, GTT testa laikā īsķēžu AK līmeņa izmaiņas pārbaudītajos audos bija niecīgas. (Attēls 22D, G, J).



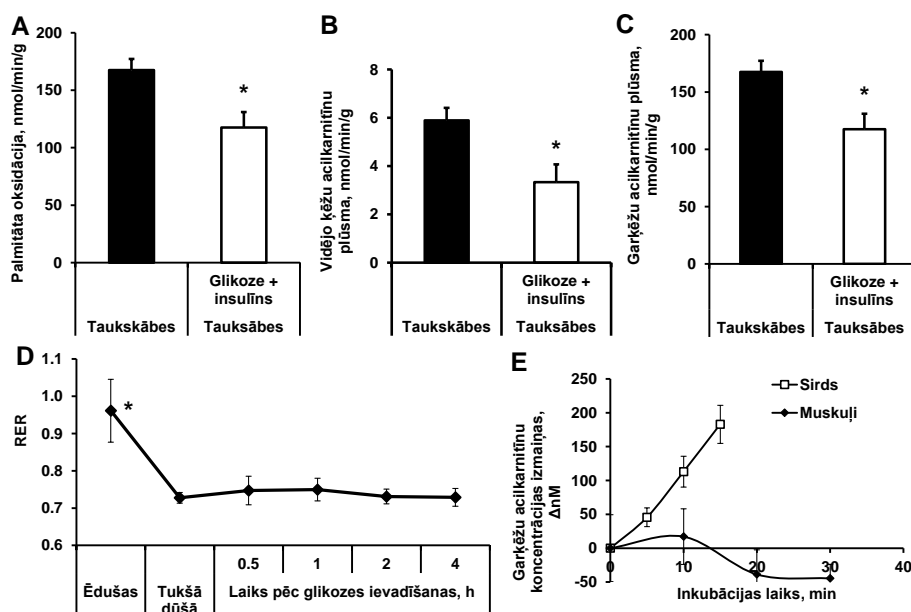
Attēls 21. Glikozes un insulīna koncentrāciju izmaiņas plazmā glikozes tolerances testa laikā. Pēc glikozes ievadīšanas peļu plazmā būtiski pieaug glikozes (A) un insulīna (B) koncentrācija. Rezultāti izteikti kā vidējās vērtības \pm SEM no 5 dzīvniekiem. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar sākumstāvokli (vienfaktora dispersijas analīze ar Tukija pēctestu, $p < 0,05$).



Attēls 22. Acilkarnitīnu (AK) koncentrācijas plazmā un orgānos glikozes tolerances testa (GTT) laikā. Īšķēžu (C2-C5), vidējo ķēžu (C6-C12), un garķēžu (C13-C18) AK koncentrācijas izmaiņas dažādos orgānos. Īšķēžu (Acetil-C2) (A), vidējo (B), un garķēžu (C) AK koncentrācijas plazmā samazinājās 30 min pēc glikozes ievadīšanas. Acetilkarnitīna izmaiņas sirdī (D), skeleta muskuļos (G) un aknās (J) GTT laikā nebija izteiktas. Sirdī 30 min pēc glikozes ievadīšanas bija novērojams būtisks vidējo (E) un garķēžu (F) AK koncentrācijas samazinājums, kam sekoja lēns pieaugums. Muskuļos 30 min pēc glikozes ievadīšanas palielinājās vidēja garuma (H) un garķēžu (I) AK līmenis, kamēr aknās vidēja garuma (K) un garķēžu (L) AK daudzums bija svārstīgs. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības \pm SEM no 5 dzīvniekiem katrā laika punktā. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar sākumstāvokli (vienfaktora dispersijas analīze ar Tukija pēctestu, $p < 0,05$).

Sirdī 30 min pēc glikozes ievadīšanas būtiski samazinājās vidēja un garķēžu AK koncentrācija, kas pēc tam laikam ejot graduāli palielinājās (Attēls 22E, F). Līdzīgas izmaiņas netika novērotas ne skeleta muskuļos, ne aknās (Attēls 22L, K), norādot uz to, ka vidēja garuma un garķēžu AK koncentrācija plazmā atspoguļo AK daudzuma izmaiņas sirds muskulī.

Atšķirībā no miokarda muskuļiem skeleta muskuļi nereaģēja uz īslaicīgām glikozes un insulīna koncentrācijas izmaiņām plazmā. Taukskābju metabolisms un vidējo un garķēžu AK daudzums muskuļos GTT laikā nebija izmainīts (Attēls 22H, I). Šo faktu pamatoja netiešās kalorimetrijas dati, jo RER (0,7) neizmainījās pēc glikozes ievadīšanas (Attēls 23D), norādot uz to, ka skeleta muskuļos pāreja no taukskābju uz glikozes metabolismu nenorisinās ātri, savukārt, sirds spēj nekavējoties reaģēt uz cirkulējošo enerģijas substrātu izmaiņām un daļēji pārslēgt savu enerģijas metabolismu no taukskābju uz glikozes oksidāciju.



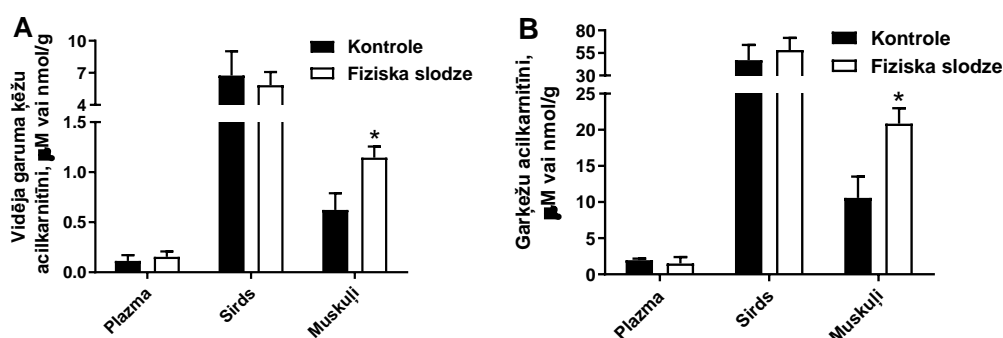
Attēls 23. Enerģijas metabolisma profils sirdī un muskuļos. Sirds perfuzēta Krebsa-Henseleita buferī, kas papildināts ar taukskābēm atbilstoši apstākļiem plazmā tukšā dūšā (0,8mM palmitāts konjugēts ar 2% liellopa seruma albumīnu, 5 mM glikoze, 0,3ng/mL insulīns). Pievienojot papildus glikozi (10mM) un insulīnu (3 ng/mL), tika atdarināta pāreja no tukšas dūšas uz postprandiālu stāvokli. Palmitāta oksidācija noteikta, mērot [³H₂O] izdalīšanos no radioiezīmētā [9,10-³H] palmitāta. Analizēts arī AK daudzums perfuzātā. Vidējās vērtības ± SEM, n = 6, * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar kontroles grupu (Stjudenta t-tests, p<0,05).

Šos novērojumus apstiprināja arī palmitāta oksidācijas un garķēģu AK efluksa mērījumi izolētos orgānos. Izolētās žurku sirdīs glikozes un insulīna pievienošana perfūzijas šķīdumam samazināja palmitāta oksidāciju par 30% (Attēls 23A) un samazināja vidējo ķēģu un garķēģu AK eflukšu no sirds audiem par 43% un 35% (Attēls 23B, C). Atšķirībā no miokarda, izolētajos muskuļos netika novērota ne vidējo ķēģu, ne garķēģu AK eflukss (Attēls 23E), norādot, ka skeleta muskuļi nepiedalās plazmas AK profila veidošanā.

Aknās 30 min pēc glikozes ievadīšanas tika novērots ievērojams vidējo ķēģu un garķēģu AK daudzuma pieaugums (Attēls 22K, L). Tomēr izmaiņas vidējo ķēģu un garķēģu AK profilā neatbilda novērotajām izmaiņām AK daudzumā plazmā, norādot uz to, ka aknas nepiedalās plazmas AK profila veidošanā glikozes tolerances testa laikā, un vidējo ķēģu un garķēģu AK profils plazmā atspoguļo enerģijas metabolisma izmaiņas sirdī. Turklāt šie rezultāti liecina, ka sirds ir atbildīga par vidējo ķēģu un garķēģu AK izmaiņām, pārslēdzoties no tukšas dūšas uz postprandiālo stāvokli.

5.2.3 Acilkarnitīnu koncentrācija plazmā un muskuļos pēc fiziskas slodzes

Tā kā skeleta muskuļi satur lielu daudzumu vidējo ķēžu un garķēžu AK, iespējams, muskuļi var ietekmēt plazmas AK profilu paaugstinātas fiziskas slodzes apstākļos. Lai to pārbaudītu, tika veikti AK profila mērījumi plazmā, skeleta muskuļos un sirdī pēc mērenas fiziskās slodzes (Attēls 24). Pēc fiziskās slodzes vidējo ķēžu un garķēžu AK daudzums skeleta muskuļos pieauga, attiecīgi, 1,8 un 2 reizes (Attēls 24A, B), salīdzinājumā ar intramuskulāro AK daudzumu dzīvnieku muskuļos, kas neveica fiziskas aktivitātes. Tomēr atšķirība starp vidējo ķēžu un garķēžu AK koncentrācijām plazmā un sirdī netika konstatētas. Šie rezultāti apstiprināja pieņēmumu, ka vidēja un garķēžu AK koncentrācijas plazmā neatspoguļo AK profila izmaiņas skeleta muskuļos.



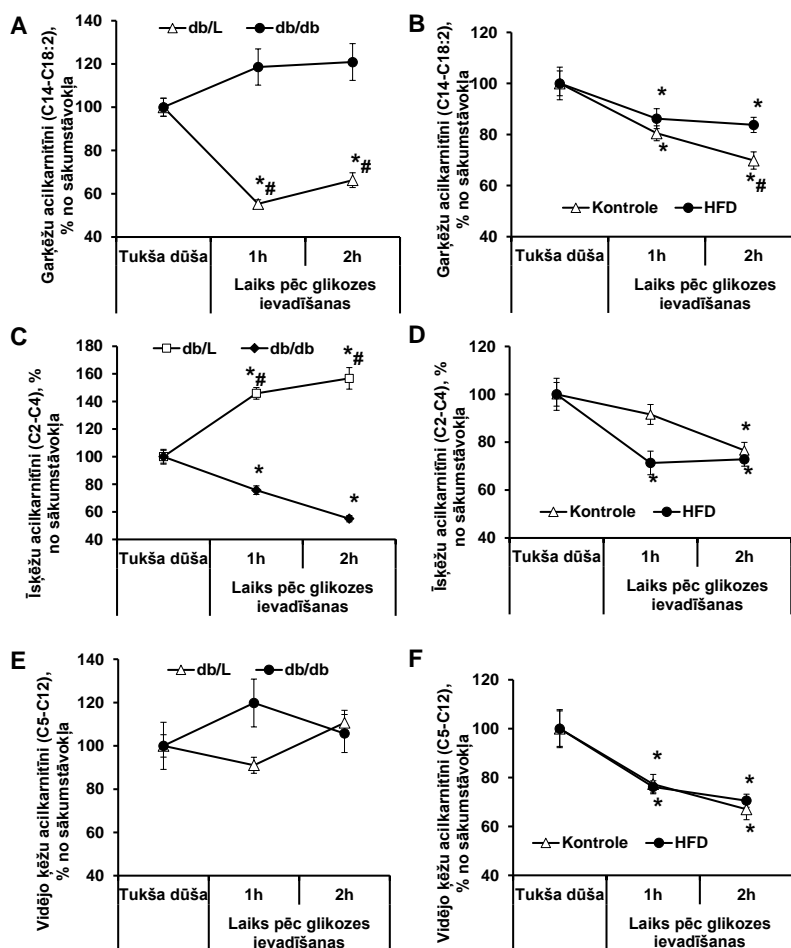
Attēls 24. Vidēja ķēžu (A) un garķēžu acilkarnitīnu (B) koncentrācijas plazmā, sirdī un muskuļos pirms un pēc fiziskas slodzes. Fiziska slodze būtiski palielināja vidējo ķēžu un garķēžu acilkarnitīnu daudzumu muskuļos. Vidējās vērtības + SEM no 6-7 dzīvniekiem grupā. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar stacionāro kontroles grupu (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).

5.3. Taukskābju metabolisma regulācijas traucējumi 2. tipa diabēta attīstības laikā

5.3.1. Acilkarnitīnu koncentrācijas izmaiņas plazmā insulīna rezistences modeļos

Lai novērtētu insulīna rezistences izraisīto ietekmi uz lipīdu metabolismu, tika veikti brīvo taukskābju un AK profila izmaiņu mērījumi plazmā GTT laikā insulīna rezistences un 2. tipa diabēta modeļos (Tabula 3, Attēls 25, Attēls 26). Tukšā dūšā garķēžu AK līmenis plazmā dzīvniekiem, kas ilgstoši bija baroti ar HFD, un db/db pelēm bija 1,3 un 2,5 reizes zemāks nekā attiecīgajiem kontroles dzīvniekiem. Pēc glikozes ievadīšanas garķēžu AK koncentrācija plazmā ievērojami samazinājās par 33% gan kontroles db/L, gan C57bl/6N kontroles dzīvniekos (Attēls 25 A, B). Db/db pelēm GTT laikā plazmas garķēžu AK

koncentrācija nesamazinājās (Attēls 25A). Salīdzinājumā ar kontroles C57bl/6N pelēm, garķēžu AK koncentrācija HFD saņēmušo peļu plazmā 2 h pēc glikozes ievadīšanas samazinājās par 14-16% un būtiski atšķīrās no garķēžu AK koncentrācijas kontroles grupas (Attēls 25B).



Attēls 25. Acilkarnitīnu (AK) koncentrācijas izmaiņas plazmā 2. tipa diabēta un insulīna rezistences modeļos glikozes tolerances testa laikā. Garķēžu (A, B), īšķēžu (C, D) un vidējo ķēžu (E, F) AK koncentrācijas plazmā tika noteiktas tukšā dūšā 1 un 2 h pēc glikozes (0,5 g/kg) ievadīšanas. Rezultātos attēlotas vidējās vērtības ± SEM no 5-10 dzīvniekiem grupā. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu no salīdzinājumā ar tukšu dūšu, # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar attiecīgo kontroles grupu (Atkārtoto mērījumu vienfaktora dispersijas analīze, Tukija pēctests p<0,05)

Īšķēžu AK, galvenokārt acetilkarnitīns, veido 90-95% no kopējā plazmas AK profila (Tabula 3). Tukšā dūšā īšķēžu AK koncentrācija kontroles C57bl/6N peļu plazmā bija $54 \pm 3,6 \mu\text{M}$, bet ar HFD barotajām pelēm īšķēžu AK koncentrācija plazmā bija 1,5 reizes zemāka. Salīdzinājumā ar kontroles C57bl/6N pelēm db/L pelēm tukšā dūšā bija 2,7 reizes zemāka īšķēžu AK koncentrācija, savukārt, db/db dzīvniekiem īšķēžu AK koncentrācija

plazmā bija 1,45 reizu augstāka nekā db/L pelēm (Tabula 3). Īšķēžu AK koncentrācija plazmā 2 h pēc glikozes ievadīšanas bija ievērojami samazinājusies, attiecīgi, par 23; 27 un 45% C57bl/6N, HFD barotajās un db/db pelēs (Attēls 25 C, D).

Tabula 3. Plazmas īšķēžu, vidēja garuma un garķēžu acilkarnitīnu koncentrācijas tukšā dūšā insulīna rezistences un 2. tipa diabēta peļu modeļos.

	Kontrole	HFD	db/L	db/db
Īšķēžu acilkarnitīni, μM				
C2	53 \pm 3,5	36 \pm 1,8*	20 \pm 0,9	28 \pm 1,5*
C3	0,39 \pm 0,03	0,29 \pm 0,03*	0,18 \pm 0,01	0,015 \pm 0,01
C4	0,40 \pm 0,02	0,53 \pm 0,03*	0,20 \pm 0,01	0,64 \pm 0,07*
C5	0,18 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,18 \pm 0,01	0,41 \pm 0,05*
Kopā	54 \pm 3,6	37 \pm 1,8*	20 \pm 0,9	29 \pm 1,5*
Vidējo ķēžu acilkarnitīni, μM				
C6	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,05 \pm 0,00*
C8	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00*
C10	0,02 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00*
C12	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00*
Kopā	0,34 \pm 0,03	0,32 \pm 0,02	0,30 \pm 0,02	0,48 \pm 0,05*
Garķēžu acilkarnitīni, μM				
C14	0,13 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00*
C16	0,65 \pm 0,03	0,47 \pm 0,06*	0,44 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01*
C18:0	0,10 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00*	0,05 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00*
C18:1	0,93 \pm 0,05	0,71 \pm 0,03*	0,54 \pm 0,03	0,27 \pm 0,01*
C18:2	0,06 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00*	0,05 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00*
Kopā	1,90 \pm 0,09	1,46 \pm 0,10*	1,26 \pm 0,05	0,51 \pm 0,02*
Kopējais acilkarnitīnu daudzums, μM				
	56 \pm 3,6	39 \pm 1,9*	22 \pm 0,9	29 \pm 1,6*

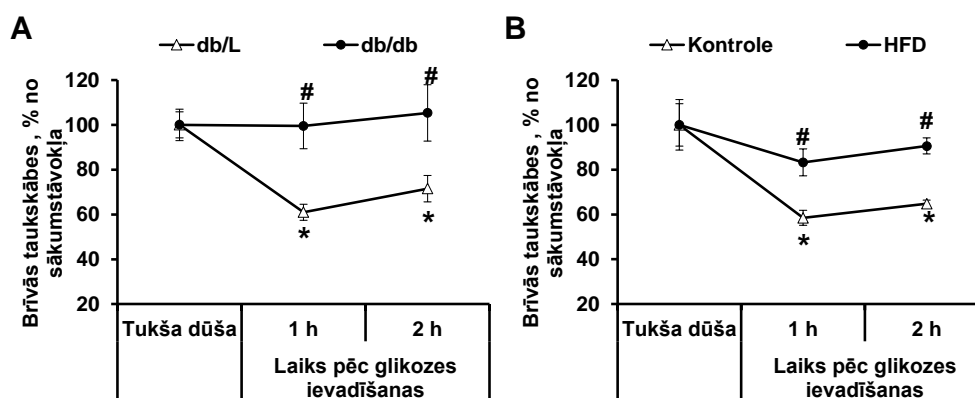
Vidējās vērtības \pm SEM no 9-10 dzīvniekiem grupā. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar attiecīgo kontroles grupu (Stjudenta t-tests, $P < 0,05$).

Īšķēžu AK koncentrācijas pieaugums plazmā par 57% (Attēls 25C) tika novērots tikai db/L pelēs. Tukšā dūšā vidējo ķēžu AK līmenis plazmā neatšķīrās starp kontroles un HFD barotajām C57bl/6N pelēm, bet db/db pelēm tukšā dūšā vidējo ķēžu AK koncentrācija

plazmā, salīdzinot ar db/L dzīvniekiem, bija 1,6 reizes lielāka (Tabula 3). Vidējo ķēžu AK koncentrācija plazmā db/db grupā bija līdzīga AK daudzumam db/L dzīvniekos un GTT laikā nemainījās (Attēls 25E). Kontroles un HFD barotajām C57bl/6N pelēm vidējo ķēžu AK līmenis GTT laikā samazinājās par 31% (Attēls 25F). Tādējādi kontroles un HFD barotajiem dzīvniekiem bija novērojams līdzvērtīgs īšķēžu un vidējo ķēžu AK līmeņa samazinājums, bet db/db pelēm netika novērota līdzvērtīga saistība starp īšķēžu un vidējo ķēžu AK koncentrācijas izmaiņām plazmā un insulīna rezistences pakāpi.

5.3.2. Brīvo taukskābju koncentrācijas izmaiņas plazmā insulīna rezistences modeļos

Kontroles db/L dzīvniekiem 2 h pēc glikozes ievadīšanas brīvo taukskābju koncentrācija plazmā samazinājās vidēji par 28%. Turpretim db/db pelēm ar izteiktu insulīna rezistenci taukaudos brīvo taukskābju līmenis GTT laikā nemainījās (Attēls 26A). Kontroles barību ēdošajām C57bl/6N pelēm 2 h pēc glikozes ievadīšanas, brīvo taukskābju koncentrācija plazmā samazinājās par 35%. Pelēm ar insulīna rezistenci (HFD un db/db) brīvo taukskābju koncentrācija plazmā šajā periodā būtiski nesamazinājās, norādot uz traucētu insulīna atbildes reakciju taukaudos (Attēls 26B).

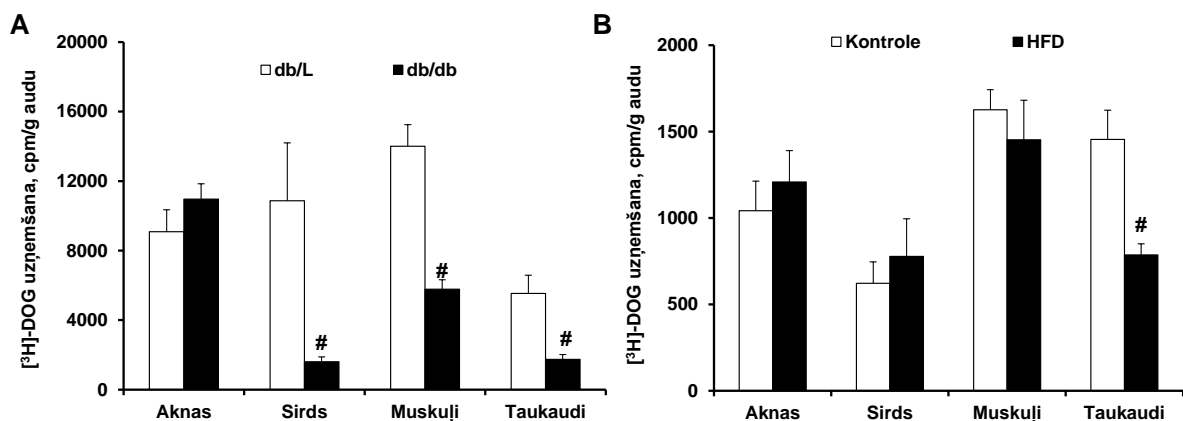


Attēls 26. Brīvo taukskābju koncentrācijas izmaiņas plazmā 2. tipa diabēta un insulīna rezistences modeļos glikozes tolerances testa laikā. Brīvo taukskābju koncentrācijas izmaiņas (A, B) tika noteiktas tukšā dūšā un 1 un 2 h pēc glikozes ievadīšanas. Attēlotas vidējās vērtības ± SEM no 5-10 dzīvniekiem grupā. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar sākumstāvokli, # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar attiecīgo kontroles grupu (Stjudenta t-tests, p<0,05).

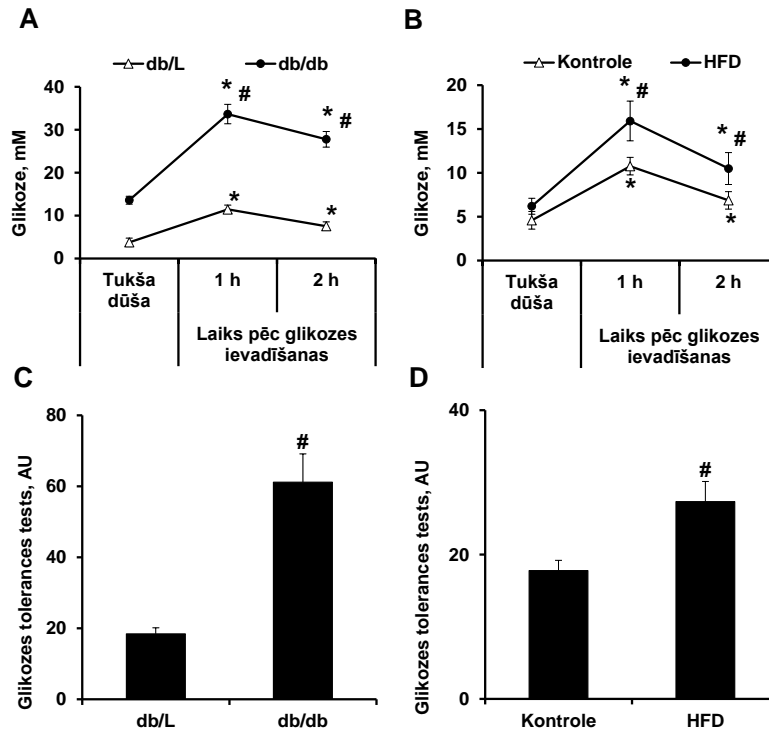
5.3.3. Glikozes uzņemšana audos insulīna rezistences modeļos

Lai novērtētu insulīna jutību dažādos audos, tika noteikta [³H]-DOG uzņemšana peļu audos. Iezīmētās glikozes uzņemšana db/db peļu sirdī, muskuļos un taukaudos bija 2 līdz 8

reizes mazāka, salīdzinot ar db/L kontroles dzīvniekiem (Attēls 27A). Pelēm, kas ilgstoši bija saņēmušas HFD barību, uzņemtās glikozes daudzums taukaudos bija samazinājies tikai 2,7 reizes, bet sirds un muskuļu audos glikozes uzņemšana nebija izmainīta (Attēls 27B). Lai raksturotu izvēlētos insulīna rezistences un 2. tipa cukura diabēta eksperimentālos modeļus, gan postprandiālā, gan tukšā dūšā tika noteikts glikozes, insulīna, un HbA1c līmenis plazmā, kā arī veikts GTT (Attēls 28 un Attēls 29). Db/db pelēm bija statistiski ticami samazināta glikozes tolerance, un laukums zem glikozes koncentrācijas līknes GTT testa laikā bija 3 reizes lielāks nekā kontroles db/L dzīvniekiem (Attēls 28A, C). C57bl/6N pelēm, kas 8 nedēļas bija saņēmušas HFD barību, glikozes tolerance bija mēreni traucēta, un laukums zem glikozes koncentrācijas līknes GTT testa laikā bija palielināts par 54% salīdzinājumā ar kontroles C57bl/6N peļu grupu (Attēls 28B, D). Kopumā ar HFD barotām pelēm tika novērota mēreni, bet db/db pelēm smagi glikozes tolerances traucējumi un insulīna rezistence.



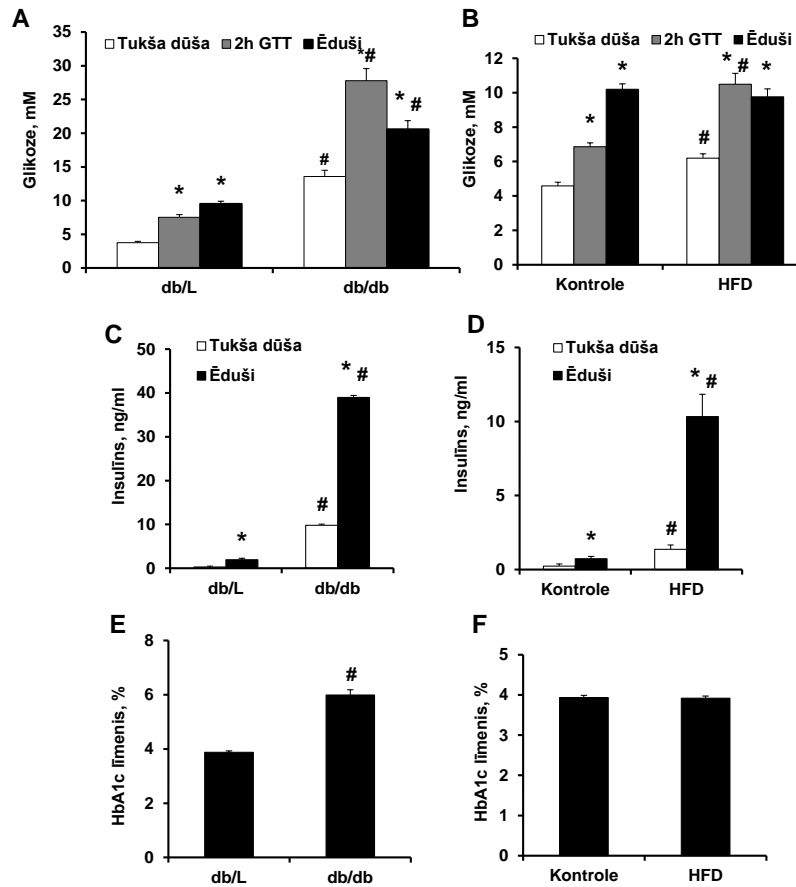
Attēls 27. $[^3\text{H}]\text{-DOG}$ uzņemšana aknās, sirdī, muskuļos un taukaudos 2. tipa diabēta (A) un insulīna rezistences modelī (B) 2 h pēc glikozes tolerances testa. Pelēm subkutāni 1h 50 min pēc glikozes tolerances testa sākuma tika ievadīts $1 \mu\text{Ci}$ $[^3\text{H}]\text{-DOG}$. Aknu, sirds, muskuļu un taukaudu paraugi tika paņemti 10 min pēc $[^3\text{H}]\text{-DOG}$ ievadīšanas. $[^3\text{H}]\text{-DOG}$ daudzums audu homogenātos noteikts ar šķīdumu scintilācijas metodi. Attēlotas vidējās vērtības \pm SEM no 5-10 dzīvniekiem grupā. # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar kontroles grupu (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).



Attēls 28. Glikozes koncentrācijas izmaiņas glikozes tolerances testa laikā 2. tipa diabēta un insulīna rezistences modelī. Glikozes izmaiņas (A, B) un laukums zem glikozes koncentrācijas izmaiņu līknes (C, D) kontroles, HFD, db/L un db/db pelēs. Attēlotas vidējās vērtības \pm SEM no 10 dzīvniekiem grupā. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar tukšas dūšas stāvokli # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar attiecīgo kontroles grupu (Stjūdentu t-tests, $p < 0,05$).

5.3.4. Glikozes regulācija insulīna rezistences modeļos

Db/db salīdzinājumā ar db/L pelēm glikozes līmenis plazmā gan tukšā dūšā, gan ēdusā stāvoklī, gan pēc GTT bija paaugstināts, attiecīgi, 2 un 4 reizes (Attēls 29A, B). Barošana ar HFD barību bija izraisījusi glikozes pieaugumu asinīs par 35–54%. Gan db/db, gan ar HFD barotajām pelēm salīdzinājumā ar kontroles dzīvniekiem tukšā dūšā un postprandiālā stāvoklī tika novērota hiperinsulinēmija (Attēls 29C, D). Tādējādi db/db un HFD pelēm insulīna koncentrācija bija 20 līdz 14 reizes augstāka nekā attiecīgajiem kontroles dzīvniekiem (Attēls 29C, D). Ilgtermiņa hiperglikēmijas marķiera, HbA1c, daudzums asinīs db/db pelēs bija vidēji par 50% augstāks nekā db/L dzīvniekos, bet HFD barības lietošana nebija izmainījusi HbA1c līmeni asinīs (Attēls 29E, F).



Attēls 29. Glikozes, insulīna un glikētā hemoglobīna koncentrācijas 2. tipa diabēta un insulīna rezistences modelī. Glikozes (A, B) un insulīna (C, D) koncentrācija plazmā, kā arī glikētā hemoglobīna (E, F) līmenis asinīs tukšā dūšā, ēdušiem un 2 h pēc GTT. Attēlotas vidējās vērtības \pm SEM no 10 dzīvniekiem grupā. * - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar tukšas dūšas stāvokli, # - norāda uz statistiski būtisku izmaiņu salīdzinājumā ar attiecīgo kontroles grupu (Stjudenta t-tests, $p < 0,05$).

6. Diskusija

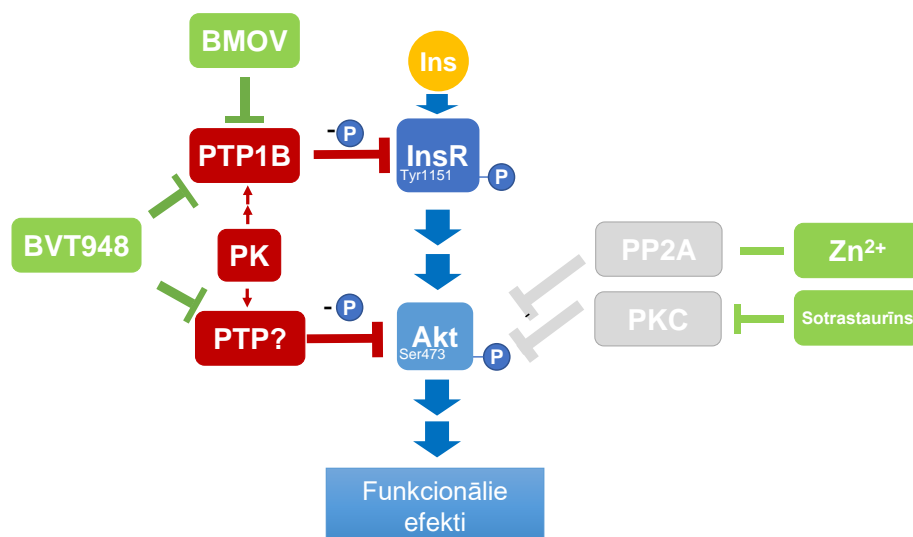
6.1. Garķēžu acilkarnīnu izraisītās insulīna rezistences mehānismi

Jau kopš Sers Randls atklāja konkurenci starp lipīdu un glikozes oksidāciju šūnas enerģijas metabolisma procesos (Randle et al., 1963), ir veikti plaši pētījumi, lai izprastu lipīdu un glikozes enerģijas metabolisma mijiedarbības aspektus un tos regulējošos faktoros (Hue and Taegtmeier, 2009). Ieskats par šo mijiedarbību ir būtisks, lai izprastu insulīna rezistences mehānismus. Paaugstināts garķēžu AK līmenis jau ilgstoši tiek saistīts ar insulīna jutības traucējumiem 2. tipa diabēta pacientiem (Aguer et al., 2014), un vairākkārt šī saistība apstiprināta arī insulīna rezistences dzīvnieku modeļos (Liepinsh et al., 2016b; Makarova et al., 2019). Mūsu apkopotie dati parāda garķēžu AK lomu insulīna signālceļa regulācijā un sniedz ieskatu par insulīna rezistences un hiperinsulinēmijas aspektiem, kas saistīti ar 2. tipa cukura diabēta attīstību. Mūsu iegūtie rezultāti parāda, ka PK ietekmē insulīna signālceļu, izraisot InsR Tyr1151 defosforilāciju (Attēls 30). PK ietekmē InsR Tyr1151 defosforilāciju, aktivējot enzīmu PTP1B. Būtiski, ka PK ievērojami samazina insulīna un BMOV izraisīto Akt Ser473 fosforilāciju, kas liecina, ka PK izraisītā Akt defosforilācija nav saistīta tikai ar InsR Tyr1151 defosforilāciju. PP2A un PKC inhibīcija nemazināja PK izraisītos efektus uz Akt Ser473 fosforilāciju, kas norāda, ka PP2A un PKC nav iesaistīti PK izraisītajā Akt defosforilācijā. Šie rezultāti liek domāt, ka mehānisms, kā PK ietekmē insulīna signālceļu, būtiski atšķiras no mehānisma, ar kuru insulīna signālceļu ietekmē keramīdi un DAG.

PTP1B ir viens no enzīmiem, ar būtisku fizioloģisko lomu insulīna signālceļā. Iepriekš veiktos pētījumos parādīts, ka PTP1B delēcija palielina insulīna jutību (González-Rodríguez et al., 2010), bet PTP1B pārekspresija izsauc insulīna rezistenci, kāda novērojama 2. tipa diabēta gadījumā (Zabolotny et al., 2004). Šajā pētījumā mēs pirmo reizi parādījām, ka garķēžu samazina InsR Tyr1151 fosforilāciju, izmantojot no PTP1B atkarīgu mehānismu (Attēls 30). Savukārt, ja PTP1B aktivitāte ir kavēta, PK nespēj samazināt InsR fosforilāciju. Būtiski, ka PTP1B kavēšana ar BMOV novērsa PK izraisīto InsR Tyr1151 fosforilācijas samazinājumu, bet neietekmēja PK izraisīto Akt Ser473 defosforilāciju. Tāpēc var secināt, ka PK izraisītā Akt defosforilācija nav saistīta tikai ar ietekmi uz InsR Tyr1151 defosforilāciju, bet arī uz kādu no tālākajiem insulīna signālceļa posmiem. Tā kā PTP1B ir būtiska loma insulīna signālceļa aktivācijā, PTP1B regulācija ietver arī atgriezeniskās saites, ko PK varētu ietekmēt. Iepriekš veikto pētījumu dati liecina, ka Akt fosforilē PTP1B enzīmu Ser50 pozīcijā un samazina PTP1B aktivitāti, kā rezultātā nenotiek InsR defosforilācija un insulīna

signālceļš ir papildus aktivēts. (Ravichandran et al., 2019). Tā kā PK samazina Akt aktivitāti, ir traucēta no Akt atkarīgā PTP1B kavēšana un PTP1B izraisītā InsR Tyr1151 defosforilācija turpinās. Šādi varētu skaidrot, kādēļ PK klātbūtnē neatkarīgi vienam no otra samazinās InsR un Akt fosforilācija. Tomēr vortmanīns neizraisīja būtiskas izmaiņas InsR Tyr 1151 fosforilācijā (Attēls 18B), liecinot par to, ka pieņēmums par Akt-PTP1B atgriezenisko saiti nevar izskaidrot PK izraisītos efektus CHO šūnu līnijā.

BVT948 ir nekonkurējošs, neatgriezenisks proteīna tirozīna fosfatāžu inhibitors: PTP1B (IC_{50} 0,9), T-šūnu proteīnu tirozīna fosfatāze (TC-PTP) (IC_{50} 1,7 μ M), SH2 domēnu saturoša tirozīna fosfatāze 2 (SHP-2) (IC_{50} 0,09 μ M) un ar leukocītu antigēnu saistītā proteīnu tirozīna fosfatāze (LAR) (IC_{50} 1,5 μ M) (Liljebris et al., 2004). BVT948 PK klātbūtnē saglabā InsR Tyr 1151 un Akt Ser473 fosforilāciju, kas liecina par to, ka PK šajā gadījumā neietekmē nevienu no insulīna signālceļa kināzēm. Tādējādi mehānisms ar kuru PK ietekmē Akt fosforilāciju ir atkarīgs no BVT948 bloķētajām fosfatāzēm. Tā kā PK samazināja Akt Ser 473 fosforilāciju šūnās, kas tika stimulētas ar BMOV, var pieņemt, ka Akt defosforilācija PK klātbūtnē ir atkarīga no fosfatāzēm, kuras inhibē BVT948, bet neietekmē BMOV (Peters et al., 2003; Liljebris et al., 2004). Līdz šim literatūrā aprakstītas 2 fosfatāzes, kas atbilst šiem kritērijiem: LAR (Zabolotny et al., 2001) un TC-PTP (Lee et al., 2017), tomēr turpmāki pētījumi ir nepieciešami, lai apstiprinātu to, vai tiešām PK kavē insulīna signālceļa aktivāciju ar šo fosfatāžu palīdzību.

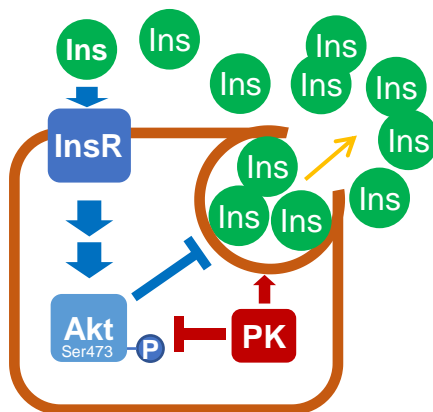


Attēls 30. Palmitoilkarnitīna (PK) ietekme uz insulīna signālceļu. PK kavē insulīna signālceļu, samazinot InsR un Akt fosforilāciju. PK nesamazina InsR Tyr1151 fosforilāciju, ja PTP1B tiek bloķēts ar BMOV vai BVT948. PP2A un PKC nepiedalās PK izraisīto efektu nodrošināšanā. Saīsinājumi un simboli: zilā krāsā – normāla, fizioloģiska regulācija, sarkanā krāsā – PK izraisītie efekti, zaļā krāsā –, insulīna signālceļa negatīvo regulatoru inhibitori, InsR – insulīna receptors, Akt - proteīnkināze B, PTP1B - proteīnu tirozīna fosfatāze 1B, BMOV - bis(maltolato)oksovanādijs (IV) Ins – insulīns, “-P” - defosforilācija, “+P” – fosforilācija.

Vēsturiski PP2A aprakstīta kā Akt Tyr308 fosforilācijas negatīvais regulators, taču jaunākie pētījumi arī norādījuši uz tās iesaisti Akt Ser473 fosforilācijas regulācijā (Hein et al., 2016). Ir zināms, ka PP2A aktivāciju un Akt defosforilāciju stimulē keramīdi (Bikman and Summers, 2011). Mūsu pētījumā PP2A kavēšana ar Zn^{2+} neizmainīja PK ietekmi uz Akt Ser473 fosforilāciju CHO InsR1284 šūnās. Tāpēc varētu secināt, ka PK neizraisa Akt Ser473 defosforilāciju ar mehānismu, kāds raksturīgs keramīdiem. Zn^{2+} joni uzlabo insulīna sensitivitāti, ne tikai kavējot PP2A (Wu et al., 2016), bet arī citas insulīna signālceļu negatīvi regulējošās fosfatāzes (Pandey et al., 2010), ieskaitot fosfatāzes un tenzīna homologu (*phosphatase and tensin homolog*) (PTEN) (Wu et al., 2003). Tā kā inkubācija ar Zn^{2+} nenovērsa PK efektus uz Akt Ser473 fosforilāciju, var secināt, ka ne PP2A, ne PTEN nav saistīti ar PK izraisītajiem insulīna signālceļu kavējošajiem efektiem (Attēls 30).

Virknē pētījumu parādīta PKC grupas proteīnkināžu iesaiste insulīna signālceļa regulācijā, kā piemēram, atsevišķu PKC izoformu palielināta ekspresija un aktivitāte ir saistīta ar insulīna rezistenci (Kawakami et al., 2004; Li et al., 2004). Tā kā dažādām PKC izoformām ir augsta homologija, šajā pētījumā izmantots nespecifisks PKC inhibitors, sotrastaurīns, kas inhibē DAG aktivētās PKC izoformas - α , β I, δ , ϵ , η un θ (Evenou et al.,

2009). Sotrastaurīns neizmainīja ne insulīna ierosināto Akt Ser473 fosforilāciju, nedz novērsa PK efektus, tāpēc var secināt, ka arī no DAG atkarīgās PKC izoformas nav saistītas ar PK samazināto Akt fosforilāciju.



Attēls 31. Palmitoilkarnitīna (PK) izraisītie efekti uz insulīna sekrēciju. PK samazina Akt Ser473 fosforilāciju, kā rezultātā tiek kavēta autokrīnā insulīna sekrēcijas regulācija, izraisot pastiprinātu insulīna izdalīšanos no šūnām. Saīsinājumi un simboli: Zilā krāsa – normāla, fizioloģiska regulācija, Sarkana krāsa – PK izraisītie efekti, InsR – insulīna receptors, Akt - proteīnkināze B, Ins – insulīns, “-P” - defosforilācija, “+P” – fosforilācija.

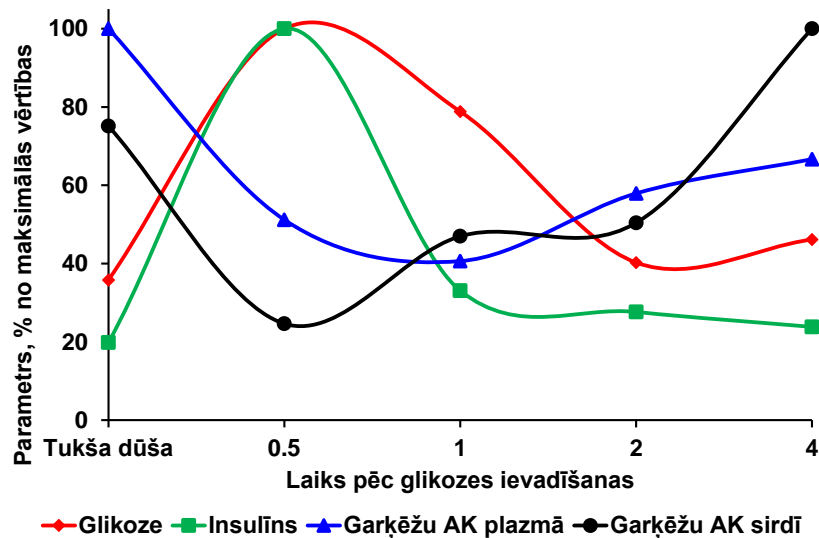
Pētījumi par insulīna sekrēcijas autokrīno regulāciju aizsākās vairāk nekā pirms 20 gadiem, kad parādīja PI3K lomu insulīna sintēzes regulācijā β šūnu saliņās (*islets*) (Leibiger et al., 1998). Tālākie pētījumi parādīja, ka Akt kontrolē insulīna sekrēcijas intensitāti, un traucējumi Akt signālceļā izraisa insulīna sekrēcijas disfunkciju β šūnās (Bernal-Mizrachi et al., 2004). Iepriekš ir aprakstīti arī novērojumi, ka garķēžu AK uzkrāšanās palielina insulīna sekrēciju no β šūnām *in vitro* (Aichler et al., 2017), kā arī plazmas insulīna koncentrāciju *in vivo* (Liepinsh et al., 2017). Mūsu pētījumā RIN5F šūnās PK klātbūtnē Akt Ser473 fosforilācijas līmenis bija nemainīgs, bet palielinātas sekrēcijas rezultātā insulīna koncentrācija bija būtiski augstāka. Tādējādi rezultāti norāda, ka paaugstināts PK līmenis izraisa hiperinsulinēmiju, jo ir nomākta Akt Ser473 fosforilācija (Attēls 31).

Mūsu iegūtie rezultāti papildina iepriekš veiktos atklājumus par garķēžu AK mijiedarbību ar insulīna signālceļu (Aguer et al., 2014; McCoin et al., 2015; Liepinsh et al., 2016a, 2017; Blackburn et al., 2020). Mūsu pētījumā pirmo reizi parādīts, ka garķēžu AK izraisītais Akt Ser473 fosforilācijas samazinājums daļēji izskaidrojams ar no PTP1B atkarīgu InsR defosforilāciju. Turpretim nesen publicētā pētījumā, ko veikuši Pereyra ar kolēģiem muskuļu specifiskās CPT2 delēcijas peļu modelī, pētnieki apraksta, ka palielināts garķēžu AK saturs muskuļos neizraisa insulīna un glikozes tolerances traucējumus (Pereyra et al.,

2017). Jāatzīmē, ka šajā pētījumā neizvērtēja ne audu glikozes transportu, ne oksidēšanās ātrumu konkrētā modeļa peļu muskuļos, kas būtu svarīgi *in vivo* pētījumos, kur no insulīna atkarīgās glikozes uzņemšanas procesā piedalās vairāki orgāni. Jāatzīmē, ka šī pētījuma rezultāti rāda, ka paaugstināts garķēžu AK līmenis ievērojami samazināja Akt Ser473 fosforilāciju gan aknās un taukaudos, gan arī muskuļos pelēm, kas saņēmušas HFD barību (Pereyra et al., 2017). Novērotās garķēžu AK uzkrāšanās izraisītais Akt Ser473 fosforilācijas samazinājums atbilst mūsu pētījumā novērotajam.

6.2. Plazmas acilkarnitīnu profils kā marķieris enerģijas metabolismam sirdī

Mūsu pētījumos novērojām, ka visizteiktākās AK daudzuma atšķirības starp postprandiālo un tukšas dūšas stāvokli ir audos, kas spējīgi pielāgot savu enerģijas metabolismu. AK daudzums plazmā ir salīdzinoši neliels, tomēr tas var būtiski mainīties, enerģijas metabolismam audos pārslēdzoties no taukskābju uz glikozes oksidāciju. Tukšas dūšas stāvoklī ATF miokardā pārsvarā veidojas, oksidējoties taukskābēm (Lopaschuk et al., 2010; Liepinsh et al., 2014); tā rezultātā pieaug garķēžu AK daudzums. Tā kā sirds audu enerģijas substrātu krājumi ir ierobežoti (Opie, 1969; Neely and Morgan, 1974), miokarda metabolisms spēj ātri pārslēgties atkarībā no tā, kādi ir asinsritē pieejamie enerģijas substrāti. Pēc glikozes ievadīšanas izdalās insulīns, kas veicina enerģijas metabolisma pārslēgšanos no taukskābju uz glikozes oksidāciju, kā rezultātā garķēžu un vidējo ķēžu AK daudzums sirdī samazinās. Glikozes un insulīna koncentrācijai plazmā samazinoties, sirds pastiprināti izmanto taukskābes un palielinās vidējo ķēžu un garķēžu AK koncentrācijas (Attēls 32).



Attēls 32. Izmaiņas plazmas glikozes un insulīna, kā arī plazmas un sirds garķēžu acilkarnitīnu (AK) līmeņos GTT laikā. Pēc glikozes ievadīšanas insulīns (zaļā līnija) sekmē glikozes (sarkanā līnija) uzņemšanu audos, kam paralēli novēro garķēžu AK samazinājumu sirdī (melnā līnija) un plazmā (zilā līnija), kas liecina par to, ka miokards pārslēdzas no taukskābju enerģijas metabolisma uz glikozes oksidāciju. Pēc laika, kad glikozes un insulīna līmeņi plazmā samazinās, organismam ierobežojot glikozes izmantošanu enerģijas ieguvei, tādēļ sirds pakāpeniski palielina taukskābju oksidācijas īpatsvaru, kā rezultātā plazmā pieaug garķēžu AK koncentrācija.

Skeleta muskuļi enerģijas iegūšanai izmanto gan taukskābes, gan glikozi, bet samazinoties glikozes rezervēm, taukskābju metabolisms kļūst par dominējošo enerģijas ieguves veidu (Soeters et al., 2009; Turner et al., 2014). Skeleta muskuļos AK daudzums palielinās arī ilgstošas badošanās gadījumā (Soeters et al., 2009). GTT laikā skeleta muskuļi nereaģēja uz glikozes ievadīšanu, bet 4-6 h pēc glikozes ievadīšanas, garķēžu AK daudzums muskuļaudos pakāpeniski pieaug. Tā kā garķēžu AK nosaka enerģijas ieguves veidu muskuļos un sirdī (Koves et al., 2008; Aguer et al., 2014; Makrecka et al., 2014; Liepinsh et al., 2017), to pieaugums badošanās laikā kavē pāreju uz glikozes metabolismu; šo stāvokli dēvē arī par pārejošu insulīna rezistenci (Soeters et al., 2008, 2009; Van Der Crabben et al., 2008). Kopumā vidējo un garķēžu AK koncentrācija plazmā neatspoguļo muskuļu AK saturu neilgi pēc glikozes ievadīšanas.

Uzskata, ka paaugstināts garķēžu AK līmenis aknās tukšā dūšā norāda uz paaugstinātu taukskābju metabolismu un oksidāciju (Schooneman et al., 2015; Xu et al., 2016). Mēs novērojām, ka tukšā dūšā ir paaugstināts garķēžu, bet ne vidējo ķēžu AK līmenis aknās, kas norāda, ka izmaiņas organisma AK profilā raksturo taukskābju metabolītu uzņemšanas

ātrumu, nevis oksidāciju aknās. Līdzīgi rezultāti iegūti pētījumā par garķēžu AK uzņemšanu aknās tukšā dūšā (Xu et al., 2016). Nesenā pētījumā aknu specifiskā CPT2 delēcijas peļu modelī demonstrēts, ka neskatoties uz dramatisku garķēžu AK līmeņa pieaugumu aknās, garķēžu AK koncentrācija plazmā nemainās (Lee et al., 2016). Šie novērojumi apstiprina, ka aknas aktīvi uzņem un uzkrāj garķēžu un vidējo ķēžu AK no plazmas, bet nav šo AK avots plazmā.

Iepriekš izteikts pieņēmums, ka īšķēžu AK profilu plazmā nosaka aknas, savukārt, vidējo ķēžu AK profilu nosaka aknu un muskuļu darbība (Schooneman et al., 2015; Xu et al., 2016). Sirdī garķēžu taukskābes ir galvenais substrāts ATF iegūšanai (Neely and Morgan, 1974; Lopaschuk et al., 2010; Liepinsh et al., 2014), tādēļ sirdi uzskata par galveno plazmas garķēžu AK avotu (Xu et al., 2016); tomēr līdz šim tas nebija eksperimentāli pierādīts. Mūsu pētījums liecina, ka izmaiņas garķēžu AK koncentrācijā plazmā GTT laikā atspoguļo izmaiņas garķēžu AK profilā tieši sirdī, nevis muskuļos vai aknās. Turklāt vidējo ķēžu un garķēžu AK koncentrācija sirdī korelē ar plazmas AK līmeņiem. Kopumā, mūsu rezultāti liecina, ka vidēja un garķēžu AK profils plazmā atspoguļo AK profila izmaiņas sirdī (Attēls 32).

Jebkuram orgānam svarīgi ir spēt pārslēgties starp pieejamajiem enerģijas substrātiem. Metabolo traucējumu, piemēram, insulīna rezistences vai sirds mazspējas attīstībai raksturīga traucēta enerģijas metabolisma pielāgošanās spēja (Galgani et al., 2008; Muoio and Neuffer, 2012; Muoio, 2014). Lipīdu metabolisma starpproduktu uzkrāšanās aknās, skeleta muskuļos un sirdī izsauc mitohondriju disfunkciju, iekaisumu un insulīna rezistenci (Muoio and Neuffer, 2012; Turner et al., 2014; McCoin et al., 2015). Gadu desmitiem AK uztvēra tikai kā taukskābju transporta formu mitohondrijos, bet šobrīd pierādīta AK iesaiste enerģijas metabolisma regulācijā un AK akumulācijas saistība ar insulīna rezistences attīstību (Aguer et al., 2014; Makrecka et al., 2014; Liepinsh et al., 2016a, 2017). Tādēļ plazmas AK koncentrācijas izmaiņas ir nozīmīgs marķieris insulīna rezistences diagnostikai.

Šobrīd patoloģiskas izmaiņas plazmas AK profilā izmanto galvenokārt, lai diagnosticētu taukskābju metabolisma traucējumus iedzimtu saslimšanu gadījumā (Piero Rinaldo, Tina M. Cowan, 2008; Adams et al., 2009; Mihalik et al., 2010). Tikai atsevišķos pētījumos meklēta saistība starp plazmas un audu AK profiliem (Soeters et al., 2009; Schooneman et al., 2014), bet korelācija starp plazmas, muskuļu un aknu AK profiliem nav atrasta. Sirdī vidējo ķēžu un

garķēžu AK daudzums postprandiālā stāvoklī ir augstāks nekā citos audos tukšā dūšā. Ja AK plūsma no audiem uz plazmu ir atkarīga no AK iekšsūnas koncentrācijas, tadā gadījumā vidējo ķēžu un garķēžu AK eflukss virzās atkarībā no AK koncentrācijas gradienta no sirds audiem uz plazmu. Tā kā AK profila plūsmas izmaiņas var būt nelineāras, pat relatīvi nelielas izmaiņas sirds vidējo un garķēžu AK profilā, metabolismam pārslēdzoties starp tukšas dūšas un postprandiālo stāvokli, var ievērojami izmainīt plazmas AK līmeni. Sirds mazspējas pacientiem, kam raksturīgi izteikti metabolās pielāgošanās traucējumi, paaugstināta cirkulējošo garķēžu AK koncentrācija saistīta ar mitohondriju funkcionālajiem bojājumiem un palielinātu hospitalizācijas risku (Ahmad et al., 2016). Tādējādi plazmas vidējo un garķēžu AK koncentrācijas noteikšanu var izmantot, lai raksturotu sirds enerģijas metabolisma profilu (Attēls 32) un novērtētu sirds un asinsvadu slimību risku.

AK līmeni organismā var mainīt ne tikai metabolisma, bet arī ģenētiskie defekti gēnos, kas atbildīgi par acilkarnitīnu transportu un metabolismu. Mutācijas OCNT2 gēnā var izraisīt primāro karnitīna deficītu, kam raksturīgs samazināts brīvā karnitīna daudzums serumā. Slimība zīdaiņiem mēdz izpausties kā akūtas hipoglikēmijas epizodes, bet bērnam pieaugot, attīstās kardiomiopātija un muskuļu vājums (de Boer et al., 2013). Ģenētisko CPT1 defektu gadījumā bioķīmiski novērojama neketogēnā hipoglikēmija (*nonketotic hypoglycemia*), vidēja hiperamoniēmija, paaugstināta brīvo taukskābju koncentrācija un paaugstināts plazmas karnitīna līmenis (Longo et al., 2006). Defektīva CPT2 kodējošā gēna gadījumā garķēžu AK nokļūst mitohondriju matriksā, bet netiek efektīvi pārveidoti par acil-CoA (Bonfont et al., 1999), tādējādi uzkrājoties gan matriksā, gan starpmembrānu telpā, veicinot insulīna rezistences attīstību muskuļos (Blackburn et al., 2020). Defektus CACT darbībā raksturo ļoti zems brīvā karnitīna līmenis un ļoti augstas garķēžu AK koncentrācijas, bet metaboloma profils ir līdzīgs kā CPT2 defektu gadījumā (Longo et al., 2006).

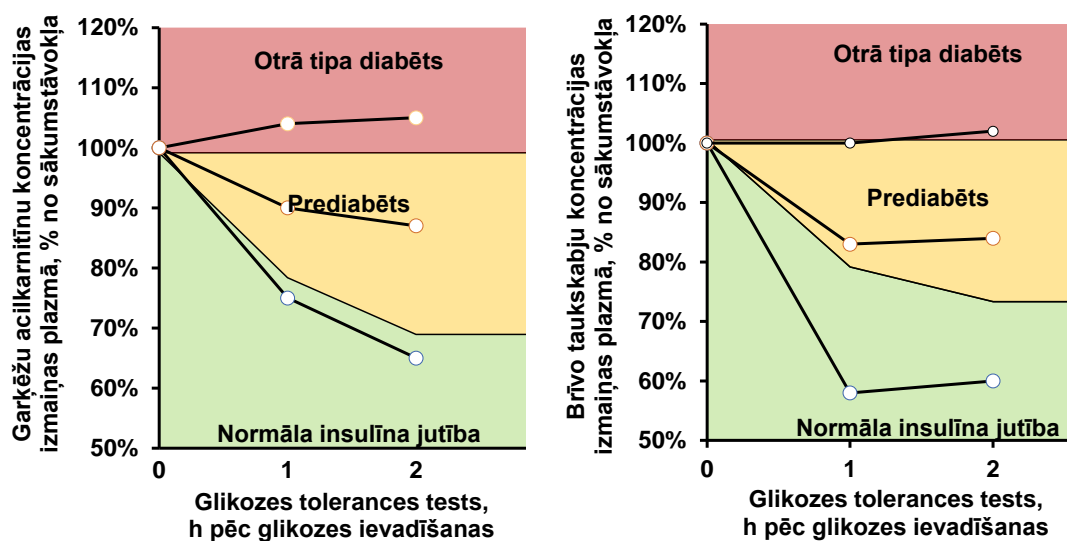
6.3. Garķēžu acilkarnitīni un brīvās taukskābes kā insulīna rezistences marķieri

Lai identificētu jaunus marķierus diabēta diagnostikai, mūsu pētījumā pārbaudījām, vai brīvo taukskābju un garķēžu AK koncentrāciju izmaiņas GTT laikā ir saistāmas ar insulīna jutību. Pēc glikozes ievadīšanas, kontroles dzīvniekos insulīna izdalīšanās samazināja gan brīvo taukskābju, gan garķēžu AK plazmas koncentrāciju par 30% (120 min). Iegūtie rezultāti ļauj secināt, ka AK koncentrācijas izmaiņas plazmā GTT laikā ir izmantojamas, lai raksturotu

muskuļu un sirds specifisko insulīna rezistenci, kamēr brīvo taukskābju koncentrāciju izmaiņas plazmā raksturo taukaudu insulīna rezistenci (Attēls 33). Tukšā dūšā garķēžu AK koncentrācijas plazmā bija ievērojami zemākas peļu modeļos, kas raksturojas ar adipocītu un muskuļu insulīna rezistenci. AK koncentrāciju mērījumi tukšā dūšā nav izmantojami insulīna jutības diagnostikai, jo dzīvniekiem ar insulīna rezistenci ir izteikta tukšās dūšas hiperinsulinēmija, kas kavē no CPT1 atkarīgās garķēžu AK sintēzi (Soeters et al., 2009; Schooneman et al., 2013; Liepinsh et al., 2017). Tas sakrīt ar iepriekš publicētiem novērojumiem, kuros parādīts, ka insulīna jutības indekss nekorelē ar plazmas AK līmeni tukšā dūšā, bet insulīna jutības uzlabošanās indivīdos ar palielinātu svaru izraisīja atsevišķu AK koncentrāciju paaugstināšanos (C2, C4OH, C10, C14:1, C16, C18:1) (Schooneman et al., 2016). Tukšā dūšā, kad plazmas insulīna līmenis ir zems, garķēžu AK mērījumus var izmantot, lai raksturotu mitohondriālo taukskābju oksidāciju (Knottnerus et al., 2018), bet šis stāvoklis nav piemērots, lai pēc garķēžu AK un brīvo taukskābju koncentrācijas spriestu par insulīna rezistenci. Vairākos pētījumos ir mēģināts noteikt saistību starp cirkulējošo AK koncentrācijām tukšā dūšā un insulīna jutību GTT laikā (Adams et al., 2009; Mihalik et al., 2010; Mai et al., 2013; Zhang et al., 2014). Tomēr jāņem vērā, ka normālos fizioloģiskos apstākļos, tukšā dūšā insulīna līmenis ir zems, tāpēc AK koncentrācijas neatspoguļo insulīna jutību (Liepinsh and Dambrova, 2018). Papildus tam ir identificēti dažāda garuma AC, kuru plazmas koncentrācija ir paaugstināta tieši pacientiem ar glikozes regulācijas traucējumiem vai 2. tipa diabētu, tomēr šī saistība skaidrojama ar mitohondriju darbības defektiem un nepilnīgu taukskābju oksidāciju, nevis insulīna rezistenci (Liepinsh and Dambrova, 2018).

Postprandiālā stāvoklī insulīns kavē garķēžu AK sintēzi (Soeters et al., 2009; Schooneman et al., 2013); tāpēc AK koncentrācijas izmaiņu mērījumi pēc glikozes uzņemšanas raksturo insulīna jutību. Mūsu pētījumā izmērījām, ka veselām pelēm pēc glikozes ievadīšanas plazmas garķēžu AK koncentrācijas samazinājās par 30%, kamēr ar HFD barotās pelēs ar mērenu insulīna rezistenci garķēžu AK koncentrācijas kritums bija mazāk izteikts, savukārt, 2. tipa diabēta modelī garķēžu AK līmenis nesamazinājās vispār. Diabēta modelī novērotā hiperglikēmija un izteikti glikozes tolerances traucējumi GTT laikā ir saistīti ar no insulīna atkarīgās glikozes uzņemšanas samazināšanos sirdī, muskuļos un taukaudos. Insulīna rezistences modelī, attīstoties mēreniem glikozes homeostāzes traucējumiem, samazināta insulīna jutība bija vērojama tikai taukaudos. Tomēr jāņem vērā, ka pelēm ar insulīna rezistenci HFD modelī bija izteikti paaugstināta insulīna koncentrācija, kas liecina, ka šīm pelēm ir agrīna insulīna rezistence, kas maskē insulīna rezistenci audos. Db/db pelēs

novērojām izteiktu insulīna rezistenci un samazinātu glikozes uzņemšanu arī skeleta muskuļos un sirdī. Šie mērījumi apstiprina, ka garķēžu acilkarnitīnu mērījumi plazmā atspoguļo sirds un muskuļu insulīna rezistences pakāpi dzīvniekos. Mūsu novērojumi saskan ar iepriekš veikto pētījumu rezultātiem pacientos ar insulīna rezistenci, kuros glikozes stimulētā insulīna sekrēcija nespēj pilnvērtīgi apturēt garķēžu AK veidošanos muskuļos (Mihalik et al., 2010; Bouchouirab et al., 2018). Tas apstiprina, ka plazmas garķēžu AK līmeņu mērījumi glikozes tolerances un eiglikēmiskās skavas laikā ir piemēroti insulīna jutības novērtēšanai muskuļos un sirdī.



Attēls 33. Garķēžu acilkarnitīnu (AK) un brīvo taukskābju koncentrācijas izmaiņas glikozes tolerances testa laikā. Nepietiekams plazmas brīvo taukskābju samazinājums, pārejot no tukšas dūšas uz postprandiālo stāvokli, liecina par taukaudu insulīna rezistenci, bet nepietiekams garķēžu AK samazinājums liecina par sirds un skeleta muskuļu insulīna rezistenci.

Veselos indivīdos glikozes stimulētā insulīna sekrēcija kavē lipolīzi taukaudos un samazina plazmas brīvo taukskābju koncentrāciju (Randle, 1998). Mūsu pētījumā glikozes ievadīšana samazināja brīvo taukskābju koncentrāciju kontroles grupās par 35%, bet ar HFD barotajās un db/db pelēs plazmas brīvo taukskābju līmenis nemainījās. Glikozes uzņemšanas mērījumi abos modeļos uzrādīja būtisku taukaudu insulīna rezistenci, kas raksturojas ar nepārtrauktu lipolīzi un brīvo taukskābju izplūšanu no taukaudiem gan tukšā dūšā, gan postprandiālā stāvoklī. Līdzīgi mērījumi ir veikti pacientos, parādot, ka insulīns nespēj samazināt plazmas brīvo taukskābju koncentrāciju plazmā 2. tipa diabēta pacientos (Mihalik et al., 2010), tādējādi apliecinot mūsu pētījumā novēroto efektu klīnisko nozīmi. Kopumā brīvo taukskābju

koncentrācijas samazināšanās plazmā, reaģējot uz glikozes ievadīšanu, atspoguļo taukaudu insulīna jutību.

Tā kā acetilkarnitīna (C2) koncentrācija ir daudz lielāka nekā pārējo acilkarnitīnu koncentrācija, no kopējās AK koncentrācijas mērījumiem ir iespējams spriest galvenokārt par izmaiņām acetilkarnitīna daudzumā. Turklāt īsķēžu AK veidojas gan lipīdu, gan aminoskābju un ogļhidrātu metabolisma rezultātā, un galvenokārt veidojas aknās (Schooneman et al., 2015). Mēs novērojam, ka īsķēžu un vidējo ķēžu AK līmenis pēc glikozes ievadīšanas samazinājās kontroles un insulīna rezistentajos dzīvniekos, un netika novērota konsekventa saistība starp izmaiņām AK plazmas koncentrācijā un insulīna rezistences pakāpi. Tādējādi īsķēžu un vidējo ķēžu AK nav uzskatāmi par nozīmīgiem marķieriem muskuļu un sirds specifiskas insulīna rezistences noteikšanai.

Kopumā brīvo taukskābju koncentrācijas samazinājums plazmā pēc glikozes ievadīšanas atspoguļo jau agrīnas izmaiņas taukaudu insulīna jutībā, bet nepietiekams garķēžu AK līmeņa samazinājums ir saistīts ar muskuļu un sirds insulīna rezistenci. Pētījumā iegūtie dati liecina, ka, lai noteiktu tauku un muskuļu audu specifisku insulīna rezistenci, īsķēžu un vidējo ķēžu AK līmeņu raksturošana nav piemērota, turpretim plazmas brīvo taukskābju un garķēžu AK koncentrācijas noteikšana plazmā 2 h pēc glikozes ievadīšanas pacientiem ir pielietojama diagnostiskai.

7. Secinājumi

1. Palmitoilkarnitīns kavē insulīna signālceļu, izmantojot no PTP1B atkarīgu mehānismu, tādējādi samazinot InsR un Akt fosforilāciju.
2. Sirds ir galvenais orgāns, kura acilkarnitīnu profila izmaiņas šūnās nosaka vidējo ķežu un garķežu acilkarnitīnu profilu plazmā. Pēc plazmas acilkarnitīnu profila mērījumiem var spriest par taukskābju metabolisma procesiem sirds audos.
3. Nepietiekams plazmas garķežu acilkarnitīnu samazinājums glikozes tolerances testa laikā norāda uz insulīna rezistenci muskuļu un miokarda audos, savukārt, par taukaudu insulīna rezistenci liecina nepietiekams brīvo taukskābju līmeņa samazinājums.

8. Rezultātu aprobācija

8.1. Zinātniskie raksti

1. **Vilks, K.**; Videja, M.; Makrečka-Kuka, M.; Katkevics, M.; Sevostjanovs, E.; Grandane, A.; Dambrova, M.; Liepinsh, E. Long-Chain Acylcarnitines Decrease the Phosphorylation of the Insulin Receptor at Tyr1151 Through a PTP1B-Dependent Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6470. <https://doi.org/10.3390/ijms22126470>
2. Makrečka-Kuka M, Sevostjanovs E, **Vilks K**, Volska K, Antone U, Kuka J, Makarova E, Pugovics O, Dambrova M, Liepinsh E. Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues. *Scientific reports.* 2017 Dec 13;7(1):1-1. DOI:10.1038/s41598-017-17797-x
3. Makarova E, Makrečka-Kuka M, **Vilks K**, Volska K, Sevostjanovs E, Grinberga S, Zarkova-Malkova O, Dambrova M, Liepinsh E. Decreases in Circulating Concentrations of Long-Chain Acylcarnitines and Free Fatty Acids During the Glucose Tolerance Test Represent Tissue-Specific Insulin Sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10:870. doi: 10.3389/fendo.2019.00870.

8.2. Zinātniskās konferences

1. **Vilks K**, Videja M, Makrečka-Kuka M, Katkevics M, Grandane A, Dambrova M, Liepinsh e. Long-chain acylcarnitines decrease the phosphorylation of the insulin receptor and Protein kinase B through a PTP1B-dependent mechanism. Latvian Biochemical society (LaBS) and 79th International Scientific Conference of the University of Latvia section of Molecular biology. Rīga, Latvija, 2021. gada 26. Februāris, Mutisks ziņojums
2. Makrečka-Kuka M, **Vilks K**, Dambrova M, Liepinsh E. Lower cardiac content of long-chain acylcarnitines prevents ischemia-reperfusion-induced mitochondrial and cardiac damage in N6-trimethyllysine dioxygenase knockout mice. 4th Annual UCLA Mitochondria Symposium, Losandželosa, Kalifornija, 2020. gada 5-6. Novembris, Tiešsaistes ziņojums
3. **Vilks K**. Molecular mechanisms of long-chain acylcarnitine-induced insulin resistance. FEBS3+ Conference of Latvian Lithuanian and Estonian Biochemical Societies, Young Researchers Day, Session II, Rīga, Latvija, 2019. gada 17-19. Jūnijs, Mutisks ziņojums
4. Makarova E, Makrečka-Kuka M, **Vilks K**, Dambrova M, Liepinsh E, Plasma concentrations of fatty acids and acylcarnitines as biomarkers for diagnosis of insulin resistance in adipose and muscle tissues, 13th Conference on Mitochondrial Physiology: The role of mitochondria in health, disease and drug discovery, Jūrmala, Latvija, 2018 gada 18-21. Septembris, Mutisks ziņojums
5. **Vilks K**, Volska K Makarova E, Makrečka-Kuka M, Dambrova M, Liepinsh E., Impact of long-chain acylcarnitines on muscle insulin sensitivity and interaction with Akt-related insulin signalling pathway. 2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets, Rīga, Latvija 2017. gada 19-20. Oktobris, Stenda ziņojums

6. **Vilks K** , Sevostjanovs E, Dambrova M, Liepiņš E, Makrecka-Kūka M., Plazmas acilkarnitīnu koncentrācija atspoguļo acilkarnitīnu profilu sirdī, LU 76. Konference Molekulārās bioloģijas sekcija, Rīga, Latvija, 2018. gada 2. Februāris, Mutisks ziņojums
7. **Vilks K**, Makarova E, Makrecka-Kuka M, Dambrova M, Liepinsh E., Elevated acylcarnitine levels induce insulin insensitivity by decreasing phosphorylation of insulin receptor β and downstream signalling. XVth International Conference of the Lithuanian Biochemical Society, Dubingiai, Lietuva, 2018. gada 26.-29. Jūnijs, Stenda ziņojums
8. **Vilks K**, Volska K, Makarova E, Makrecka-Kuka M, Dambrova M, Liepinsh E., Elevated acylcarnitine levels induce muscle insulin insensitivity through the interaction with Akt-related insulin signalling pathway 17. FEBS Jauno Zinātnieku Forums, Jeruzaleme, Izraēla., 2017,7.-10. Septembris, Stenda ziņojums
9. **Vilks K**, Volska K, Makarova E, Makrecka-Kuka M, Dambrova M, Liepinsh E., Elevated acylcarnitine levels induce muscle insulin insensitivity through the interaction with Akt-related insulin signalling pathway, FEBS 42. kongress, Jeruzaleme, Izraēla., 2017,10.-14. Septembris, Stenda ziņojums
10. **Vilks K**, Volska K, Makarova E, Makrecka-Kuka M, Dambrova M, Liepinsh E., Palmitolkarnitīna ietekme uz Akt saistīto insulīna signālceļu un saistība ar muskuļu insulīna rezistenci, LU 75. zinātniskajā konferencē, Rīga, Latvija, 2017. gada 30. Janvāris, Mutisks ziņojums

9. Pateicības

Vēlos no sirds pateikties mana zinātniskā darba vadītājiem Prof. Dr. pharm. Maijai Dambrovai un Dr. pharm Edgaram Liepiņam par pacietību, atbalstu un vadību pētnieciskā darba izstrādes laikā.

Vēlos izteikt paldies arī kolēģiem laboratorijā, par viņu pieredzi, padomiem un palīdzību:

Paldies Marinai Makreckai-Kūkai un Jānim Kūkam par viņu nebeidzamo atbalstu, kad tas bija visvairāk vajadzīgs, laboratorijā un ārpus tās. Īpašs paldies Melitai Vidējai, kura vienmēr sniegusi vērtīgu atbalstu. Paldies Edijam Vāveram, Baiba Švalbe, Līgai Zvejniecei un Antonam Sizovam par viņu optimismu un apbalstu visā šajā laikā. Paldies Elīnai Makarovai, kura palīdzēja uzsākt gaitas šajā laboratorijā. Paldies Ludmilai Jankevičai, Svetlanai Venediktovai, Rūdolfam Mežapuķem, Helēnai Cīrulei, Olgai Žarkovai-Malkovai un Lāsmai Ļaubertei par tehnisko atbalstu laboratorijā. Visbeidzot paldies Solveigai Grīnbergai un Eduardam Sevastjonovam par acilkarnitīnu analīzi un Mārtiņam Katkevičam un Aigai Grandānei par savienojumu sintēzi, bez kuriem šis pētījums nebūtu iespējams.

Paldies arī manai ģimenei un draugiem par iedrošināšanu un atbalstu visā šajā laika posmā.

Šis pētījums nebūtu iespējams bez lieliskās Latvijas Organiskās sintēzes institūta (Dr.chem. Osvalds Pugovičs) darba vides, kā arī finansiālā atbalsta, kuru sniedza Latvijas Zinātnes padomes projekts TRILYSOX un Latvijas Organiskās sintēzes institūta studentu grants.

10. Literatūras avoti

Adams, S.H., Hoppel, C.L., Lok, K.H., Zhao, L., Wong, S.W., Minkler, P.E., et al. (2009). Plasma Acylcarnitine Profiles Suggest Incomplete Long-Chain Fatty Acid -Oxidation and Altered Tricarboxylic Acid Cycle Activity in Type 2 Diabetic African-American Women. *J. Nutr.* 139: 1073–1081.

Aguer, C., McCoin, C.S., Knotts, T.A., Thrush, A.B., Ono-Moore, K., McPherson, R., et al. (2014). Acylcarnitines : potential implications for skeletal muscle insulin resistance. *FASEB J.* 29: 336–345.

Ahmad, T., Kelly, J.P., McGarrah, R.W., Hellkamp, A.S., Fiuzat, M., Testani, J.M., et al. (2016). Prognostic implications of long-chain acylcarnitines in heart failure and reversibility with mechanical circulatory support. *J. Am. Coll. Cardiol.* 67: 291–299.

Aichler, M., Borgmann, D., Krumsiek, J., Buck, A., MacDonald, P.E., Fox, J.E.M., et al. (2017). N-acyl Taurines and Acylcarnitines Cause an Imbalance in Insulin Synthesis and Secretion Provoking β Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 25: 1334-1347.e4.

American Diabetes Association, A.D. (2017). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 40: S11--S24.

Bene, J., Márton, M., Mohás, M., Bagosi, Z., Bujtor, Z., Oroszlán, T., et al. (2013). Similarities in serum acylcarnitine patterns in type 1 and type 2 diabetes mellitus and in metabolic syndrome. *Ann. Nutr. Metab.* 62: 80–85.

Bernal-Mizrachi, E., Fatrai, S., Johnson, J.D., Ohsugi, M., Otani, K., Han, Z., et al. (2004). Defective insulin secretion and increased susceptibility to experimental diabetes are induced by reduced Akt activity in pancreatic islet β cells. *J. Clin. Invest.* 114: 928–936.

Bikman, B.T., and Summers, S.A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest.* 121: 4222–4230.

Blackburn, M.L., Ono-Moore, K.D., Sobhi, H.F., and Adams, S.H. (2020). Carnitine palmitoyltransferase 2 knockout potentiates palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 319: E265–E275.

Boer, L. de, Kluijtmans, L.A.J., and Morava, E. (2013). Primary carnitine (OCTN2) deficiency without neonatal carnitine deficiency. In *JIMD Reports*, (Springer), pp 39–40.

Bonnefont, J.P., Demaugre, F., Prip-Buus, C., Saudubray, J.M., Brivet, M., Abadi, N., et al. (1999). Carnitine palmitoyltransferase deficiencies. *Mol. Genet. Metab.* 68: 424–440.

Bouchouirab, F.Z., Fortin, M., Noll, C., Dubé, J., and Carpentier, A.C. (2018). Plasma Palmitoyl-Carnitine (AC16:0) Is a Marker of Increased Postprandial Nonesterified Incomplete Fatty Acid Oxidation Rate in Adults With Type 2 Diabetes. *Can. J. Diabetes* 42: 382-388.e1.

Cao, B., Chen, Y., McIntyre, R.S., and Yan, L. (2020). Acyl-Carnitine plasma levels and their association with metabolic syndrome in individuals with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 293: 113458.

Caravan, P., Gelmini, L., Glover, N., Herring, F.G., McNeill, J.H., Rettig, S.J., et al. (1995). Reaction Chemistry of BMOV, Bis(maltolato)oxovanadium(IV)—A Potent Insulin Mimetic Agent. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 12759–12770.

Crabben, S.N. Van Der, Allick, G., Ackermans, M.T., Endert, E., Romijn, J.A., and Sauerwein, H.P. (2008). Prolonged fasting induces peripheral insulin resistance, which is not ameliorated by high-dose salicylate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 638–641.

Dambrova, M., Makrecka-Kuka, M., Vilskersts, R., Makarova, E., Kuka, J., and Liepinsh, E. (2016). Pharmacological effects of meldonium: Biochemical mechanisms and biomarkers of cardiometabolic activity. *Pharmacol. Res.* 113: 771–780.

Dobrowsky, R.T., Kamibayashi, C., Mumby, M.C., and Hannun, Y.A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 268: 15523–15530.

Eichmann, T.O., and Lass, A. (2015). DAG tales: The multiple faces of diacylglycerol - Stereochemistry, metabolism, and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: 3931–3952.

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., et al. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* (80-.). 283: 1544–1548.

Evenou, J.P., Wagner, J., Zenke, G., Brinkmann, V., Wagner, K., Kovarik, J., et al. (2009). The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330: 792–801.

Feldhammer, M., Uetani, N., Miranda-Saavedra, D., and Tremblay, M.L. (2013). Ptp1b: A simple enzyme for a complex world. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48: 430–445.

Foster, D.W. (2004). The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1033: 1–16.

Foster, D.W. (2012). Malonyl-CoA: The regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J. Clin. Invest.* 122: 1958–1959.

Galgani, J.E., Moro, C., and Ravussin, E. (2008). Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 295:.

Gazdar, A.F., Chick, W.L., Oie, H.K., Sims, H.L., King, D.L., Weir, G.C., et al. (1980). Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 3519–3523.

Gonzalez-Granda, A., Damms-Machado, A., Basrai, M., and Bischoff, S.C. (2018). Changes in plasma acylcarnitine and lysophosphatidylcholine levels following a high-fructose diet: A targeted metabolomics study in healthy women. *Nutrients* 10:.

González-Rodríguez, Á., Mas Gutierrez, J.A., Sanz-González, S., Ros, M., Burks, D.J., and Valverde, Á.M. (2010). Inhibition of PTP1B restores IRS1-mediated hepatic insulin signaling in IRS2-deficient mice. *Diabetes* 59: 588–599.

Goodpaster, B.H., and Sparks, L.M. (2017). Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab.* 25: 1027–1036.

Guasch-Ferré, M., Zheng, Y., Ruiz-Canela, M., Hruby, A., Martínez-González, M.A., Clish, C.B., et al. (2016). Plasma acylcarnitines and risk of cardiovascular disease: Effect of Mediterranean diet interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 103: 1408–1416.

Hein, A.L., Seshacharyulu, P., Rachagani, S., Sheinin, Y.M., Ouellette, M.M., Ponnusamy, M.P., et al. (2016). PR55 α subunit of protein phosphatase 2A supports the tumorigenic and metastatic potential of pancreatic cancer cells by sustaining hyperactive oncogenic signaling. *Cancer Res.* 76: 2243–2253.

Hoene, M., Li, J., Li, Y., Runge, H., Zhao, X., Häring, H.U., et al. (2016). Muscle and liver-specific alterations in lipid and acylcarnitine metabolism after a single bout of exercise

in mice. *Sci. Rep.* 6: 1–10.

Hoppel, C.L., and Genuth, S.M. (1980). Carnitine metabolism in normal-weight and obese human subjects during fasting. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 1:.

Hue, L., and Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: A new head for an old hat. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297: 578–591.

Hunter, W.G., Kelly, J.P., Mcgarrah, R.W., Khouri, M.G., Craig, D., Haynes, C., et al. (2016). Metabolomic Profiling Identifies Novel Circulating Biomarkers of Mitochondrial Dysfunction Differentially Elevated in Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction: Evidence for Shared Metabolic Impairments in Clinical Heart Failure. *J. Am. Heart Assoc.* 5:.

Inzucchi, S.E., Bergenstal, R.M., Buse, J.B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., et al. (2015). Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2015: A Patient-Centered Approach: Update to a position statement of the american diabetes association and the european association for the study of diabetes. *Diabetes Care* 38: 140–149.

Kang, M., Yoo, H.J., Kim, M., Kim, M., and Lee, J.H. (2018). Metabolomics identifies increases in the acylcarnitine profiles in the plasma of overweight subjects in response to mild weight loss: A randomized, controlled design study. *Lipids Health Dis.* 17: 237.

Karwi, Q.G., Wagg, C.S., Altamimi, T.R., Uddin, G.M., Ho, K.L., Darwesh, A.M., et al. (2020). Insulin directly stimulates mitochondrial glucose oxidation in the heart. *Cardiovasc. Diabetol.* 19: 207.

Kawakami, Y., Nishimoto, H., Kitaura, J., Maeda-Yamamoto, M., Kato, R.M., Littman, D.R., et al. (2004). Protein kinase C β II regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J. Biol. Chem.* 279: 47720–47725.

Kerner, J., and Hoppel, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1486: 1–17.

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., and Altman, D.G. (2010). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol.* 8: e1000412.

Knottnerus, S.J.G., Bleeker, J.C., Wüst, R.C.I., Ferdinandusse, S., IJlst, L., Wijburg, F.A., et al. (2018). Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 19: 93.

Koves, T.R., Ussher, J.R., Noland, R.C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., et al. (2008). Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metab.* 7: 45–56.

Kuo, Y.C., Huang, K.Y., Yang, C.H., Yang, Y.S., Lee, W.Y., and Chiang, C.W. (2008). Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55 α regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J. Biol. Chem.* 283: 1882–1892.

Lee, H., Kim, M., Baek, M., Morales, L.D., Jang, I.S., Slaga, T.J., et al. (2017). Targeted disruption of TC-PTP in the proliferative compartment augments STAT3 and AKT signaling and skin tumor development. *Sci. Rep.* 7:.

Lee, J., Choi, J., Scafidi, S., and Wolfgang, M.J. (2016). Hepatic Fatty Acid Oxidation Restrains Systemic Catabolism during Starvation. *Cell Rep.* 16: 201–212.

Lee, S.R., Chanoit, G., McIntosh, R., Zvara, D.A., and Xu, Z. (2009). Molecular mechanism underlying Akt activation in zinc-induced cardioprotection. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 297: 569–575.

Leibiger, I.B., Leibiger, B., Moede, T., and Berggren, P.O. (1998). Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor/PI-3 kinase/p70 s6 kinase and CaM kinase pathways. *Mol. Cell* 1: 933–938.

Li, S., Gao, D., and Jiang, Y. (2019). Function, detection and alteration of acylcarnitine metabolism in hepatocellular carcinoma. *Metabolites* 9:.

Li, Y., Soos, T.J., Li, X., Wu, J., DeGennaro, M., Sun, X., et al. (2004). Protein kinase C θ inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser1101. *J. Biol. Chem.* 279: 45304–45307.

Libert, D.M., Nowacki, A.S., and Natowicz, M.R. (2018). Metabolomic analysis of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: Amino acid and acylcarnitine levels change along a spectrum of metabolic wellness. *PeerJ* 2018: e5410.

Liepinsh, E., and Dambrova, M. (2018). Letter to the Editor: “Serum Carnitine Metabolites and Incident Type 2 Diabetes Mellitus in Patients With Suspected Stable Angina Pectoris”. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *103*: 4037–4038.

Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Makarova, E., Volska, K., Svalbe, B., Sevostjanovs, E., et al. (2016a). Decreased acylcarnitine content improves insulin sensitivity in experimental mice models of insulin resistance. *Pharmacol. Res.*

Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Makarova, E., Volska, K., Vilks, K., Sevostjanovs, E., et al. (2017). Acute and long-term administration of palmitoylcarnitine induces muscle-specific insulin resistance in mice. *BioFactors* *43*: 718–730.

Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Kuka, J., Makarova, E., Antone, U., et al. (2016b). Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochem. J.* *473*: 1191–1202.

Liepinsh, E., Makrecka, M., Kuka, J., Makarova, E., Vilskersts, R., Cirule, H., et al. (2014). The heart is better protected against myocardial infarction in the fed state compared to the fasted state. *Metabolism.* *63*: 127–136.

Liljebris, C., Baranczewski, P., Björkstrand, E., Byström, S., Lundgren, B., Tjernberg, A., et al. (2004). Oxidation of Protein Tyrosine Phosphatases as a Pharmaceutical Mechanism of Action A Study Using 4-Hydroxy-3, 3-dimethyl-2H-benzo[g]indole-2,5(3H)-dione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *309*: 711–719.

Longo, N., Amat Di San Filippo, C., and Pasquali, M. (2006). Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am. J. Med. Genet. - Semin. Med. Genet.* *142 C*: 77–85.

Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D.L., Jaswal, J.S., and Stanley, W.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol. Rev.* *90*: 207–258.

Luo, R.Z.T., Beniac, D.R., Fernandes, A., Yip, C.C., and Ottensmeyer, F.P. (1999). Quaternary structure of the insulin-insulin receptor complex. *Science* (80-.). *285*: 1077–1080.

Mackay, H.J., and Twelves, C.J. (2007). Targeting the protein kinase C family: Are we there yet? *Nat. Rev. Cancer* *7*: 554–562.

Mai, M., Tönjes, A., Kovacs, P., Stumvoll, M., Fiedler, G.M., and Leichtle, A.B. (2013). Serum Levels of Acylcarnitines Are Altered in Prediabetic Conditions. *PLoS One* 8: e82459.

Makarova, E., Makrecka-Kuka, M., Vilks, K., Volska, K., Sevostjanovs, E., Grinberga, S., et al. (2019). Decreases in Circulating Concentrations of Long-Chain Acylcarnitines and Free Fatty Acids During the Glucose Tolerance Test Represent Tissue-Specific Insulin Sensitivity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 10:.

Makrecka-Kuka, M., Liepinsh, E., Murray, A.J., Lemieux, H., Dambrova, M., Tepp, K., et al. (2020). Altered mitochondrial metabolism in the insulin-resistant heart. *Acta Physiol.* 228:.

Makrecka, M., Kuka, J., Volska, K., Antone, U., Sevostjanovs, E., Cirule, H., et al. (2014). Long-chain acylcarnitine content determines the pattern of energy metabolism in cardiac mitochondria. *Mol. Cell. Biochem.* 395: 1–10.

Martins, A.R., Nachbar, R.T., Gorjao, R., Vinolo, M.A., Festuccia, W.T., Lambertucci, R.H., et al. (2012). Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis.* 11: 30.

McCoin, C.S., Knotts, T.A., and Adams, S.H. (2015). Acylcarnitines--old actors auditioning for new roles in metabolic physiology. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11: 617–25.

McGrath, J., Drummond, G., McLachlan, E., Kilkenny, C., and Wainwright, C. (2010). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160: 1573–1576.

Mezhnina, V., Pearce, R., Poe, A., Velingkaar, N., Astafev, A., Ebeigbe, O.P., et al. (2020). CR reprograms acetyl-CoA metabolism and induces long-chain acyl-CoA dehydrogenase and CrAT expression. *Aging Cell.*

Mihalik, S.J., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E., Chace, D.H., Vockley, J., Toledo, F.G.S., et al. (2010). Increased Levels of Plasma Acylcarnitines in Obesity and Type 2 Diabetes and Identification of a Marker of Glucolipototoxicity. *Obesity* 18: 1695–1700.

Mika, A., and Sledzinski, T. (2017). Alterations of specific lipid groups in serum of obese humans: a review. *Obes. Rev.* 18: 247–272.

Muoio, D.M. (2014). Metabolic inflexibility: When mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell* 159: 1253–1262.

Muoio, D.M., and Neuffer, P.D. (2012). Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab.* 15: 595–605.

Muoio, D.M., and Newgard, C.B. (2008a). Fatty acid oxidation and insulin action: when less is more. *Diabetes* 57: 1455–6.

Muoio, D.M., and Newgard, C.B. (2008b). Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 193–205.

Myers, M.G., Backer, J.M., Xiao Jian Sun, Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., et al. (1992). IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 10350–10354.

Neely, J.R., and Morgan, H.E. (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 36: 413–459.

Newgard, C.B. (2017). Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* 25: 43–56.

Newton, A.C. (2018). Protein kinase C: perfectly balanced. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 53: 208–230.

Nivet, J., Blanc, M. Le, and Riess, J. (1991). Synthesis and preliminary evaluation of perfluoroalkylacyl carnitines as surfactants for biomedical use. *Eur. J. Med. Chem.* 26: 953–960.

Opie, L.H. (1969). Metabolism of the heart in health and disease. Part II. *Am. Heart J.* 77: 100–122.

Pandey, N.R., Vardatsikos, G., Mehdi, M.Z., and Srivastava, A.K. (2010). Cell-type-specific roles of IGF-1R and EGFR in mediating Zn²⁺-induced ERK1/2 and PKB phosphorylation. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15: 399–407.

Pereyra, A.S., Hasek, L.Y., Harris, K.L., Berman, A.G., Damen, F.W., Goergen, C.J., et al. (2017). Loss of cardiac carnitine palmitoyltransferase 2 results in rapamycin-resistant, acetylation-independent hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 292: 18443–18456.

Peters, K.G., Davis, M.G., Howard, B.W., Pokross, M., Rastogi, V., Diven, C., et al. (2003). Mechanism of insulin sensitization by BMOV (bis maltolato oxo vanadium); Unliganded vanadium (VO₄) as the active component. *J. Inorg. Biochem.* 96: 321–330.

Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346–356.

Piero Rinaldo, Tina M. Cowan, D.M. (2008). Acylcarnitine profile analysis. *Genet. Med.* 10: 151–156.

Ramos-Roman, M.A., Sweetman, L., Valdez, M.J., and Parks, E.J. (2012). Postprandial changes in plasma acylcarnitine concentrations as markers of fatty acid flux in overweight and obesity. *Metabolism.* 61: 202–212.

Randle, P.J. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes. Metab. Rev.* 14: 263–83.

Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., and Newsholme, E.A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 281: 785–789.

Ravichandran, S., Finlin, B.S., Kern, P.A., and Özcan, S. (2019). Sphk2^{-/-} mice are protected from obesity and insulin resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1865: 570–576.

Reuter, S.E., and Evans, A.M. (2012). Carnitine and acylcarnitines: Pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin. Pharmacokinet.* 51:.

Ribel-Madsen, A., Hellgren, L.I., Brøns, C., Ribel-Madsen, R., Newgard, C.B., and Vaag, A.A. (2016). Plasma amino acid levels are elevated in young, healthy low birth weight men exposed to short-term high-fat overfeeding. *Physiol. Rep.* 4:.

Ruderman, N.B., Saha, A.K., and Kraegen, E.W. (2003). Minireview: Malonyl CoA, AMP-Activated Protein Kinase, and Adiposity. *Endocrinology* 144: 5166–5171.

Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D., and Witters, L.A. (1999). Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 276:.

Scheid, M.P., Marignani, P.A., and Woodgett, J.R. (2002). Multiple Phosphoinositide

3-Kinase-Dependent Steps in Activation of Protein Kinase B. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6247–6260.

Schooneman, M.G., Achterkamp, N., Argmann, C.A., Soeters, M.R., and Houten, S.M. (2014). Plasma acylcarnitines inadequately reflect tissue acylcarnitine metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841: 987–994.

Schooneman, M.G., Have, G.A.M.M. Ten, Vlies, N. Van, Houten, S.M., Deutz, N.E.P.P., and Soeters, M.R. (2015). Transorgan fluxes in a porcine model reveal a central role for liver in acylcarnitine metabolism. *Am. J. Physiol. Metab.* 309: E256--E264.

Schooneman, M.G., Napolitano, A., Houten, S.M., Ambler, G.K., Murgatroyd, P.R., Miller, S.R., et al. (2016). Assessment of plasma acylcarnitines before and after weight loss in obese subjects. *Arch. Biochem. Biophys.* 606: 73–80.

Schooneman, M.G., Vaz, F.M.F.M., Houten, S.M., and Soeters, M.R. (2013). Acylcarnitines: Reflecting or inflicting insulin resistance? *Diabetes* 62: 1–8.

Sharma, S., and Black, S.M. (2009). Carnitine homeostasis, mitochondrial function and cardiovascular disease. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 6: e31–e39.

Shriver, L.P., and Manchester, M. (2011). Inhibition of fatty acid metabolism ameliorates disease activity in an animal model of multiple sclerosis. *Sci. Rep.* 1:

Skene, D.J., Skornyakov, E., Chowdhury, N.R., Gajula, R.P., Middleton, B., Satterfield, B.C., et al. (2018). Separation of circadian- and behavior-driven metabolite rhythms in humans provides a window on peripheral oscillators and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115: 7825–7830.

Soeters, M.R., Sauerwein, H.P., Dubbelhuis, P.F., Groener, J.E., Ackermans, M.T., Fliers, E., et al. (2008). Muscle adaptation to short-term fasting in healthy lean humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 2900–2903.

Soeters, M.R., Sauerwein, H.P., Duran, M., Wanders, R.J., Ackermans, M.T., Fliers, E., et al. (2009). Muscle acylcarnitines during short-term fasting in lean healthy men. *Clin. Sci.* 116: 585–592.

Sommerfeld, M.R., Müller, G., Tschank, G., Seipke, G., Habermann, P., Kurrle, R., et

al. (2010). In vitro metabolic and mitogenic signaling of insulin glargine and its metabolites. *PLoS One* 5:

Strand, E., Pedersen, E.R., Svingen, G.F.T., Olsen, T., Bjørndal, B., Karlsson, T., et al. (2017). Serum acylcarnitines and risk of cardiovascular death and acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. *J. Am. Heart Assoc.* 6:

Sun, J., Qu, C., Wang, Y., Huang, H., Zhang, M., Li, H., et al. (2016a). PTP1B, A Potential Target of Type 2 Diabetes Mellitus. *Mol. Biol.* 05:

Sun, L., Liang, L., Gao, X., Zhang, H., Yao, P., Hu, Y., et al. (2016b). Early prediction of developing type 2 diabetes by plasma acylcarnitines: A population-based study. *Diabetes Care* 39: 1563–1570.

Thompson, D.K., Sloane, R., Bain, J.R., Stevens, R.D., Newgard, C.B., Pieper, C.F., et al. (2012). Daily variation of serum acylcarnitines and amino acids. *Metabolomics* 8: 556–565.

Thompson, K.H., and Orvig, C. (2006). Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J. Inorg. Biochem.* 100: 1925–1935.

Turner, N., Cooney, G.J., Kraegen, E.W., and Bruce, C.R. (2014). Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J. Endocrinol.* 220:

Ueland, T., Svardal, A., Øie, E., Askevold, E.T., Nymo, S.H., Bjørndal, B., et al. (2013). Disturbed carnitine regulation in chronic heart failure - Increased plasma levels of palmitoyl-carnitine are associated with poor prognosis. *Int. J. Cardiol.* 167: 1892–1899.

Valentine, R.J., Coughlan, K.A., Ruderman, N.B., and Saha, A.K. (2014). Insulin inhibits AMPK activity and phosphorylates AMPK Ser485/491 through Akt in hepatocytes, myotubes and incubated rat skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 562: 62–69.

Vardatsikos, G., Pandey, N.R., and Srivastava, A.K. (2013). Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of zinc. *J. Inorg. Biochem.* 120: 8–17.

Violante, S., IJlst, L., Brinke, H. Te, Koster, J., Almeida, I.T. De, Wanders, R.J.A., et al. (2013). Peroxisomes contribute to the acylcarnitine production when the carnitine shuttle is deficient. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831: 1467–1474.

White, M.F., Maron, R., and Kahn, C.R. (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 318: 183–186.

Whitman, M., Downes, C.P., Keeler, M., Keller, T., and Cantley, L. (1988). Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature* 332: 644–646.

Wicks, S.E., Vandanmagsar, B., Haynie, K.R., Fuller, S.E., Warfel, J.D., Stephens, J.M., et al. (2015). Impaired mitochondrial fat oxidation induces adaptive remodeling of muscle metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112: E3300–E3309.

Wu, W., Wang, X., Zhang, W., Reed, W., Samet, J.M., Whang, Y.E., et al. (2003). Zinc-induced PTEN protein degradation through the proteasome pathway in human airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 278: 28258–28263.

Wu, Y., Lu, H., Yang, H., Li, C., Sang, Q., Liu, X., et al. (2016). Zinc stimulates glucose consumption by modulating the insulin signaling pathway in L6 myotubes: Essential roles of Akt-GLUT4, GSK3 β and mTOR-S6K1. *J. Nutr. Biochem.* 34: 126–135.

Xiong, Y., Luo, D.J., Wang, X.L., Qiu, M., Yang, Y., Yan, X., et al. (2015). Zinc binds to and directly inhibits protein phosphatase 2A in vitro. *Neurosci. Bull.* 31: 331–337.

Xu, G., Hansen, J.S.J.S., Zhao, X.J.X., Chen, S., Hoene, M., Wang, X.L.X., et al. (2016). Liver and muscle contribute differently to the plasma acylcarnitine pool during fasting and exercise in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101: 5044–5052.

Zabolotny, J.M., Haj, F.G., Kim, Y.B., Kim, H.J., Shulman, G.I., Kim, J.K., et al. (2004). Transgenic overexpression of protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle causes insulin resistance, but overexpression with leukocyte antigen-related phosphatase does not additively impair insulin action. *J. Biol. Chem.* 279: 24844–24851.

Zabolotny, J.M., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Kim, J.K., Pani, M.A., Boss, O., et al. (2001). Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 5187–5192.

Zhang, S., and Zhang, Z.Y. (2007). PTP1B as a drug target: recent developments in PTP1B inhibitor discovery. *Drug Discov. Today* 12: 373–381.

Zhang, X., Zhang, C., Chen, L., Han, X., and Ji, L. (2014). Human serum acylcarnitine profiles in different glucose tolerance states. *Diabetes Res. Clin. Pract.* *104*: 376–382.